



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2015

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Mise en place du suivi de la maladie résiduelle des LAL-T par cytométrie
en flux multiparamétrique**

Présentée et soutenue publiquement le 28 Septembre 2015 à 18h

Par Anaïs Dericquebourg

JURY

Président : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

**Assesseurs : Monsieur le Professeur Bruno Quesnel
Monsieur le Professeur Ibrahim Yakoub Agha
Madame le Docteur Brigitte Nelken**

Directeur de Thèse : Monsieur le Docteur Christophe Roumier

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

TABLE DES MATIERES

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX	1
Figures.....	1
Tableaux.....	3
ABRÉVIATIONS.....	5
GÉNÉRALITÉS	6
1. Hématopoïèse et lymphopoïèse T	6
1.1. La lymphopoïèse T	7
1.2. Voie de signalisation Notch	11
1.3. Rôle du récepteur Notch dans la lymphopoïèse.....	11
2. Leucémie aigue lymphoblastique T.....	12
2.1. Définition.....	12
2.2. Diagnostic clinique et biologique	13
2.3. Epidémiologie et facteurs de risque	14
2.4. Facteurs pronostiques	15
2.5. Classification	18
3. Cytométrie en flux	19
4. La maladie résiduelle (MRD).....	20
4.1. Définition et application clinique	20
4.2. Moyens d'étude de la MRD dans les LAL	23
OBJECTIFS.....	31
PATIENTS, MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	32
1. Patients	32
2. Les prélèvements	33
3. Témoins.....	34
4. Evaluation de l'hémodilution	35
5. Choix des anticorps.....	36
6. Méthode	42
6.1. Décongélation des échantillons.....	42
6.2. Immuno-marquage	42
6.3. Réglage du cytomètre de flux.....	43

6.4. Acquisition	46
6.5. Stratégie de réanalyse.....	46
6.6. Interprétation biologique des résultats.....	55
RÉSULTATS	58
1. Validation de méthode	58
1.1. Détermination des concentrations optimales en anticorps	58
1.2. Test des combinaisons d'anticorps sur des lymphocytes normaux.....	60
1.3. Etude de la linéarité et de la sensibilité de la technique	61
1.4. Evaluation de la représentativité des prélèvements	62
2. Résultats de la MRD chez les patients.....	65
2.1. Etude de moelles témoins	65
2.2. Nombre d'évènements acquis lors de la recherche de la MRD	70
2.3. LAIP au diagnostic.....	70
2.4. Analyse de la MRD (deux lecteurs indépendants)	71
2.5. Comparaison aux résultats de biologie moléculaire	78
2.6. Impact de l'hémodilution sur l'interprétation du résultat.	87
2.7. Comparaison de nos résultats de MRD à l'évolution clinique	88
DISCUSSION	92
1. Méthodologie.....	92
1.1. Choix du panel d'anticorps	92
1.2. Sensibilité et spécificité	94
1.3. Faisabilité	97
2. Résultats	97
2.1. Evaluation de la MRD en CMF	97
2.2. Comparaison de nos résultats à ceux de la biologie moléculaire.....	98
2.3. Comparaison de nos résultats de MRD à l'évolution clinique	100
3. Choix de la technique d'étude de la MRD	101
4. Evolution vers le NGS	104
5. Expression des résultats	104
CONCLUSION.....	107
ANNEXES	109
BIBLIOGRAPHIE	112

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Représentation de l'hématopoïèse physiologique et des différentes lignées (1)	7
Figure 2 : Lymphopoïèse T, communication entre les différents compartiments (3).....	8
Figure 3 : Migration cellulaire et maturation des cellules T intrathymiques (7).....	10
Figure 4 : La voie de signalisation Notch1 (8)	11
Figure 5 : Principes de la cytométrie en flux (39)	19
Figure 6 : Survie sans rechute en fonction du taux de MRD obtenu en fin de phase d'induction (1ère rémission) (43).....	21
Figure 7 : Incidence cumulée des rechutes en fonction de la MRD obtenue à J78. (49)	22
Figure 8 : Survie sans rechute (A) et incidence cumulée des rechutes (B) en fonction du taux de MRD obtenu en pré-greffe après traitement par chimiothérapie d'une première rechute. (54)	23
Figure 9 : Survie sans rechute en fonction du taux de MRD obtenu au moment de la greffe chez des patients adultes de haut risque, en première rémission complète. (55)	23
Figure 10 : Le TCR	25
Figure 11 : Représentation des gènes codant pour le TCR (57).....	25
Figure 12 : Représentation des réarrangements des gènes du TCR (57)	26
Figure 13 : Représentation des réarrangements des gènes codant pour les chaînes des immunoglobulines (58)	27
Figure 14 : Exemple d'un histogramme CD45/ SS obtenu à partir d'un prélèvement de moelle osseuse au diagnostic d'une LAL-T. (Avec K: fenêtre ciblant les blastes, et X: fenêtre ciblant les lymphocytes.)	38
Figure 15 : Variation de l'intensité d'expression de certains antigènes (CD99, TdT, CD34 et CD10) à J0, J8, J15 et J29 du traitement d'induction des LAL-T (66).....	40
Figure 16 : Rapport des moyennes de fluorescence du CD48 blastes / cellules T et NK au diagnostic d'une LAL-T (A) et lors du suivi de la MRD (B). (69)	41
Figure 17 : Exemple d'un histogramme obtenu lors du réglage des voltages pour le fluorochrome APC, et settings obtenus et utilisés pendant notre étude.	43
Figure 18 : Histogrammes obtenus lors de l'analyse des billes Flow Set avec les settings retenus	44
Figure 19 : Chevauchement des spectres de fluorescence des différents fluorochromes.	45

Figure 20 : Matrice de compensation retenue pour notre étude.....	45
Figure 21 : Exemples d'histogrammes time : acquisition homogène sur 300ms (A), et une acquisition atteignant le fond de tube (B)	47
Figure 22 : Elimination des doublets	47
Figure 23 : représentation de la procédure utilisée pour la discrimination des doublets (72)	48
Figure 24 : Sélection de la fenêtre "Cell" avec élimination des débris cellulaires	48
Figure 25 : différenciation des sous populations leucocytaires	49
Figure 26 : Cellules positives et négatives pour les marqueurs TdT, CD99 et CD3cyto.....	49
Figure 27 : sélection des blastes CD45 faibles	50
Figure 28 : exemple d'un masque d'analyse du diagnostic d'un patient pour la combinaison 1 intracellulaire.	51
Figure 29 : exemple d'un masque d'analyse du diagnostic d'un patient pour la combinaison 2 membranaire	52
Figure 30 : Exemple d'un cluster homogène (A) et d'un cluster hétérogène (B)	52
Figure 31 : Exemple d'un résultat de MRD sur un prélèvement au diagnostic.....	53
Figure 32 : Exemples de différents taux de MRD (A : point de rechute, B : point de suivi avec une MRD positive, C : point de suivi avec une MRD négative)	54
Figure 33 : Courbes de saturation obtenues pour les CD2-PE, CD4-PB, CD8-PC5.5, CD48-PB, CD16-APC, TdT-FITC et CD99-PE.....	59
Figure 34 : Marquage d'un sang normal par les anticorps de la combinaison 2	61
Figure 35 : Courbe linéarité : pourcentage de blastes mesuré en fonction du pourcentage de blaste théorique.....	62
Figure 36 : pourcentage de cellules mononucléées CD34+ pour chaque prélèvement et 6 moelles de référence	64
Figure 37 : « Merge » de 5 moelles normales analysé sur le masque d'analyse d'un patient, et MRD obtenue avec la combinaison 2	66
Figure 38 : Cluster obtenu lors de l'analyse des 4 moelles analysées en 1 seule moelle virtuelle, et cluster obtenu pour 1 moelle analysée individuellement après marquage par la combinaison 1	67
Figure 39 : Cluster obtenu lors de l'analyse des 5 moelles analysées en 1 seule moelle virtuelle, et cluster obtenu pour 1 moelle analysée individuellement après marquage par la combinaison 2	67
Figure 40 : Répartition du nombre de prélèvements en fonction du nombre de cellules analysées pour la recherche de MRD	70
Figure 41 : Répartition des pourcentages de MRD détectée avec la combinaison 1 par deux lecteurs différents.....	76
Figure 42 : Répartition des pourcentages de MRD détectée avec la combinaison 2 par deux lecteurs différents.....	76

Figure 43 : Interprétation biologique de la MRD pour les 26 prélèvements par deux lecteurs différents	77
Figure 44 : LAIP des blastes du patient 4, présence d'une double positivité CD4/CD8	80
Figure 45 : LAIP des blastes du patient 6.....	81
Figure 46 : MRD du prélèvement 6(J35)	82
Figure 47 : LAIP des blastes du patient 7	83
Figure 48 : MRD du prélèvement 7(J35)	83
Figure 49 : LAIP des blastes du patient 9.....	84
Figure 50 : MRD du prélèvement 9(J35)	85
Figure 51 : LAIP des blastes du patient 11	86
Figure 52 : Pourcentage de cellules mononucléées CD34+, avec en rouge les résultats faussement négatifs, et en vert le prélèvement faussement positif	87
Figure 53 : Pourcentage de patients présentant un facteur de risque donné en fonction de son taux de MRD et pour les patients rechuteurs	91

Tableaux

Tableau 1 : Principales mutations rencontrées dans les LAL-T, leur fréquence en fonction de l'âge et leur impact pronostic	17
Tableau 2 : Classification EGIL des LAL-T (38)	18
Tableau 3 : Point(s) de suivi pour la recherche de la MRD pour chaque patient (avec M : nombre de mois depuis le diagnostic).....	34
Tableau 4 : Constitution des 2 combinaisons d'anticorps de notre panel.....	37
Tableau 5 : Seuils de détection techniques en fonction du nombre d'évènements et du nombre de cellules analysées.	57
Tableau 6 : Composition des tubes utilisés pour la détermination des concentrations minimales saturantes (exemple du CD16-APC).....	58
Tableau 7 : Concentrations recommandées par le fournisseur pour notre panel (noir) et concentrations retenues (orange) pour le tube membranaire.....	60
Tableau 8 : Concentrations recommandées par le fournisseur pour notre panel (noir) et concentrations retenues (orange) pour le tube intracellulaire.....	60
Tableau 9 : Pourcentage de blastes théorique et mesuré	62
Tableau 10 : Nombre absolu et pourcentage de cellules CD34+ pour chaque prélèvement et 6 moelles de référence	63
Tableau 11 : Valeurs de références obtenues avec la combinaison intracellulaire pour les différents LAIP ..	68

Tableau 12 : Valeurs de références obtenues avec la combinaison membranaire pour les différents LAIP..	69
Tableau 13 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube intracellulaire des patients 1 à 8	72
Tableau 14 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube intracellulaire des patients 8 à 14	73
Tableau 15 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube membranaire des patients 1 à 8	74
Tableau 16 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube membranaire des patients 8 à 14	75
Tableau 17 : Interprétation biologique des 26 MRD analysées par CMF et biologie moléculaire (en surligné les résultats discordants).....	79
Tableau 18 : Principaux avantages et inconvénients de la biologie moléculaire et de la CMF pour l'étude de la maladie résiduelle (50)	108

ABREVIATIONS

AA700 ou **AA750** : Allophycocyanine-Alexa fluor 700 ou 750

APC : Allophycocyanine

BM : Biologie Moléculaire

CD : Cluster de Différenciation

CMF : Cytométrie en flux

CMP : Progéniteur myéloïde commun

CLP : Progéniteur lymphoïde commun

CSH : Cellule souche hématopoïétique

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DN : Double Négatif

DP : Double Positif

ECD : Electron coupled Dye

EDTA : Acide Ethylène Diamine tétraacétique

EGIL : European Group for the Immunological Characterization of Leukemias

ELP : Early Lymphoïd Progenitor

EORTC : European Organisation for Research and Treatment of Cancer

ETP : Early Thymic Progenitor

FAB : French American British

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FITC : IsoThyocyanate de FluoresCéine

FS : Forward Scater

IC 95% : Intervalle de confiance à 95%

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

KO : Krome Orange

LAIP : Leukemia-associated Aberrant ImmunoPhenotype

LAL : Leucémie Aiguë Lymphoïde

LAM : Leucémie Aiguë Myéloïde

LCR : liquide céphalo-rachidien

MFI : Mean Fluorescence Intensity

MO : Moelle Osseuse

MPP : MultiPotent Progenitor

MRD : Minimal Residual Disease

NGS : New Generation Sequencing

NH4Cl : Chlorure d'ammonium

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PB : Pacific blue

PBS : Phosphate Buffer Saline

PC5.5 ou **PC7** : Phycoérythrine-Cyanine 5.5 ou 7

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : PhycoErythrine

PMT : Photomultiplicateur

RC : Rémission Complète

SS : Side Scater

SVF : Sérum de Veau Foetal

RT-PCR : Real Time Polymerase Chain Reaction

SAB : Sérum Albumine Bovine

SP : Simple Positif

TCR : T Cell Receptor

TdT : Terminal Deoxynucleotidyl Transferase

VHR : Very High Risk

WHO : World Health Organization

GENERALITES

1. Hématopoïèse et lymphopoïèse T

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production continue et régulée des éléments figurés du sang (polynucléaires neutrophiles, polynucléaires basophiles, polynucléaires éosinophiles, lymphocytes, monocytes, hématies et plaquettes). Toutes les cellules du sang dérivent de la cellule souche hématopoïétique (CSH) localisée dans la moelle osseuse.

Les cellules souches possèdent à la fois un potentiel d'auto-renouvellement et un potentiel de différenciation qui leur permet de générer des cellules sanguines matures (1).

Les CSH constituent 0,05% des cellules de la moelle osseuse. On différencie 3 types de CSH :

- Les CSH avec renouvellement à long terme (LT-HSC), qui s'auto-renouvellent de façon illimitée tout au long de la vie de l'individu, reconstituant et pérennisant l'hématopoïèse physiologique,
- Les CSH avec renouvellement à court terme (ST-HSC) capables d'auto-renouvellement mais pour une durée limitée d'environ 8 semaines,
- Les progéniteurs multipotents (MPP), qui ont perdu leur potentiel d'auto-renouvellement, mais qui possèdent des capacités mitotiques et de différenciation élevées.

Selon le modèle stochastique le plus couramment admis, les LT-HSC se différencient en ST-HSC qui elles-mêmes donnent naissance aux MPP. Au fur et à mesure de cette maturation, les cellules perdent leur potentiel d'auto-renouvellement, mais leur activité mitotique augmente. Les MPP vont se différencier en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), qui vont eux même se différencier pour aboutir aux cellules matures.

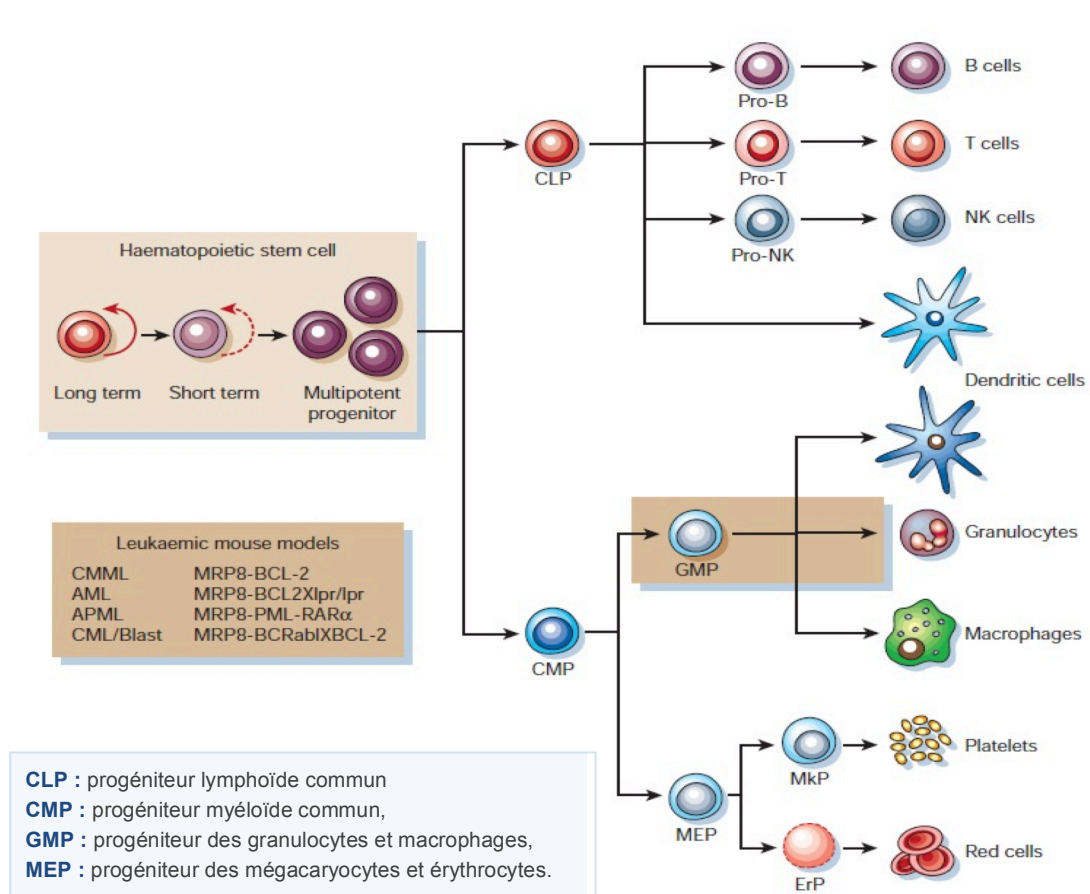


Figure 1 : Représentation de l'hématopoïèse physiologique et des différentes lignées (1)

Ce travail portant sur les leucémies aigues lymphoblastiques T, seule la lymphopoïèse T sera développée.

1.1. La lymphopoïèse T

Les lymphocytes T perdus au fur et à mesure de la vie doivent être continuellement remplacés. La lymphopoïèse T a lieu dans le thymus ; cependant le thymus ne contient pas de progéniteurs lymphoïdes capables d'auto-renouvellement : en effet, le thymus importe de façon semi-continue des MPP issus de la moelle osseuse (2).

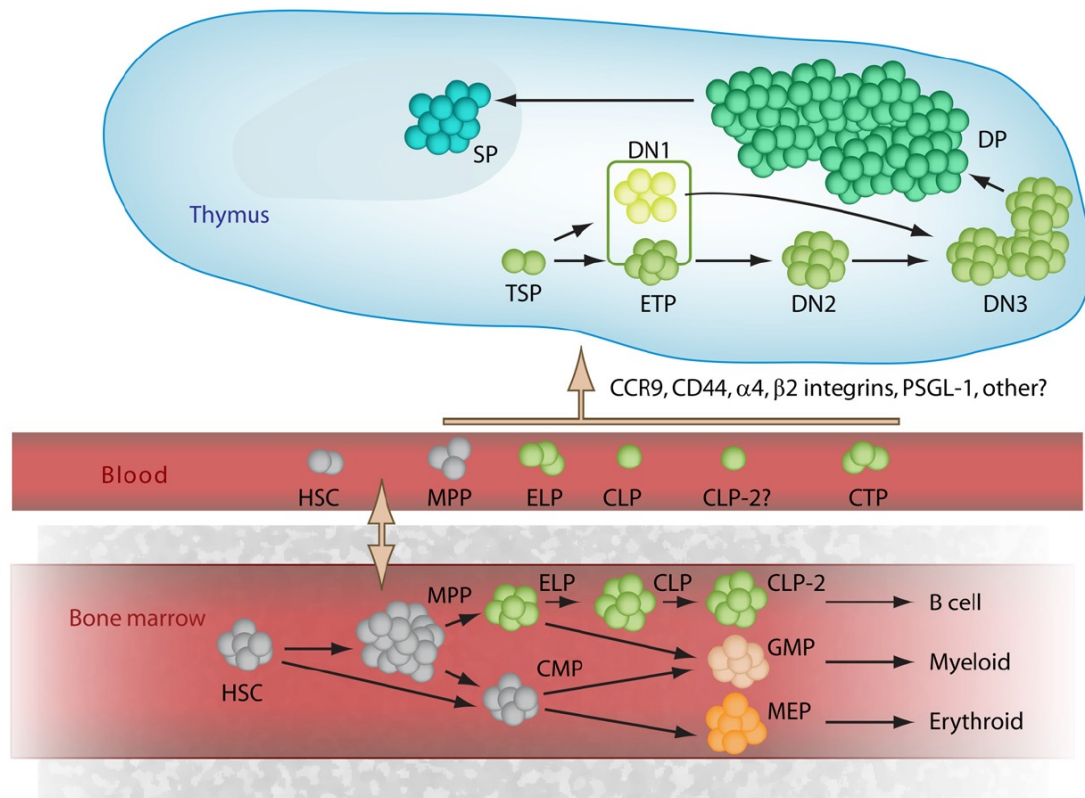


Figure 2 : Lymphopoïèse T, communication entre les différents compartiments (3)

1) Dans la moelle osseuse

Dans la moelle osseuse, les cellules souches vont donner naissance aux MPP qui se différencieront soit en CMP, soit en ELP (early lymphoid progeniteur).

Les ELP dérivent des MPP qui expriment fortement le Flt3 (MPP-Flt3^{hi}) et vont activer la transcription des gènes RAG.

Les ELP se différencieront à leur tour en CLP, puis en CLP2 ; les CLP2 restant dans la moelle osseuse vont donner naissance aux cellules B matures.

Une fraction de cellules progénitrices quitte la moelle osseuse pour le sang, avec pour objectif de gagner le thymus sous l'influence de signaux de domiciliation, afin de poursuivre la différenciation lymphoïde vers la voie T (3).

2) Dans le sang

Les principales cellules progénitrices médullaires qui vont circuler dans le sang sont les CSH, les ELP et les CLP.

Les progéniteurs intra-thymiques étant dépourvus d'un potentiel d'auto-renouvellement sur le long terme, la production des cellules T matures dépend du recrutement intra-

thymique de progéniteurs circulant dans le sang. On observera donc 2 phases de migration de ces progéniteurs : d'abord de la moelle osseuse vers le sang périphérique, puis du sang au thymus. Les mécanismes de régulation de ce processus de migration vers le thymus sont encore peu connus, mis à part le besoin de molécules comme le CCR9, le CD44, l' $\alpha 4$ et la $\beta 2$ intégrine qui participe au phénomène de domiciliation intrathymique.

3) Dans le thymus

Les progéniteurs vont entrer dans le thymus au niveau de la jonction cortico-médullaire. S'en suit une série d'étapes de différenciation, pour aboutir à la production de cellules simples positives matures (3–6).

- Les ETP (Early Thymic Progenitor, également nommés DN1 ou TN1) représentent le premier stade de différenciation intra-thymique. Leur phénotype est ckit+ CD44+ CD25-. Ils sont retrouvés au niveau de la jonction cortico-médullaire pendant environ 10 jours, temps pendant lequel ils subissent une intense prolifération. Ces ETP vont se différencier en progéniteurs DN2 (Double Négatif),
- Les DN2 vont quitter la jonction cortico-médullaire pour migrer vers le cortex interne où elles résident pendant 2 jours. Les cellules gagnent l'expression du CD25. On détecte dans ces cellules des réarrangements des gènes gamma et delta du TCR,
- Les DN2 vont se différencier en DN3 (ckit+ CD44- CD25+) et migrer dans le cortex externe. Les cellules DN3 ne possèdent plus qu'un potentiel de différenciation T et expriment un pré-TCR en surface,
- Les cellules DN3 vont subir une sélection positive et acquérir le CD4 et le CD8. Elles vont ainsi devenir des cellules doubles positives (DP) CD4+ CD8+,
- S'en suivra une étape de sélection négative pour aboutir aux cellules T matures simple positives (SP) CD4+ ou CD8+. Ces cellules SP quitteront le thymus pour le sang où elles exerceront leurs fonctions immunitaires.

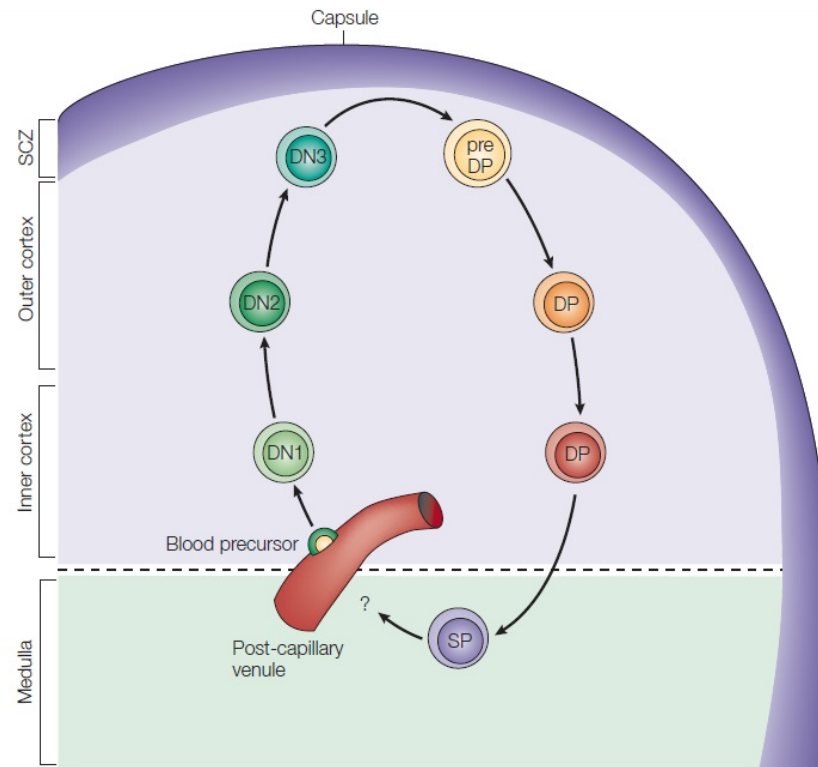


Figure 3 : Migration cellulaire et maturation des cellules T intrathymiques (7)

Toutes ces étapes de différenciation et maturation intra-thymiques sont dépendantes et contrôlées par différents signaux. Le microenvironnement thymique va orienter les progéniteurs multipotents vers le lignage T et, simultanément, induire et contrôler de multiples processus comme la prolifération, les réarrangements somatiques des gènes du TCR, les sélections positive et négative, et l'orientation vers le phénotype CD4 ou CD8. Relativement peu de signaux issus du microenvironnement thymique ont été identifiés, les plus importants étant ceux liés au couple récepteur Notch / Notch ligand. Ont également été identifiés les cytokines IL7 et le ligand kit, et les protéines MHC qui interviennent respectivement dans la prolifération, la survie et dans la sélection positive et négative (2).

1.2. Voie de signalisation Notch

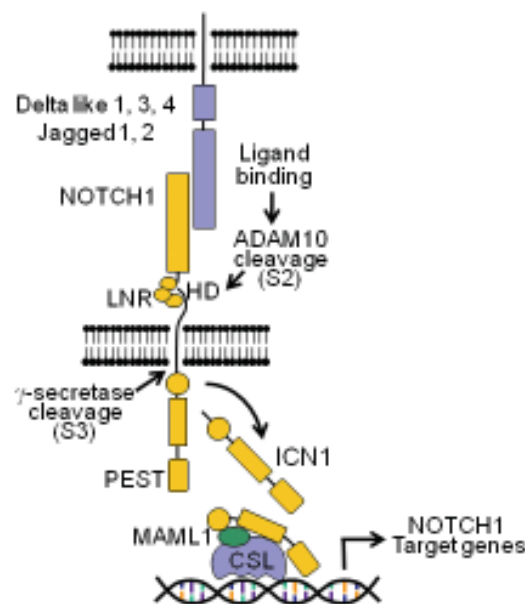


Figure 4 : La voie de signalisation Notch1 (8)

Le récepteur Notch1 est composé de plusieurs domaines :

- Un domaine N terminal extracellulaire (N^{EC}) qui comprend un domaine LNR,
- Un domaine C terminal trans-membranaire et intracellulaire (N^{TM}).

Les parties N^{EC} et N^{TM} sont associées dans le récepteur au repos via des domaines associés en hétérodimères (HD).

Lorsque le ligand DI4 se fixe sur la partie extracellulaire du récepteur NOTCH1 il se produit un changement de conformation du domaine LNR, une dissociation des sous-unités HD qui permet l'exposition d'un site de clivage dans la partie C terminale de ces domaines HD. Ce clivage protéolytique, dans un premier temps par la protéine ADAM puis par le complexe gamma-sécrétase, permet le relargage de la partie intracellulaire de Notch1 appelée ICN1 qui va migrer dans le noyau. Dans le noyau, ICN1 va former un complexe transcriptionnel avec la RBPJ/CSL ADN binding protein, recruter des co-activateurs de la famille MAML1, pour enfin activer la transcription des gènes cibles de Notch1 (8).

1.3. Rôle du récepteur Notch dans la lymphopoïèse

La famille des récepteurs Notch comprend 4 récepteurs : Notch1 à 4. Les ligands du récepteur Notch sont delta like1, 3 et 4 (DI1, DI3 et DI4) et Jagged 1 et 2. DI4, exprimé sur l'épithélium thymique, possède une plus forte interaction avec Notch1 que DI1. Seul le

couple récepteur Notch1/ ligand DI4 possède un rôle primordial dans le développement T intra-thymique.

Le récepteur Notch1 possède plusieurs rôles :

- Un rôle précoce dans l'orientation vers la lignée T. L'ARNm de Notch1 est exprimé dans les CSH, les MPP, les ELP et les CLP. Une première expérience menée par Radtke (9) inactivant le gène DI4 dans une lignée de souris transgéniques a démontré le blocage du développement cellulaire T au stade DN1 et un développement ectopique intra-thymique de cellules B. A l'inverse, Tanigaki a démontré que des souris immunodéficientes exprimant constitutionnellement une forme activée de Notch1 présentent un développement ectopique de cellules T dans la moelle osseuse et sont incapable de produire des cellules B (10),
- Un rôle dans la progression de la maturation T. Cette interaction DI4/Notch1 est très importante aux stades DN1, DN2 et DN3 de la lymphopoïèse T, elle est indétectable aux stades DP et SP,
- Le récepteur Notch participe à la régulation du réarrangement des gènes du TCR β ,
- Enfin, il régule la différenciation vers une cellule T $\alpha\beta$ ou $\delta\gamma$, puis vers une cellule CD4 ou CD8.

2. Leucémie aigue lymphoblastique T

2.1. Définition

Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) sont des hémopathies malignes résultant de l'expansion clonale de précurseurs lymphoïdes anormaux, appelés blastes, dans le sang périphérique, la moelle osseuse ou d'autres tissus (ganglions, rate, foie, système nerveux central). Ces lymphoblastes ont perdu leur capacité à se différencier normalement, et restent bloqués à un stade précoce de différenciation cellulaire. De plus, ils possèdent une capacité de prolifération exacerbée, ce qui va aboutir à l'inhibition de l'hématopoïèse normale et à une insuffisance médullaire. Dans le cas des LAL-T la leucemogénèse est secondaire à la transformation de thymocytes immatures secondaire à une oncogénèse multi-étapes engendrées par des anomalies génomiques somatiques (11–13)

2.2. Diagnostic clinique et biologique

2.2.1. Signes cliniques

Au diagnostic, la moelle osseuse est généralement infiltrée par plus de 90% de blastes, en conséquence les 3 lignées hématopoïétiques médullaires (leucocytaire, plaquettaire et érythrocytaire) ont une production diminuée. Cliniquement, l'insuffisance médullaire se traduira par :

- Un syndrome anémique : pâleur, dyspnée d'effort, asthénie (tolérance variable),
- Un syndrome hémorragique : purpura pétéchiol et ecchymotique, hémorragies,
- Un syndrome infectieux lorsque la neutropénie est profonde.

Un syndrome tumoral est très fréquemment retrouvé dans les LAL. On retrouve des adénopathies superficielles ou profondes, une splénomégalie, et une hépatomégalie. La présence d'un syndrome tumoral médiastinal peut être responsable de symptômes cardiorespiratoires (par compression de la veine cave), et oriente fortement vers une LAL-T.

Cinq à 10% des cas de LAL vont présenter au diagnostic un envahissement méningé (céphalées, paralysie d'un nerf crânien) (14). Une atteinte neurologique constitue un facteur de mauvais pronostic.

2.2.2. Diagnostic biologique

L'hémogramme est l'examen de première intention. Il permet la mise en évidence des cytopénies (neutropénie, anémie, thrombopénie) et la présence de blastes circulants. En présence de telles anomalies, un myélogramme doit être réalisé.

Le myélogramme permet une étude cyto-morphologique des cellules de la moelle osseuse après coloration de May Grunwald Giemsa. Il permet le diagnostic positif de leucémie aiguë, défini par la présence de plus de 20% de blastes (selon les critères OMS). L'infiltrat médullaire des LAL est souvent massif (>90%), et est composé de blastes dépourvus de granulations cytoplasmiques. Associée aux critères morphologiques, une étude des caractères cytochimiques (myélopéroxydase et estérase) permet d'écarter l'origine myéloïde des blastes, les lymphoblastes étant négatifs pour ces deux cytochimies. L'étude cytologique permet une classification des LAL en LAL1, LAL2, LAL3 selon FAB mais cette classification est devenue cliniquement obsolète et n'est plus utilisée.

L'immunophénotypage sur moelle osseuse est un complément indispensable au myélogramme. Il permet d'affirmer l'origine lymphoïde ou myéloïde des blastes, ce qui n'est pas toujours évident avec les seules cytologie et cytochimies (cas des LAM0 par

exemple). En cas de LAL il permet d'affilier les blastes à la lignée lymphoïde B ou T. En fonction des marqueurs présents il permet une classification des LAL selon l'EGIL qui est fonction du stade de maturation, que ce soit pour les LAL-B ou les LAL-T. Enfin, il permet la mise en évidence de marqueurs aberrants qui permettront de définir le profil immunophénotypique du clone leucémique, ce qui permettra de suivre l'évolution de la maladie par mesure de la maladie résiduelle.

Le caryotype et la FISH permettent la mise en évidence d'anomalies chromosomiques. La FISH est réalisée en complément du caryotype pour mettre en évidence des anomalies invisibles sur le caryotype. Dans le cadre des LAL-B, la présence ou non d'anomalies chromosomiques permet d'établir une classification des leucémies selon l'OMS 2008.

La biologie moléculaire : la PCR va permettre de mettre en évidence des anomalies restées indétectables sur le caryotype et en FISH. Dans le cadre des LAL, on recherche la présence de transcrits de fusion, de réarrangements des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines, de réarrangements des gènes des chaînes gamma et delta du TCR et enfin de mutations d'oncogènes. La présence de ces anomalies permet d'affirmer le caractère clonal de la prolifération lymphoïde, et permet d'identifier les marqueurs moléculaires qui permettront le suivi de la maladie résiduelle en biologie moléculaire.

2.3. Epidémiologie et facteurs de risque

2.3.1. Incidence

Chez l'adulte les LAL sont peu fréquentes. Elles représentent 15% des leucémies, et sont plus fréquentes chez les hommes avec un sex-ratio égal à 1,4. La fréquence augmente avec l'âge, plus de la moitié des cas surviennent entre 50 et 70ans (14). Chez l'adulte, 25% des LAL sont des LAL-T (15).

Chez l'enfant, la leucémie aigue lymphoblastique est le cancer le plus fréquent, représentant un tiers des cancers et plus de 80% des leucémies de l'enfant. Environ deux tiers des cas surviennent entre 2 et 6 ans, avec un pic d'incidence entre 3 et 4 ans. Comme pour l'adulte, elle touche préférentiellement les garçons (14). Chez l'enfant, seuls 15% des LAL sont des LAL-T. Les LAL-T sont plus fréquentes chez l'adolescent que chez le jeune enfant. (15). En effet, l'incidence des LAL-T est de 7% entre 1 et 10 ans, 14% entre 10 et 15 ans, et de 29% entre 15 et 18 ans (16). Malgré de récentes avancées concernant le traitement, la LAL reste une cause majeure de mortalité due aux cancers chez l'enfant. Elle représente en effet la deuxième cause de décès par maladie chez les enfants de 1 à 15 ans (17).

2.3.2. Pronostic

Dans les LAL (B et T) on observe une rémission complète dans plus de 95% des cas chez l'enfant, et entre 70 et 90% des cas chez l'adulte. Cependant, seuls 30 à 40 % des adultes et 80% des enfants présentent une survie à 5 ans sans rechute et sont considérés comme guéris.

En cas de LAL-T, on observe une survie à 5 ans sans rechute chez 75% des l'enfant, et chez 50% des adultes (8).

2.3.3. Facteurs de risque

On distingue les facteurs de risque intrinsèques, liés au patient, des facteurs environnementaux.

Les facteurs de risque intrinsèques sont l'âge, le sexe (garçon), le terrain génétique (trisomie 21).

Parmi les facteurs de risque environnementaux on retrouve les toxiques (benzène, oxyde d'éthylène), les rayons ionisants, les pesticides, et certains virus.

2.4. Facteurs pronostiques

1) L'âge

L'âge est un facteur pronostic majeur, tant en terme de taux de rémission qu'en durée de rémission complète. Chez l'adulte, plus l'âge au diagnostic est élevé, moins le pronostic est favorable. En effet, les patients de plus de 50 ans ont un taux de survie à 3 ans de 20% (14). Chez l'enfant, les LAL survenant avant l'âge de 1 an ont un pronostic défavorable. On considère que les LAL sont de pronostic plus favorable entre 1 et 10 ans. Les leucémies congénitales ont dans tous les cas une évolution défavorable.

2) La clinique

La présence d'un syndrome tumoral ou d'une atteinte neurologique est associée à un mauvais pronostic.

3) La leucocytose

Dans les LAL-B, une hyperleucocytose supérieure à 30G/L est retenue comme un facteur de mauvais pronostic, reflétant une masse tumorale plus importante. Une leucocytose supérieure à 100G/L représente un deuxième palier. Dans le cadre des LAL-T, l'impact pronostic de l'hyperleucocytose est moindre (18). En effet, une étude de la Nordic Society of Paediatric Haematology and Oncology (NOPHO) de 2010, a montré qu'une hyperleucocytose au diagnostic n'entraîne pas de différence significative en termes de

probabilité de survie sans événements à 10 ans, et que les patients entrant en rémission et ceux résistant à l'induction n'avaient pas de taux de leucocytes significativement différents au diagnostic. Par contre, une hyperleucocytose supérieure à 100 G/L au diagnostic était associée à une plus grande fréquence d'envahissement du système nerveux central au diagnostic, et à une probabilité de survie sans événements à 5 ans en cas de MRD à $J29 > 10^{-3}$ inférieure aux patients avec une leucocytose $< 100 \text{ G/L}$ (19).

4) L'immunophénotypage

Les LAL présentant des marqueurs T sont de plus mauvais pronostic que les LAL-B car elles sont plus souvent associées à une masse médiastinale et à un envahissement du SNC. L'immunophénotypage permet de différencier les LAL-T en fonction de leur stade de maturation (classification EGIL), et certains types sont connus comme ayant un plus sombre pronostic. C'était le cas des early T-cell (ETP)-LAL, stade de maturation précoce représenté par des blastes CD5 faible, CD8 et CD1a négatifs et exprimant au moins un marqueur myéloïde ou de cellule souche, et représentant 12 à 15% des LAL-T de l'enfant (18). En 2009, Coustan & al démontraient un pronostic très sombre pour les patients atteints d'ETP-LAL avec une survie globale à 10 ans de 19% (IC 95% 0-92) contre 84% (IC 95% 72-96) pour les autres types de LAL-T, et une survie sans rechute à 10 ans de 22% contre 69% ($p < 0,0001$) (20). Cependant, dans une étude de 2014, Patrick & al, ne retrouvaient pas de différence significative en terme de survie à 5 ans entre les patients ETP-LAL et les autres types de LAL-T (21,22).

5) Cytogénétique et biologie moléculaire

De nombreuses anomalies ont été décrites dans les LAL-T et LAL-B. Elles sont de bon ou mauvais pronostic, et leur fréquence varie en fonction de l'âge du patient. Dans tous les cas ce sont ces altérations génomiques somatiques qui conduisent à la leucemogénèse via l'activation d'oncogènes, la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeur et l'activation de la voie de signalisation cellulaire NOTCH1/FBXW7 (23–25). Ces anomalies peuvent être divisées en deux groupes :

- Le type A qui conduit à un blocage de la différenciation lymphoïde T,
- Le type B qui, par des mécanismes de type gain de fonction, active la capacité de la cellule tumorale à entrer en cycle, maintient ses capacités d'auto-renouvellement et facilite sa prolifération, essentiellement via l'activation de la voie de signalisation pré-TCR ou par l'activation constitutive de protéine à activité tyrosine kinase (26).

Concernant les anomalies de type A dans les LAL-T, les gènes les plus fréquemment atteints sont : *HOX11* (ou *TLX1*), *HOX11L2* (ou *TLX3*), *TAL1*, *HOXA*. De manière intéressante les études de profil d'expression génique montrent que les LAL-T se divisent en trois grands clusters. Le premier est secondaire à une dérégulation des homéogènes de la famille Hox (*HOXA*, *TLX1* ou *TLX3*), le second est secondaire à une dérégulation de

TAL1 et enfin un cluster plus petit réunissant les LAL-T les plus immatures de type ETP (28,29).

Les anomalies impliquant le gène *HOX11* localisé en 10q24 sont retrouvées dans 8% des LAL-T de l'enfant, et sont le plus souvent dues à 2 translocations : t(7 ;10)(q34 ;q24) et t(10 ;14)(q24 ;q11) (18). Elles n'entraînent pas de différence significative en terme de taux de rémission complète, mais sont associées à un meilleur taux de survie globale, elles sont donc de bon pronostic (30).

Les anomalies impliquant le gène *HOX11L2* localisé en 5q35.1 sont retrouvées dans environ 20% des LAL-T et résultent souvent d'une translocation t(5 ;14)(q35;q32) (31). L'impact pronostic reste controversé, certaines études associant ces mutations à un mauvais pronostic (32), d'autres ne retrouvant pas de différence significative en terme de survie suivant le statut muté ou non de *HOX11L2* (33). Une hypothèse pour expliquer cette différence en terme d'impact pronostic serait la co-existence d'un transcrit NUP214-ABL1 qui serait le responsable de la rechute (18,33–35).

Les délétions interstitielles en 1p32 sont observées dans 30% des LAL-T dans la région codante du gène *STIL* (SIL). Elles entraînent l'expression d'un transcrit de fusion SIL-TAL (9 à 26% des LAL-T). Ces anomalies sont de bon pronostic (18,33–35).

Anomalie	Fréquence en fonction de l'âge	Pronostic
HOX11	8% enfants 33% adultes	bon
HOX11L2	20% enfants 5% adultes	■ Pas d'impact si isolé ■ Mauvais si + NUP214
SIL-TAL	58% enfants 33% adultes	bon
NOTCH1	50-60%	controversé

Tableau 1 : Principales mutations rencontrées dans les LAL-T, leur fréquence en fonction de l'âge et leur impact pronostic

En ce qui concerne les anomalies de type B, on distingue les mutations activatrices de la voie Notch1, les mutations affectant le contrôle du cycle cellulaire (*CDKN2A/2B*), les mutations touchant les voies de signalisation pré-TCR (principalement *FBXW7*, *RAS* et *PTEN*), *NF1* et enfin les activations de protéines à activité tyrosine kinase, principalement *FLT3* et plus rarement des protéines chimères type ETV6-ABL ou ETV6-JAK2 (26).

On observe une mutation activatrice du gène du récepteur Notch1 dans plus de 60% des LAL-T. Ces mutations touchent des domaines critiques responsables de la prévention de l'activation spontanée de Notch1 en l'absence de ligand, elles entraînent donc de hauts

niveaux de signalisation Notch1. Elles ont lieu le plus fréquemment dans les exons 26 et 27 (40% des LAL-T) (8).

L'impact pronostic des mutations de *Notch1* est controversé (8). En effet, une étude de Breit (36) les retrouve de bon pronostic, associées à des taux de MRD favorables et à une meilleure survie sans rechute, alors qu'une autre étude (34) menée sur 72 LAL-T pédiatriques ne retrouve pas de différence significative, suggérant que l'impact pronostic de ces mutations pourrait être influencé par le traitement. Cependant l'étude de l'impact des mutations de *NOTCH1* ne peut pas être efficiente si ne sont pas pris en compte les autres mutations de type B. C'est ainsi qu'une nouvelle classification pronostique des LAL-T, basée sur leur génétique plus complète, a été proposée récemment par Trinquand et al. Ainsi, il est montré que l'impact pronostic de *Notch1* est influencé par la présence de mutations des gènes *RAS* et *PTEN* : la présence d'une mutation de l'un de ces deux gènes est un facteur de mauvais pronostic même si *Notch1* est muté. Une mutation de *Notch1* est de bon pronostic si aucun de ces deux gènes n'est muté (37).

6) La réponse initiale au traitement

Elle est un facteur pronostic post traitement important. Pour l'évaluer on étudie :

- La corticosensibilité des lymphoblastes. Un patient est dit corticosensible si la blastose devient inférieure à 1G/L après 8 jours de corticoïdes et une injection de méthotrexate. Elle est évaluée par le myélogramme.
- La chimiosensibilité des blastes, définie par la disparition des blastes médullaires à J35 ou à J70 de chimiothérapie d'induction. Elle va être évaluée par l'étude de la maladie résiduelle.

2.5. Classification

L'ancienne classification FAB classant les LAL-T en LAL1, LAL2, LAL3 selon la taille des blastes n'est plus utilisée. Elle a été remplacée par la classification EGIL, se basant sur l'immunophénotypage des blastes et donc leur degré de maturation.

EGIL	CD3cyto	CD1a	CD7	CD3+/ CD1a-	CD2/CD5/CD8
T I (pro T)	+	-	+	-	-
T II (pré T)	+	-	+	-	+
T III (T corticale)	+	+	+	-	+
T IV (T mature)	+	-	+	+	+

Tableau 2 : Classification EGIL des LAL-T (38)

3. Cytométrie en flux

La cytométrie en flux permet d'analyser des cellules placées dans le flux d'un liquide de gainage passant une par une devant un faisceau laser.

L'interruption et la diffraction du faisceau laser par la cellule va permettre de détecter la taille et la structure de celle-ci. De plus, les cellules sont marquées par des anticorps couplés à des fluorochromes spécifiques d'antigènes d'intérêt exprimés par les cellules à étudier. Ces fluorochromes seront excités par les faisceaux lasers et émettront un spectre lumineux spécifique lors de leur relaxation, nous permettant d'étudier la présence ou l'absence d'un antigène, ainsi que son niveau d'expression.

Au total, pour chaque cellule passée en chambre d'analyse on obtient des informations sur sa taille, son niveau de granulosité et sur l'intensité de fluorescence de chaque fluorochrome testé (et donc le niveau d'expression de chaque antigène recherché).

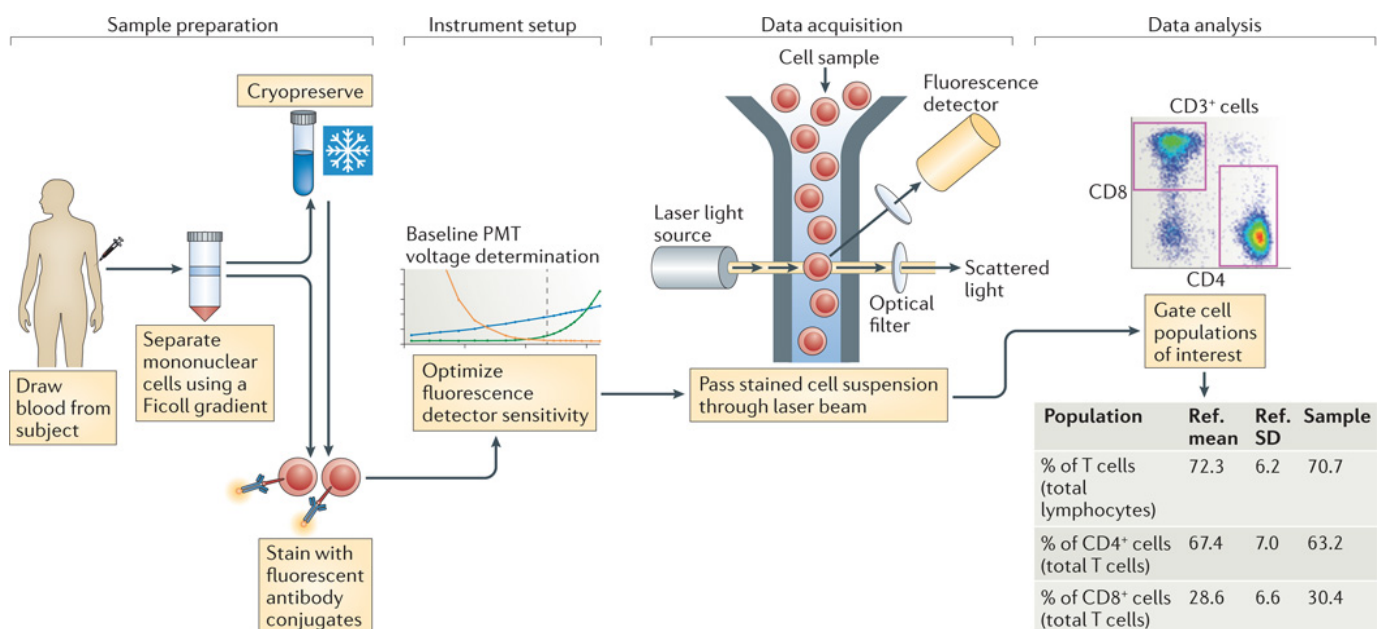


Figure 5 : Principes de la cytométrie en flux (39)

Dans notre laboratoire nous disposons de 2 cytomètres Navios® 10 couleurs 3 lasers de la société Beckman-Coulter.

4. La maladie résiduelle (MRD)

4.1. Définition et application clinique

Dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, l'objectif du traitement est d'éradiquer toutes les cellules leucémiques afin d'obtenir une rémission complète et d'éviter les rechutes. On distingue plusieurs niveaux de rémission :

- La rémission cytologique complète, définie par la présence de moins de 5% de blastes leucémiques sur le myélogramme et l'absence de leucémie extra-médullaire,
- La rémission moléculaire définie par l'indéetectabilité du réarrangement des gènes du TCR ou des immunoglobulines en biologie moléculaire.

Historiquement, l'objectif de la cure d'induction est l'obtention d'une rémission complète cytologique. Celle-ci est obtenue chez plus de 80% des patients atteints de LAL, cependant 20 à 30% des enfants ayant une LAL rechutent. Ceci s'explique par le fait que chez un patient déclaré en rémission complète cytologique il peut persister jusqu'à 10^{10} cellules leucémiques (40). Afin d'estimer le risque de rechute et d'adapter le protocole thérapeutique en fonction, de nombreux facteurs clinico-biologiques ont été utilisés (âge, taux de leucocytes au diagnostic, anomalie génétique) mais aucun n'est complètement fiable. Les rechutes étant dues à la persistance de cellules leucémiques résistantes à la chimiothérapie, de nouvelles techniques ont été développées pour estimer ce nombre de cellules leucémiques résiduelles et ainsi estimer le risque de rechute propre à chaque patient. La maladie résiduelle représente ce faible nombre de cellules leucémiques persistantes.

Depuis quelques années, l'étude de la réponse cellulaire au traitement par l'étude de la MRD, est donc devenue un outil important pour l'évaluation du pronostic individuel de chaque patient. En effet, plusieurs études ont démontré qu'une MRD positive en fin de phase d'induction, témoignant de l'absence de réponse, est en faveur d'un mauvais pronostic et est le facteur prédictif de rechute le plus fort, tandis qu'une clairance rapide du clone leucémique est prédictive d'un meilleur taux de survie sans rechute (41–45). La maladie résiduelle reflète la chimiosensibilité et est donc un facteur pronostic post-traitement, au même titre que la corticosensibilité évaluée cytologiquement au huitième jour de traitement.

De plus, les chimiothérapies étant associées à une mortalité élevée liée à leur toxicité, la prévention des rechutes est un élément essentiel de la prise en charge des LAL. L'intensité de traitement de chaque patient pourra être adaptée en fonction de son risque de rechute, celui-ci étant évalué par la MRD. Ainsi, un patient avec une MRD négative en fin d'induction pourra bénéficier d'une diminution des doses de chimiothérapie, réduisant ainsi la toxicité due aux chimiothérapies, alors qu'un patient avec une MRD positive

bénéficiera d'une phase de consolidation plus agressive afin de réduire le risque de rechute (42).

4.1.1. Différentes matrices biologiques et différents points de suivi

La maladie résiduelle est quantifiée dans la plupart des études sur un prélèvement de moelle osseuse, qui est le prélèvement de référence. Cependant, certaines équipes ont démontré que le suivi de la maladie résiduelle dans les LAL-T pouvait être effectué sur un prélèvement de sang périphérique sans qu'il ne soit observé de différence significative dans le rendu du résultat (46,47). Comme la plupart des équipes, notre laboratoire a choisi de travailler exclusivement sur des prélèvements de moelle osseuse.

La maladie résiduelle peut être évaluée à plusieurs moments du traitement : pendant la phase d'induction, en fin d'induction, en fin de consolidation, pendant la phase d'entretien, puis à la fin du traitement. Les temps de ces différents points de suivi varient en fonction des centres et des protocoles thérapeutiques.

Le risque de rechute est proportionnel au taux de MRD, surtout si celle-ci est évaluée pendant ou à la fin de la phase d'induction. C'est pourquoi beaucoup d'études évaluent l'impact pronostic du taux de maladie résiduelle à J15 et/ou J30. Le seuil clinique d'interprétation varie selon les équipes et les protocoles thérapeutiques utilisés. Pour le point de suivi à J35, le groupe de travail européen a retenu un seuil clinique d'interprétation de 1% pour les patients traités par le protocole EORTC. Une MRD positive au-delà de 1% à J35 est considérée comme un facteur de mauvais pronostic et est associée à un risque plus important de rechute, les patients initialement considérés comme non VHR passent alors dans le groupe VHR, et voient donc leur protocole thérapeutique s'intensifier (48). Si la MRD est inférieure à 1%, le patient est considéré comme chimiosensible, et une diminution d'intensité de la chimiothérapie est envisagée, réduisant ainsi la toxicité due aux chimiothérapies.

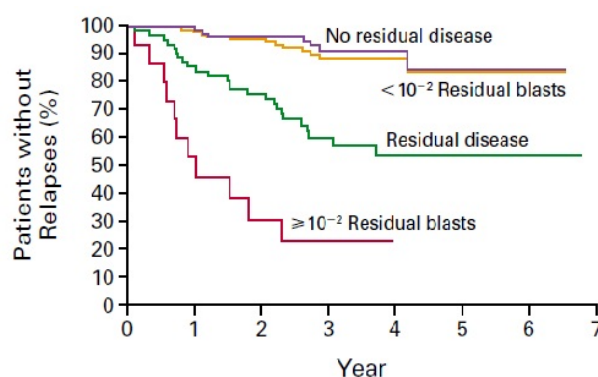


Figure 6 : Survie sans rechute en fonction du taux de MRD obtenu en fin de phase d'induction (1ère rémission) (43)

Un deuxième point de suivi est réalisé en fin de consolidation à J70, point de suivi à partir duquel la plupart des études retiennent un seuil de positivité à 0,1% (10^{-3}). En cas de MRD positive $> 10^{-3}$, une greffe de cellules souches sera indiquée. En cas de MRD positive mais $< 10^{-3}$, le patient bénéficiera d'une réinduction. Une MRD positive à J70 est prédictive d'un risque de rechute élevé.

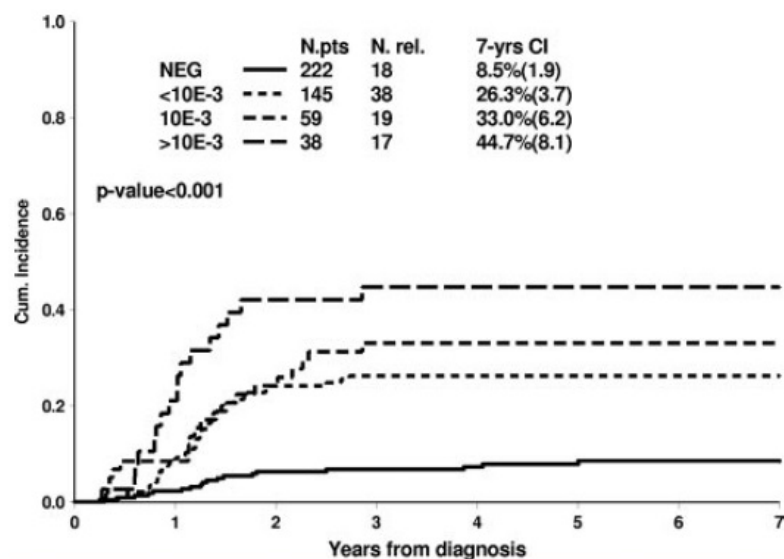


Figure 7 : Incidence cumulée des rechutes en fonction de la MRD obtenue à J78. (49)

Dans le service de pédiatrie du CHRU de Lille, la maladie résiduelle est évaluée à 2 moments clés du protocole thérapeutique : à la fin de la phase d'induction (J35), et à la fin de la phase de consolidation (J70). Dans le protocole EORTC 58081, la MRD à J35 entraîne un changement de bras vers le groupe de haut risque (VHR) en cas de MRD $>1\%$.

Concernant les patients adultes, le protocole de traitement GRAALL 2005, n'utilisait pas encore la quantification de la maladie résiduelle. Une stratification en fonction de la MRD est en cours d'évaluation.

Certaines équipes utilisent la MRD pour choisir le traitement des patients qui entrent dans une seconde rémission clinique après une première rechute. Les patients avec une MRD négative ($<0,01\%$) bénéficieront d'une chimiothérapie, tandis que ceux avec une MRD positive seront éligibles à une greffe de cellules souches (50).

4.1.2. Maladie résiduelle et greffe

En cas de greffe de cellules souches hématopoïétiques, le taux de MRD pré-greffe est utilisé pour choisir la date de greffe la plus optimale. En effet, la MRD pré-greffe a un impact pronostic important en terme de survie, les patients avec une MRD pré-greffe positive ayant un risque plus important de rechute. En conséquence, des lignes

supplémentaires de chimiothérapie peuvent être entreprises afin de réduire au maximum le taux de MRD avant la greffe (50,51).

La MRD est également suivie après la greffe, une MRD positive en post-greffe étant associée à un risque de rechute plus important qu'en cas de MRD négative (52,53).

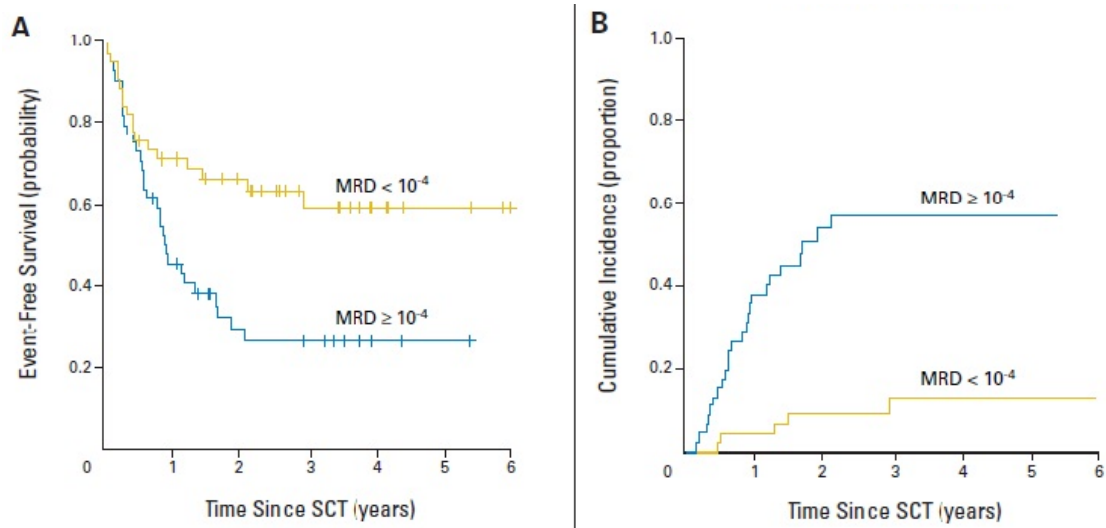


Figure 8 : Survie sans rechute (A) et incidence cumulée des rechutes (B) en fonction du taux de MRD obtenu en pré-greffe après traitement par chimiothérapie d'une première rechute. (54)

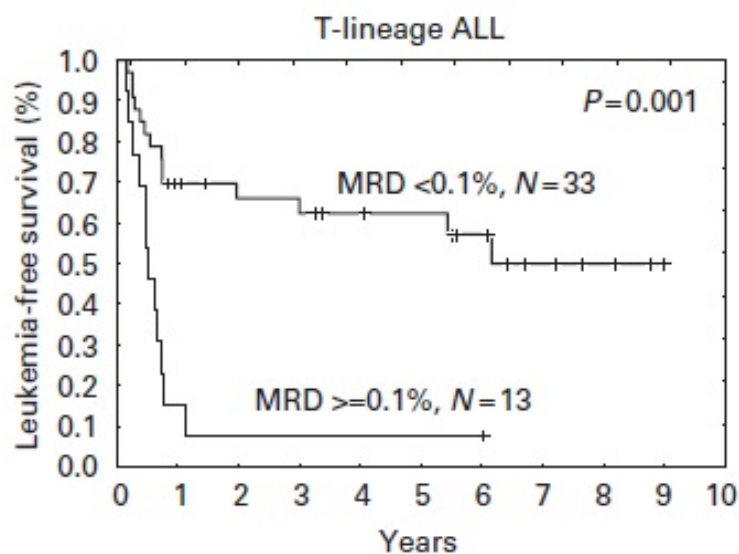


Figure 9 : Survie sans rechute en fonction du taux de MRD obtenu au moment de la greffe chez des patients adultes de haut risque, en première rémission complète. (55)

4.2. Moyens d'étude de la MRD dans les LAL

L'étude de la MRD est réalisée préférentiellement sur moelle osseuse, et fait appel à plusieurs techniques : la cytologique, basée sur la morphologie cellulaire, la cytométrie en

flux par la détection de populations « blastiques » avec expressions aberrantes d'antigènes et la biologie moléculaire basée sur la détection des réarrangements clonaux des gènes des immunoglobulines ou des TCR ou sur la recherche de transcrits de fusion. La difficulté dans l'étude la MRD est d'identifier de façon certaine un faible nombre de blastes leucémiques persistants dans une population importante de cellules normales. Ces 3 techniques n'ont pas la même sensibilité. Les évaluations par PCR ou CMF peuvent détecter 1 cellule leucémique parmi 10 000 à 100 000 cellules d'un échantillon, tandis que la cytologie ne permet pas d'atteindre une telle sensibilité (50).

4.2.1. L'étude cytologique

Lors des différents points de suivi de la MRD d'un patient, un frottis médullaire est en général envoyé au laboratoire d'hématologie afin de déterminer cytologiquement la présence ou l'absence de blastes résiduels. En effet, traditionnellement la réponse au traitement été évaluée par l'étude cytologique de la moelle osseuse. Cependant, la sensibilité de l'étude cytologique est limitée : pour être détectés avec certitude, les blastes leucémiques doivent représenter au moins 5% des cellules nucléées. Ainsi, chez un patient considéré en rémission cytologique complète par la présence de moins de 5% de blastes leucémiques résiduels peuvent persister 10^{10} cellules leucémiques (40).

Il a été démontré que des patients en rémission cytologique mais qui présentaient une MRD en post-induction, évaluée par PCR ou CMF, supérieure ou égale à 1%, avaient un pronostic similaire aux patients qui n'étaient pas entrés en rémission cytologique complète (56).

Outre sa faible sensibilité, un autre inconvénient de l'étude cytologique est que les lymphoblastes leucémiques peuvent être morphologiquement très proches et difficilement différenciables des hématogones (précurseurs lymphoïdes physiologiques) ou des lymphocytes matures activés. Cette distinction entre cellule normale et cellule leucémique dans la moelle osseuse peut s'avérer d'autant plus difficile qu'en sortie d'aplasie après l'arrêt de la chimiothérapie ou après une greffe, les hématogones peuvent représenter plus de 10% des cellules médullaires (51). C'est pourquoi d'autres techniques comme la cytométrie en flux et la biologie moléculaire ont été développées pour l'étude de la MRD.

4.2.2. La biologie moléculaire

Par PCR, 2 catégories de cibles permettent de distinguer les cellules leucémiques des cellules normales et donc de détecter la MRD :

- L'étude des gènes de fusion.
- Le réarrangement clonal des gènes codant les immunoglobulines et les TCR. (51)

1) Evaluation de la MRD par étude des réarrangements des gènes codant pour le TCR et les immunoglobulines :

La réponse immunitaire spécifique est possible grâce à la reconnaissance spécifique des antigènes par 2 types de récepteurs :

- Les immunoglobulines, présentes sous forme soluble (anticorps) et sous forme membranaire sur les lymphocytes B (BCR),
- Les TCR, récepteurs membranaires des lymphocytes T.

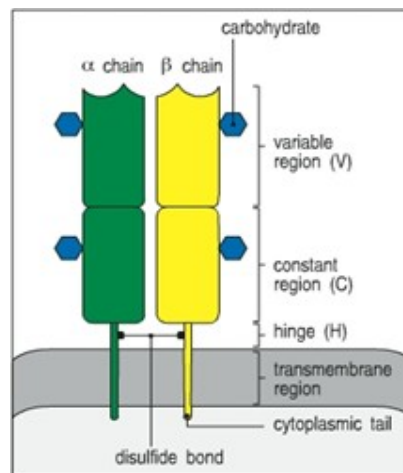


Figure 10 : Le TCR

Les TCR sont des hétéro-dimères. Ils sont composés de 2 chaînes, soit alpha et bêta, soit gamma et delta, chaque chaîne possédant une région constante et une région variable. Les chaînes α et γ sont codées par des gènes V, J et C ; les chaînes β et δ par des gènes V, D, J et C.

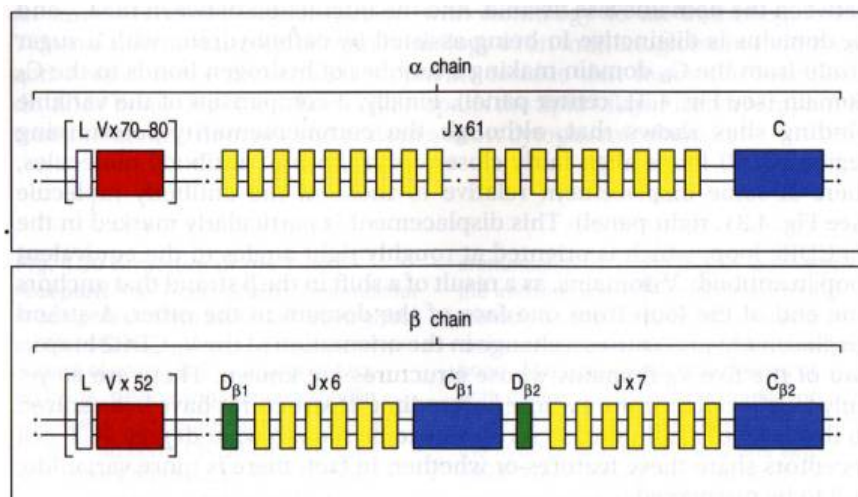


Figure 11 : Représentation des gènes codant pour le TCR (57)

Les gènes V, D et J sont composés de plusieurs segments. Au stade de maturation DN2, dans le thymus, les thymocytes vont subir un phénomène de réarrangement des gènes du TCR, appelé recombinaison aléatoire, avec des délétions ou insertions de nucléotides, créant un segment génique (et donc un TCR) unique, propre à une cellule lymphocytaire et à ses « descendants ».

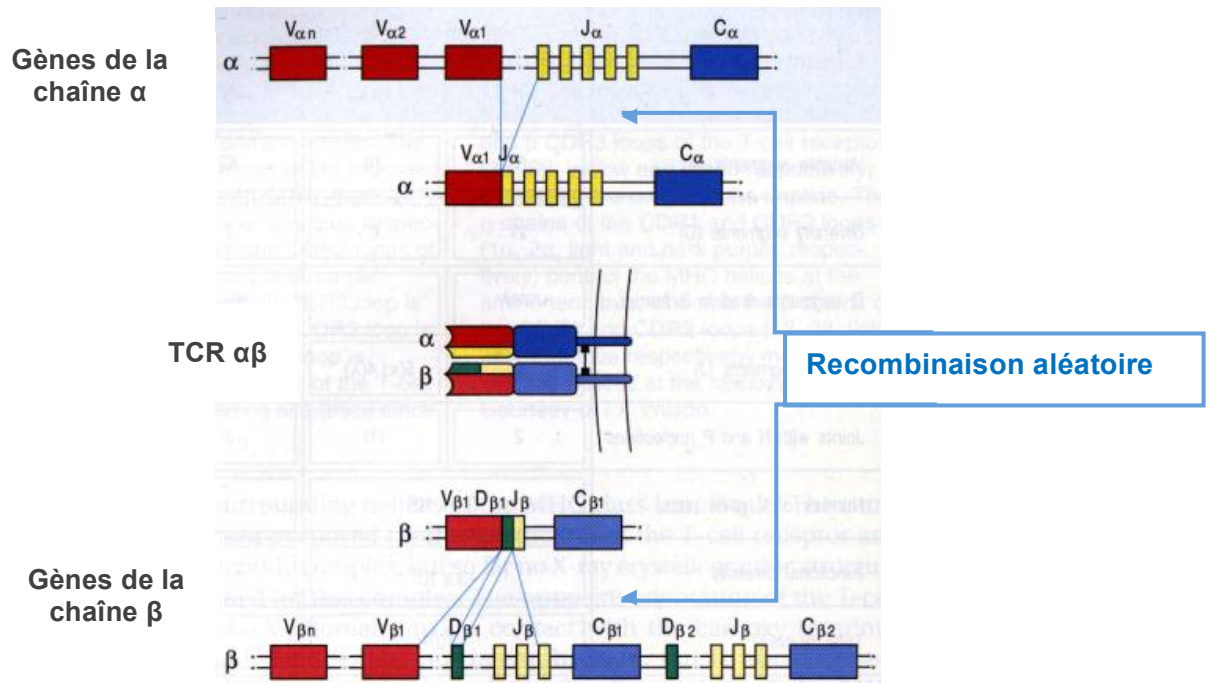


Figure 12 : Représentation des réarrangements des gènes du TCR (57)

Ces réarrangements permettront d'orienter les lymphocytes T dans différentes voies. En effet :

- 20% des thymocytes subiront un réarrangement des segments γ et δ pour donner les lymphocytes T- $\delta\gamma$ (expression d'un TCR associé au CD3 mais sans CD4 ni CD8),
- 20% subiront un réarrangement des segments α et β et deviendront des lymphocytes T NK exprimant un TCR $\alpha\beta$ associé au CD3, mais sans CD4 ni CD8,
- 60% deviendront des lymphocytes T « double-positifs » par réarrangement des segments α et β avec association d'un TCR $\alpha\beta$ aux CD4 et CD8. Ces 60% de thymocytes subiront une sélection positive au niveau du thymus afin d'éliminer les thymocytes reconnaissant les molécules de CMH du soi, puis ils perdront un des cluster de différenciation pour ne garder que le CD4 ou le CD8. Enfin ils subiront une sélection négative pour éliminer les lymphocytes qui reconnaissent les antigènes du soi. Ces lymphocytes T « double positifs » deviendront donc les lymphocytes T CD8 ou T CD4.

Ainsi, grâce à ces phénomènes de recombinaison aléatoire chaque lymphocyte T possédera un TCR unique qui lui est propre.

Les immunoglobulines sont composées de 2 chaînes lourdes (heavy) et de 2 chaînes légères (Light). Une chaîne lourde est elle-même composée d'une région variable V_H et d'une région constante C_H dont le nombre de domaines est fonction de l'isotype de l'immunoglobuline (IgG, IgA, IgE, IgM ou IgD). Les chaînes légères sont composées d'une région variable V_L , et d'une région constante C_L qui définit l'isotype kappa ou lambda.

La reconnaissance de l'antigène pathogène se fait au niveau des régions variables (paratope). Afin de pouvoir reconnaître toutes les structures antigéniques existantes, il va falloir une grande diversité du répertoire d'immunoglobulines. Comme pour le TCR, les gènes codants pour les immunoglobulines sont composés de plusieurs segments : V, D et J pour les gènes codants les chaînes lourdes, V et J pour les chaînes légères. Ces gènes vont subir au cours de la lymphopoïèse B un phénomène de recombinaison aléatoire similaire à celui survenant pour le TCR. Au total, plus de 10^9 combinaisons VDJ différentes peuvent être obtenues, créant chez l'individu sain une population lymphocytaire B polyclonale.

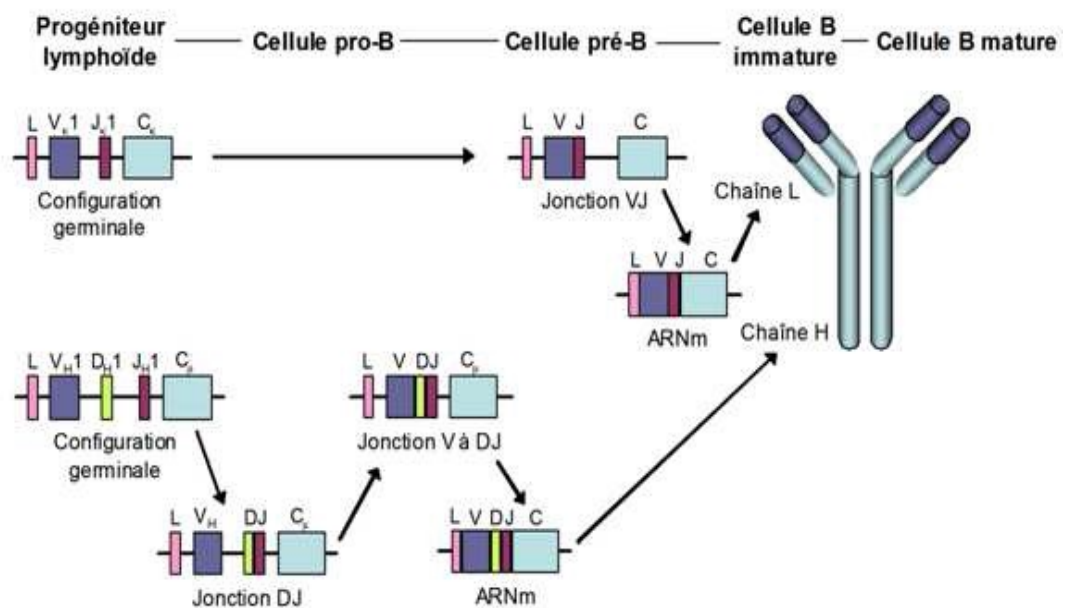


Figure 13 : Représentation des réarrangements des gènes codant pour les chaînes des immunoglobulines (58)

Chez un patient leucémique, les lymphoblastes dérivent de la transformation clonale d'un même précurseur lymphoïde, ainsi ils présenteront le ou les mêmes réarrangements de gènes, permettant d'affirmer la clonalité de la population. Dans les LAL-T, on retrouve un

réarrangement clonal du TCR dans la plupart des cas, cependant 20% des LAL-T présentent un réarrangement clonal du gène des immunoglobulines (51).

Au diagnostic, ces réarrangements des gènes des Ig ou du TCR seront recherchés par une PCR utilisant des primers des régions V et J. Une analyse par électrophorèse des produits de PCR permettra de voir s'il existe un réarrangement clonal, un ou plusieurs réarrangements peuvent être présents. Le cas échéant, les produits de PCR seront séquencés, ce qui permettra le « design » d'amorces spécifiques du (des) réarrangement(s) de chaque patient. Ces amorces spécifiques du patient permettront le suivi de la MRD (50).

L'analyse par PCR des gènes codant les Ig et le TCR permet de détecter 1 cellule leucémique parmi 10 000 à 100 000 cellules normales, soit une sensibilité de 10^{-4} à 10^{-5} .

L'amplification par PCR en temps réel des gènes des Ig et des TCR est une méthode fiable et précise pour mesurer la MRD. En effet, chaque cellule n'ayant qu'une copie du gène réarrangé, les produits de PCR sont donc directement proportionnels au nombre de cellules leucémiques. Cependant, des clones mineurs qui pouvaient être présents au diagnostic mais ne pas avoir été détectés peuvent devenir prédominants au cours de l'évolution de la maladie. Ces clones n'étant pas « designés », ils ne sont pas recherchés lors du suivi de la MRD, et des résultats faussement négatifs pourront être rendus. Pour ces raisons, il est recommandé d'utiliser plusieurs sondes permettant la détection de plusieurs réarrangements au diagnostic (51).

2) Evaluation de la MRD par recherche des transcrits de fusion :

Environ 40% des enfants et 50% des adultes atteints de LAL présentent un réarrangement chromosomique résultant en l'expression d'un transcrit de fusion (51). Les plus fréquemment retrouvés dans les LAL-T sont SIL-TAL1, SET-NUP214, NUP214-ABL1. (24,59,60). Ils aboutissent à l'expression de transcrits d'ARNm aberrants dans les cellules leucémiques (50).

La recherche des transcrits de fusions se fait par RT-PCR, avec une sensibilité de 0,01% à 0.001% (29,50). Un des avantages de l'étude des transcrits de fusion par PCR est l'association stable entre l'anomalie moléculaire et le clone leucémique, en comparaison avec la cytologie et la CMF où des variations cellulaires et immunophénotypiques peuvent apparaître après la chimiothérapie ou suite à une sélection clonale. De plus, il n'est pas nécessaire d'établir des amorces spécifiques au patient. En revanche, l'inconvénient est que le nombre de transcrits de fusion par cellule leucémique varie d'un patient à l'autre et donc il est impossible d'établir une relation précise entre le taux de produits de PCR et le nombre de cellules leucémiques (50,51). De plus, la fragilité de l'ARN engendre un risque d'échec technique.

4.2.3. La cytométrie en flux

L'étude de la MRD en cytométrie en flux est basée sur l'identification de marqueurs immunophénotypiques exprimés sur les cellules leucémiques mais pas sur les cellules normales. Contrairement à la cytologie, la CMF va donc permettre de différencier les blastes leucémiques des hémotogones et des lymphocytes activés. Aucun marqueur spécifique de blastes leucémiques n'a encore été trouvé. Cependant, depuis de nombreuses années il a été remarqué que les cellules leucémiques expriment de façon aberrante certains marqueurs, créant ainsi un immunophénotype aberrant spécifique du clone leucémique. Ces immunophénotypes aberrants sont retrouvés dans la littérature sous le terme de « Leukemia-associated aberrant immunophenotypes » ou LAIP (51).

On distingue 4 catégories de LAIP :

- **Les LAIP de type surexpression antigénique** comme pour les CD10, CD123 et CD58 dans les LAL-B, les CD99, CD7, et l'association CD4/CD8 dans les LAL-T.
- **Les LAIP de type diminution d'expression d'antigènes** comme pour les CD45, CD81, CD38 dans les LAL-B, et le CD2 et le CD45 dans les LAL-T.
- **Les LAIP de type asynchronisme** : certains marqueurs ne sont exprimés qu'à un stade de différenciation pendant le développement cellulaire normal. Par exemple les marqueurs de cellules immatures de la lignée T ne sont normalement retrouvés que sur les thymocytes qui ne sont jamais présents dans la moelle ou le sang. De plus, la co-expression d'antigènes spécifiques de cellules immatures comme le CD3 intracytoplasmique avec des antigènes de cellules matures de la même lignée comme le CD5, alors que le CD3 de surface est absent, est évocatrice de leucémie (CD5+/cCD3+/sCD3-).
- **Les LAIP de type infidélité de lignée** : co-expression aberrante d'antigènes de lignées cellulaires différentes. Par exemple, co-expression de marqueurs de lignée B et T (CD4 et CD 19), expression d'antigènes myéloïdes sur des lymphoblastes.

On pourrait également rechercher les expressions de protéines de fusion dérivées de translocations géniques, mais elle ne peut être réalisée en pratique en CMF du fait de l'absence d'anticorps monoclonaux dirigés contre ces protéines.

1) Démarche de l'étude de la MRD en CMF :

Au diagnostic, la cytométrie en flux va permettre de différencier les LAL-B des LAL-T, les lymphoblastes leucémiques exprimant des marqueurs spécifiques de la lignée B ou T. En fonction des marqueurs exprimés, la LAL pourra être classée en fonction de son stade de maturation selon l'EGIL. L'immunophénotypage sur la moelle va permettre de mettre en évidence un profil immunophénotypique exprimé par les cellules clonales du patient (LAIP), un immunophénotype leucémique suffisamment différent des cellules normales

avec une sensibilité de détection de 0,01% étant retrouvé dans environ 90 à 95% des cas de LAL (51,61,62).

Ultérieurement, aux différents points de suivi définis par le service, une étude de la MRD sera réalisée. Elle consiste à définir le nombre de cellules résiduelles présentant le LAIP parmi les cellules totales. Sa sensibilité dépendra de la spécificité de l'immunophénotypage et du nombre de cellules disponibles pour l'analyse, elle est en générale de 0,01%. En plus de permettre une étude de la MRD, la cytométrie permet d'analyser la maturation des cellules normales, de voir le degré de dilution de l'échantillon et le degré de régénération de l'hématopoïèse.

OBJECTIFS

La quantification de la MRD dans les hémopathies peut faire appel à différentes techniques. La biologie moléculaire est la technique la plus fréquemment utilisée par les équipes travaillant sur la MRD, aussi bien au niveau européen qu'international. Elle servira dans ce travail de technique de référence.

Cependant, la quantification de la MRD par technique de biologie moléculaire reste fastidieuse, coûteuse et n'est pas applicable à tous les patients, ce qui justifie le besoin d'évaluer les capacités d'autres techniques comme la CMF, d'autant plus que les cytomètres actuels permettent l'étude simultanée de 8 à 10 paramètres, donc l'étude d'un plus grand nombre d'antigènes et de LAIP.

L'objectif de mon travail est la mise en place, en pratique quotidienne, du suivi de la maladie résiduelle chez les porteurs de LAL-T par technique de cytométrie en flux multiparamétrique.

Pour atteindre cet objectif nous avons défini les étapes suivantes pour aboutir à la mise en place de l'analyse en routine :

- Détermination du panel d'anticorps adapté à l'étude de la MRD des LAL-T.
- Définition des conditions méthodologiques d'utilisation de ces anticorps.
- Etude de l'expression des marqueurs type LAIP par les cellules normales et détermination des valeurs « physiologiques » sur ces moelles normales.
- Mise en place d'une stratégie d'analyse et étude de la MRD sur 14 patients atteints de LAL-T.
- Comparaison à la technique de référence : la biologie moléculaire, et confrontation aux données cliniques.

PATIENTS, MATERIEL ET METHODES

1. Patients

Nous avons inclus dans notre étude tous les patients ayant eu un diagnostic de LAL-T au CHRU de Lille entre 2012 et 2015, et pour lesquels des cellules leucémiques médullaires congelées au diagnostic et en suivi étaient disponibles. Les patients ne s'étant pas opposés à la conservation des cellules par congélation au diagnostic, les prélèvements ont été conservés dans la cellulothèque des hémopathies malignes. Nous avons travaillé exclusivement sur des prélèvements médullaires.

Entre 2012 et juillet 2015, 16 patients présentant une leucémie aigüe lymphoblastique T ont été diagnostiqués au CHRU. Parmi ces 16 patients, nous disposions d'un prélèvement de moelle osseuse à la fois au diagnostic et à au moins un point de suivi de MRD pour seulement 14 d'entre eux. Seuls ces 14 patients ont été analysés dans nos résultats.

Les 2 patients pour lequel nous ne disposions que d'un prélèvement au diagnostic étaient 2 adultes de 22 et 34 ans.

Les 14 patients pour lesquels nous disposions de prélèvements au diagnostic et en suivi de MRD présentaient les caractéristiques suivantes :

- Age et sexe :
 - 2 de sexe féminin, 12 de sexe masculin,
 - 11 enfants de 3 à 17 ans, 3 adultes âgés de 19 et 57 ans.
- Traitement :
 - Concernant les enfants, tous étaient traités par le protocole EORTC 58.081, 6 dans le bras AR2-T, et 4 dans le bras VHR (1 patient est suivi à Reims, son traitement ne nous était pas communiqué),
 - Les 3 adultes étaient traités par le protocole GRAALL 2005.
- Immunophénotype :
 - Selon la classification EGIL : 3 LAL sont de type EGIL TII, 9 de type TIII, et 2 de type TIV.
- Caryotype et biologie moléculaire :
 - 1 patient (N°4) présente une fusion SIL-TAL,

- 2 patients ont un caryotype anormal avec trisomie 8 (N° 4 et 8),
 - 2 patients présentent une mutation du gène HOX11 (N° 10 et 14),
 - 4 patients présentent une mutation du gène HOX11L2 (N°3, 5, 7 et 11),
 - Le patient 11 présente également un transcrit NUP214-ABL,
 - Les patients 2 et 5 présentent une mutation WT1.
- Biologie moléculaire et MRD :
 - 1 patient (N°1) ne présente aucun marqueur permettant le suivi de la maladie résiduelle,
 - 6 patients peuvent avoir un suivi de leur MRD grâce à la présence d'un transcrit de fusion,
 - 13 patients peuvent avoir un suivi de leur MRD grâce à la présence de réarrangements des gènes du TCR et/ou des immunoglobulines.

Pour chaque patient nous avons recueilli les informations cliniques et biologiques au diagnostic, le traitement reçu et l'évolution de la maladie (rémission complète, rechute, décès). Ces données sont résumées en annexe 1.

2. Les prélèvements

L'étude a été menée sur les prélèvements des patients décrits ci-dessus.

Pour l'ensemble des 16 patients un prélèvement au diagnostic a été étudié. Seuls 14 patients ont pu bénéficier d'une quantification de la maladie résiduelle par cytométrie sur un ou plusieurs points de suivi.

Les échantillons congelés au diagnostic étaient composés de cellules mononucléées médullaires isolées par centrifugation sur un gradient de Ficoll® puis cryoconservées à -80°C dans une solution de cryopréservation (du Sérum de Veau Fœtal (SVF) additionné de 10% de DMSO). Dans la mesure du possible, les culots congelés présentaient une concentration de 10 millions de cellules par millilitre.

L'étude de la MRD a été effectuée sur des prélèvements congelés (selon le même protocole que celui décrit ci-dessus) dans 8 cas.

Six prélèvements au diagnostic et 18 MRD ont été réalisés sur des échantillons de moelle osseuse prélevée dans un tube EDTA, avec un marquage effectué sur moelle totale avec lyse des hématies dans les 24h suivant l'aspiration médullaire.

Au total nous avons pu étudier 16 échantillons de moelle au diagnostic (10 congelés et 6 moelles fraîches), et 26 échantillons de maladie résiduelle (dont 8 congelés, et 18 frais) correspondant à 14 diagnostics.

Dans la suite de ce travail nous ne parlerons que des 14 patients pour lesquels nous avons un prélèvement au diagnostic et au moins un point de suivi de MRD. Les quantifications de la MRD ont été réalisées à J35, J70 ou plus tard selon la disponibilité des prélèvements.

Patient	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Diagnostic	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MRD j35			x			x	x	x	x	x	x	x		x
MRD j70								x	x			x	x	
MRD autres	M20 M22	M24	M24	M5	M6	M5 M8 M11	M6,5 M9	M6			M4,5			

Tableau 3 : Point(s) de suivi pour la recherche de la MRD pour chaque patient (avec M : nombre de mois depuis le diagnostic)

3. Témoins

Nous avons utilisé 19 échantillons de sang périphérique provenant de patients adultes et non porteurs d'hémopathie afin de réaliser les mises au point techniques :

- Réalisation des courbes de saturation pour les anticorps nouvellement utilisés, et test du panel choisi avec les concentrations en anticorps ainsi optimisées,
- Réglage du cytomètre Navios® : détermination des settings et de la matrice de compensation.

Nous avons utilisé 1 échantillon de moelle osseuse congelé correspondant à un diagnostic de LAL T et un échantillon de moelle osseuse non envahie afin d'effectuer une gamme de dilution de maladie résiduelle dans le but d'évaluer la sensibilité de notre panel.

Enfin, nous avons voulu tester notre panel sur des moelles osseuses de référence afin de voir comment se comportaient nos anticorps en dehors d'un contexte de LAL-T. L'objectif était de voir si des cellules médullaires normales pouvaient exprimer certains marqueurs du LAIP de chaque patient, dans quelle proportion, et ainsi définir les valeurs

"physiologiques" (seuil de détection) de chaque LAIP. Pour cela, pour chaque patient un LAIP au diagnostic était déterminé, ensuite le nombre d'évènements identiques au LAIP était évalué sur chaque moelle normale, puis une moyenne du nombre d'évènements de toutes les moelles normales était calculée. Le seuil de détection du LAIP du patient, correspondant à la moyenne + 2 écart-type, était alors ainsi calculé.

Les échantillons de moelle osseuse parvenant dans le service de cytométrie en flux étant prélevés sur des patients atteints ou suspects d'hémopathies, il était difficile d'obtenir des moelles tout à fait normales. Nous avons donc décidé d'utiliser des moelles osseuses de patients non atteints d'hémopathie T et qui sortaient d'aplasie (prélèvements de MRD LAL-B, LAM) afin de se rapprocher le plus possible des prélèvements de MRD que nous analyserions par la suite.

4. Evaluation de l'hémodilution

Les microtraumatismes engendrés lors du geste de prélèvement médullaire peuvent provoquer des ruptures des vaisseaux capillaires, les cellules sanguines ainsi libérées, peuvent facilement être aspirées, contaminant le prélèvement de moelle, c'est ce que l'on appelle l'hémodilution. Lors de toute analyse de moelle osseuse, que ce soit en cytologie, en biologie moléculaire ou en CMF, il est primordial de savoir si l'échantillon sur lequel nous travaillons est de bonne qualité, c'est à dire représentatif du tissu médullaire (moelle osseuse peu diluée). L'hémodilution peut être évaluée de 3 façons :

■ Par la formule de Brooimans :

$$\left[1 - \left(\frac{\text{érythrocytes moelle}}{\text{érythrocytes sang}} \right) \times \left(\frac{\text{leucocytes sang}}{\text{leucocytes moelle}} \right) \right] \times 100$$

Plus le pourcentage est élevé, moins l'échantillon de moelle est contaminé par du sang. Au-dessus de 70%, le prélèvement de moelle est considéré comme pur et la MRD est interprétable. En dessous de ce seuil, le degré de dilution devient significatif et la MRD est ininterprétable (63).

Cette évaluation n'est possible qu'en cas de prélèvement traité à l'état frais, la congélation sur gradient de Ficoll® lysant les polynucléaires, le taux de leucocytes dans la moelle après décongélation ne représente que les cellules mononucléées, ce qui rend la formule de Brooimans inapplicable. Pour les prélèvements congelés nous avons donc évalué le degré d'hémodilution grâce à deux autres approches,

- **Par l'étude cytologique d'un frottis effectué à partir de la suspension cellulaire :**

Estimation de la richesse de la moelle osseuse, de la présence de mégacaryocytes, de plasmocytes et d'histiocytes.

- **Par une estimation de la représentativité du prélèvement par quantification en CMF de cellules uniquement médullaires :**

Les cellules de la MRD à mettre en évidence sont en très faible nombre et si le prélèvement est contaminé par du sang la probabilité de détecter ces cellules leucémiques est réduite. Pour qu'un échantillon soit considéré comme représentatif de la moelle, il faut donc y trouver des cellules médullaires non sanguines : plasmocytes, histiocytes, macrophages, ostéoclastes, blastes... Comme nous disposons dans notre panel du CD34 et du CD45, nous avons choisi d'évaluer la qualité du prélèvement sur le nombre de cellules CD34+ présentes (elles correspondent aux précurseurs hématopoïétiques qui sont presque exclusivement médullaires).

Nous avons déterminé sur plusieurs moelles de référence puis sur les échantillons de suivi de MRD le pourcentage et la valeur absolue des cellules CD34+.

5. Choix des anticorps

Pour choisir les anticorps qui allaient composer notre panel, il a fallu réfléchir à plusieurs contingences :

- Ils devaient nous permettre de différencier les cellules normales des cellules leucémiques. Le panel devait donc comprendre des anticorps dirigés contre des antigènes de cellules matures normales, contre des antigènes spécifiques d'immaturité et contre des marqueurs aberrants évoquant un LAIP. Il fallait que dans chaque tube on retrouve à la fois des marqueurs matures et des marqueurs immatures ou aberrants évocateurs de LAIP pour pouvoir différencier correctement les cellules normales des cellules leucémiques,
- Nous devons pouvoir classer la LAL-T selon la classification EGIL,
- Les combinaisons d'anticorps devaient être aptes à détecter 95% des LAIP de LAL-T,
- Il a fallu tenir compte du fait que la chimiothérapie peut engendrer des variations d'intensités d'expression de certains antigènes. Il ne fallait donc pas qu'un tube soit composé uniquement de ces antigènes dont l'intensité est variable, au risque de rendre un résultat de MRD faussement négatif,

- Il fallait limiter le nombre de tubes pour ne pas engendrer un coût et un temps technique trop importants,
- Enfin, nous avons estimé nécessaire qu'un tube soit composé exclusivement de marqueurs de surface afin d'éviter le biais lié à la perméabilisation.

Pour cibler les cellules T matures normales, nous avons choisi d'utiliser les CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 et CD8. Nous avons également choisi d'utiliser les CD16 et CD56 permettant de repérer les lymphocytes NK (CD56) mais qui peuvent aussi être des antigènes exprimés de façon aberrante par les cellules leucémiques T.

Concernant les marqueurs d'immaturité, nous avons opté pour les CD99, CD34, CD10, CD3 intracytoplasmique, et la TdT.

Notre panel était composé de deux tubes, une combinaison de marqueurs exclusivement membranaires et une combinaison comprenant également des marqueurs intracytoplasmiques :

fluorochrome	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA 700	AA 750	PB	KO
Tube 1	TDT	CD99	CD3c	/	CD5	CD1A	/	CD3	CD48	CD45
Tube 2	CD7	CD2	CD3	CD8	CD5	CD56-CD16	CD34	CD10	CD4	CD45

Tableau 4 : Constitution des 2 combinaisons d'anticorps de notre panel

Les clones et isotypes des différents anticorps sont présentés en annexe 2.

1) Concernant les marqueurs de la lignée lymphoïde T

Nous avons choisi d'utiliser les CD2, CD3, CD4, CD5, CD7 et CD8 et CD45. Ils sont exprimés à la fois sur les cellules immatures et matures, avec des niveaux d'intensité d'expression sur les cellules matures connus. Une absence et/ou une variation de l'intensité d'expression sur des cellules T sont donc en faveur d'un LAIP et évocatrices de leucémie (diminution d'intensité d'expression pour le CD2, ou sur expression pour le CD7 sont des LAIP fréquemment retrouvés dans les LAL-T). Ces marqueurs de cellules T matures sont également intéressants lorsqu'ils sont associés à l'expression d'antigènes spécifiques de cellules immatures (CD99, TdT...) car ils signent alors un LAIP de type asynchronisme.

- **Le CD45** est un marqueur pan-leucocytaire. Son intensité d'expression varie en fonction du type cellulaire, et sur un graphique CD45/SS il permet de cibler les blastes qui expriment plus faiblement le CD45.

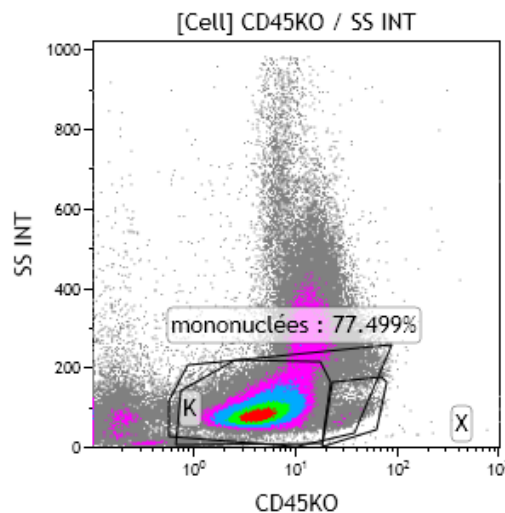


Figure 14 : Exemple d'un histogramme CD45/ SS obtenu à partir d'un prélèvement de moelle osseuse au diagnostic d'une LAL-T. (Avec K: fenêtre ciblant les blastes, et X: fenêtre ciblant les lymphocytes.)

- **Les CD4 et CD8** sont exprimés par les thymocytes puis par respectivement 2/3 et 1/3 des lymphocytes T matures. Le CD4 peut être également exprimé à un niveau plus faible par les monocytes, les macrophages et certaines cellules dendritiques. Dans la population lymphocytaire T normale, les lymphocytes T expriment le CD4 ou le CD8, jamais les 2 simultanément. Les cellules pouvant exprimer à la fois du CD4 et CD8 sont les thymocytes doubles positifs qui sont exclusivement localisés au niveau du thymus. La co-expression du CD4 et du CD8 au niveau médullaire ou du sang signe donc la présence de cellules leucémiques, et constitue un LAIP qui permettra le suivi de la maladie résiduelle.
- **Le CD3** est un antigène strictement spécifique de la lignée T, qui est essentiel à l'activité physiologique du lymphocyte T puisqu'il va transmettre le signal d'activation induit par l'engagement du TCR dans une réaction immunitaire. Durant la lymphopoïèse T, le CD3 ne sera pas tout de suite exprimé sur la membrane cellulaire, il va tout d'abord apparaître en intracytoplasmique au stade d'Early Thymique Progenitor (ETP). Il ne sera exprimé en surface seulement une fois que les réarrangements géniques auront permis la production d'un TCR fonctionnel, à partir du stade double positif. Selon la classification EGIL, le CD3 n'est exprimé en surface que dans le type le plus mature de LAL-T, les LAL-T de type IV. On note cependant que certaines LAL-T vont co-exprimer du CD3 de surface et du CD1a (signant une LAL-T III selon EGIL) (64). En termes d'intensité d'expression, le CD3 est plus faiblement exprimé par les blastes que par les lymphocytes T matures normaux.

2) Concernant les marqueurs d'immaturité

La lymphopoïèse T s'effectuant dans le thymus, chez le sujet sain les cellules T immatures exprimant à la fois des antigènes de la lignée T et des antigènes d'immaturité sont donc uniquement retrouvées dans le thymus, contrairement aux lymphoblastes leucémiques qui circulent dans la moelle et le sang. L'étude de la MRD dans les LAL-T consiste donc à rechercher une co-expression de marqueurs d'immaturité et de marqueurs T dans la moelle ou le sang (61,65).

- **La TdT** ou terminal deoxy nucleotidyl transferase est une ADN polymérase qui participe à l'addition de nucléotides pendant les réarrangements des gènes du TCR et des immunoglobulines. De manière physiologique la TdT est fortement exprimée par les thymocytes corticaux immatures, puis son expression sera perdue dans les cellules T matures normales périphériques. Sa présence sur des cellules T sanguines ou médullaires est donc anormale. La TdT est retrouvée de façon pathologique dans les LAL-T, les LAL-B à précurseurs B et dans environ 5% des LAM. Seuls de rares cas de LAL-T TdT négative au diagnostic, correspondant à des phénotypes très immatures de LAL-T, ou en suivi de maladie résiduelle ont été rapportés, ce qui fait de la TdT un des meilleurs marqueurs de suivi de la maladie résiduelle dans les LAL-T. Cependant, la TdT n'est pas suffisante à elle seule au suivi de la maladie résiduelle. En effet, son intensité d'expression peut varier suite au traitement et atteindre le niveau d'expression des cellules normales (66) (Figure 15, page 40).
- **Le CD99** est exprimé à la fois par des cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Parmi les cellules hématopoïétiques, le CD99 est très fortement exprimé par les précurseurs lymphoïdes et myéloïdes, et particulièrement par les précurseurs T thymiques. Son expression diminuera progressivement au cours de la maturation lymphoïde T, et ne sera finalement retrouvée parmi les cellules T matures que sur les lymphocytes T mémoires, mais à un niveau d'expression plus faible que sur les cellules immatures. Les cellules T immatures exprimant fortement le CD99 étant physiologiquement localisées dans le thymus et absentes de la moelle osseuse et du sang, la présence de CD99 sur des cellules T dans ces deux "tissus" est donc anormale et est fortement évocatrice de LAL-T. Le CD99 est donc un antigène d'un grand intérêt au diagnostic. Après traitement l'intensité d'expression sur les blastes leucémiques varie et peut atteindre le même niveau d'expression que les cellules normales (66). Il ne pourra donc pas suffire au suivi de la MRD, et doit être associé à la recherche d'antigènes dont l'intensité reste stable (Figure 15, page 40).
- **Le CD34** est l'un des marqueurs apparaissant le plus précocement pendant l'hématopoïèse et sera exprimé par de nombreux progéniteurs hématopoïétiques. Dans la lymphopoïèse T, son expression sera rapidement perdue, au stade "early prothymocyte" (66). **Le CD10** quant à lui est exprimé à un stade plus tardif que le

CD34 au cours de la lymphopoïèse T, et son expression est brève. Ces deux marqueurs ne sont exprimés au diagnostic de LAL-T que dans une minorité de cas, mais quand ils sont présents ils sont des marqueurs utiles au suivi de la MRD, d'autant plus que leur niveau d'expression reste stable après traitement contrairement aux CD99 et TdT (66).

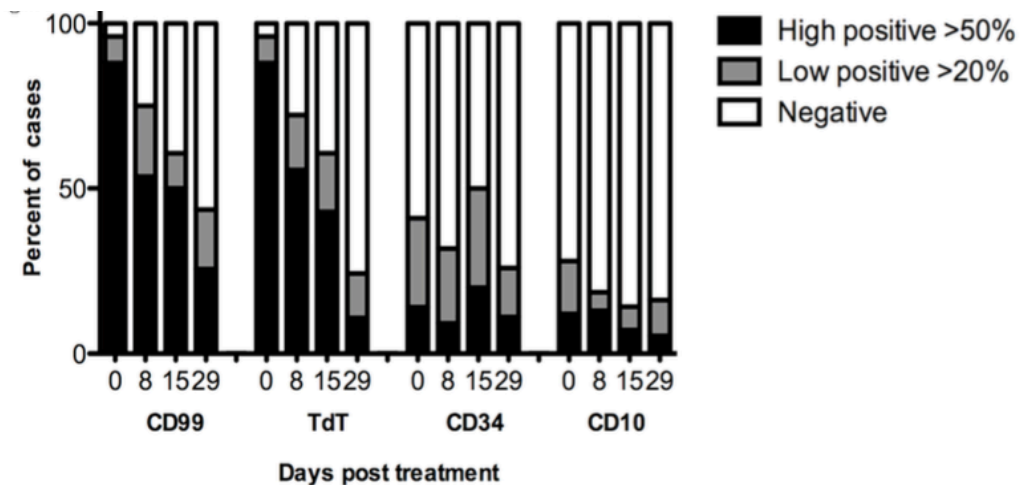


Figure 15 : Variation de l'intensité d'expression de certains antigènes (CD99, TdT, CD34 et CD10) à J0, J8, J15 et J29 du traitement d'induction des LAL-T (66)

- **Le CD3 intra-cytoplasmique** comme nous l'avons vu plus haut est exprimé par les thymocytes les plus immatures et n'est donc physiologiquement pas exprimé par les cellules médullaires ou sanguines. Cependant sa présence n'est pas pathognomonique d'une cellule de la lignée T puisqu'on le retrouve également dans le cytoplasme des cellules NK.

3) Concernant les marqueurs aberrants

- **Le CD48** (ex blast-1) est une protéine ancrée GPI et est un récepteur qui appartient à la superfamille du CD2. Il est exprimé sur les cellules hématopoïétiques, et en particulier sur les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules NK. Il circule également sous forme libre. Le CD48 possède de nombreux rôles dans l'immunité : activation des lymphocytes T quand il est combiné au CD3 ; activation, prolifération, différenciation des lymphocytes B et sécrétion des IgG (67) ; production de TNF par les cellules dendritiques... Dans le cas des LAL-T, son intérêt réside dans le fait que bien qu'il soit exprimé par toutes les cellules, son niveau d'expression est significativement plus faible sur les blastes leucémiques que sur les cellules normales. En effet, Wood a démontré que le CD48 est de façon constante plus faiblement exprimé sur les blastes leucémiques T au diagnostic que sur les cellules T et NK normales. De plus lors du suivi de la maladie résiduelle, bien que l'intensité

d'expression du CD48 sur les blastes leucémiques puisse varier, son niveau d'expression était dans 90% des cas toujours significativement plus faible que sur les cellules normales, ce qui en fait un marqueur très utile au suivi de la MRD (68).

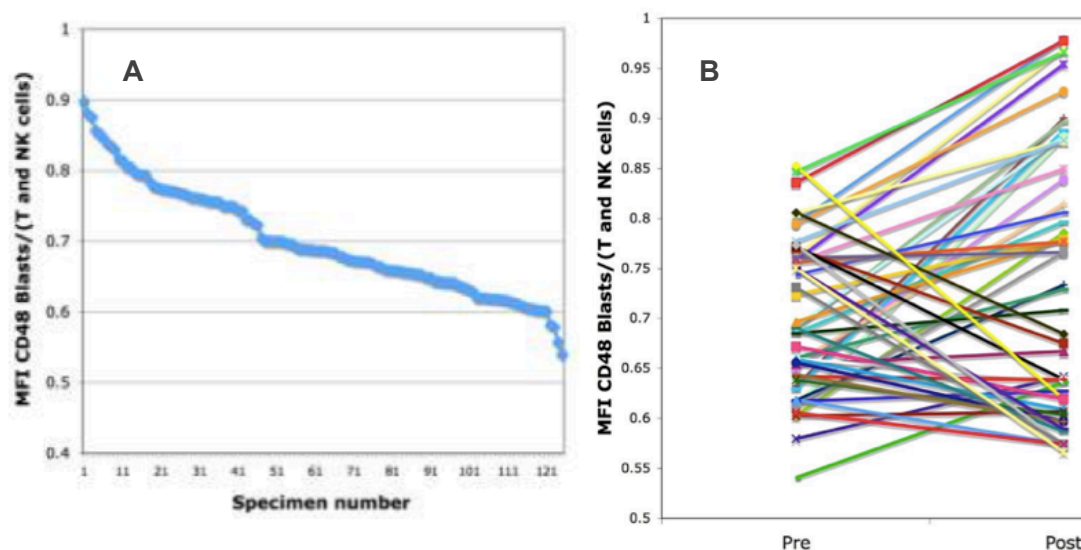


Figure 16 : Rapport des moyennes de fluorescence du CD48 blastes / cellules T et NK au diagnostic d'une LAL-T (A) et lors du suivi de la MRD (B). (69)

- Au cours de la lymphopoïèse T physiologique, **le CD1a** est un antigène exprimé exclusivement par les thymocytes corticaux (70,71). Son acquisition signe le passage d'un progéniteur très immature à un progéniteur engagé dans la lignée de différenciation T, avec perte des autres potentiels de différenciation.(6). Les thymocytes exprimant le CD1a étant exclusivement localisés au niveau du thymus, la présence de CD1a au niveau médullaire ou sanguin est pathologique. Le CD1a sera exprimé par un certain type de leucémie aigue lymphoïde T : les LAL-T III ou LAL-T corticales selon l'EGIL. Dans les cas d'une LAL-T, la positivité du CD1a permettra donc la classer en LAL-T corticale, et il sera un marqueur essentiel au suivi de la maladie résiduelle puisqu'il ne sera exprimé que par les blastes leucémiques.
- **Le CD56** est un antigène présent sur les cellules NK. **Le CD16** est exprimé par les cellules NK, les monocytes et macrophages et par les polynucléaires neutrophiles. L'utilisation d'anticorps anti CD16 et anti CD56 dans notre panel nous permet de cibler et d'exclure de l'analyse les cellules NK normales. De plus, certaines leucémies expriment de façon aberrante ces antigènes, et dans ces cas ils représenteront un LAIP et seront utiles au suivi de la maladie résiduelle.

6. Méthode

6.1. Décongélation des échantillons

Cette étape concernait les prélèvements congelés.

La décongélation était réalisée par aspiration refoulement du culot cellulaire congelé dans 10ml d'un milieu RPMI+SVF chauffé à 37°C. Elle était suivie de 2 lavages dans du RPMI-SVF chauffé à 37°C, avec centrifugation à 300G pendant 5 minutes à 20°C. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du PBS-SAB afin d'obtenir une suspension cellulaire à 20 millions de cellules par millilitre.

Afin de vérifier la qualité de l'échantillon après décongélation, nous avons réalisé un test de viabilité au Bleu de Tryptan qui consiste à compter le pourcentage de cellules mortes en cellule de Malassez après décongélation. Pour cela, la suspension cellulaire après décongélation est mise en contact avec une solution de Bleu de Tryptan (mélange volume à volume) pendant 5 minutes. Les cellules mortes seront colorées en bleu-noir et pourront être dénombrées.

6.2. Immuno-marquage

1) Pour les 2 combinaisons d'anticorps de notre panel

Lorsque l'analyse était réalisée sur des prélèvements frais, 10 millions de cellules étaient prélevées et subissaient 2 lavages dans du PBS-SAB, avec centrifugation à 430G pendant 5 minutes à 20°C. Les cellules étaient ensuite remises en suspension dans 500µl de PBS-SAB afin d'obtenir une suspension à 20 millions de cellules par millilitres.

Dans 2 tubes Falcon, 50µl de cette suspension (soit 1 million de cellules) étaient incubés dans 50µl de PBS-SAB avec les anticorps marquant les antigènes de surface de chacune de nos 2 combinaisons. L'incubation durait 15 minutes dans l'obscurité.

2) Pour le tube avec marquage intracytoplasmique

Après incubation, on réalisait un lavage au PBS suivi d'une centrifugation 5 minutes à 430G.

Après réalisation du marquage de surface, une perméabilisation membranaire à l'aide des réactifs DAKO® était réalisée. La suspension cellulaire était ensuite incubée avec les anticorps intracytoplasmiques (15 minutes à l'obscurité), puis lavée par du PBS (centrifugation 5 minutes, 430G). Enfin, le culot de centrifugation était remis en suspension dans 500µl de PBS pour passage immédiat sur le cytomètre.

3) Pour le tube avec marquage exclusivement membranaire

Suite à la phase d'incubation en présence des anticorps, on réalisait 2 lyses successives par une solution de NH₄Cl afin d'éliminer les globules rouges. Les leucocytes restants sont lavés par du PBS (5 minutes, 430G) puis remis en suspension dans 500µl de PBS pour passage immédiat sur le cytomètre.

6.3. Réglage du cytomètre de flux

Le cytomètre utilisé est un Navios® de chez Beckman Coulter, en configuration 10 couleurs et 3 lasers.

6.3.1. Réglage des PMT

Nous avons travaillé avec une sensibilité constante des cytomètres. Pour cela nous avons dans un premier temps effectué un premier réglage de sensibilité sur le Navios® de la manière suivante.

Le réglage des photomultiplicateurs a été réalisé sur un mélange de cellules normales et blastiques monomarquées par chacun des anticorps du tube membranaire de notre panel. Le voltage de chaque photomultiplicateur a été ajusté pour que 95% des événements négatifs apparaissent dans la première décade de l'histogramme, puis nous avons vérifié l'obtention d'une séparation visible entre les cellules positives et les cellules négatives.

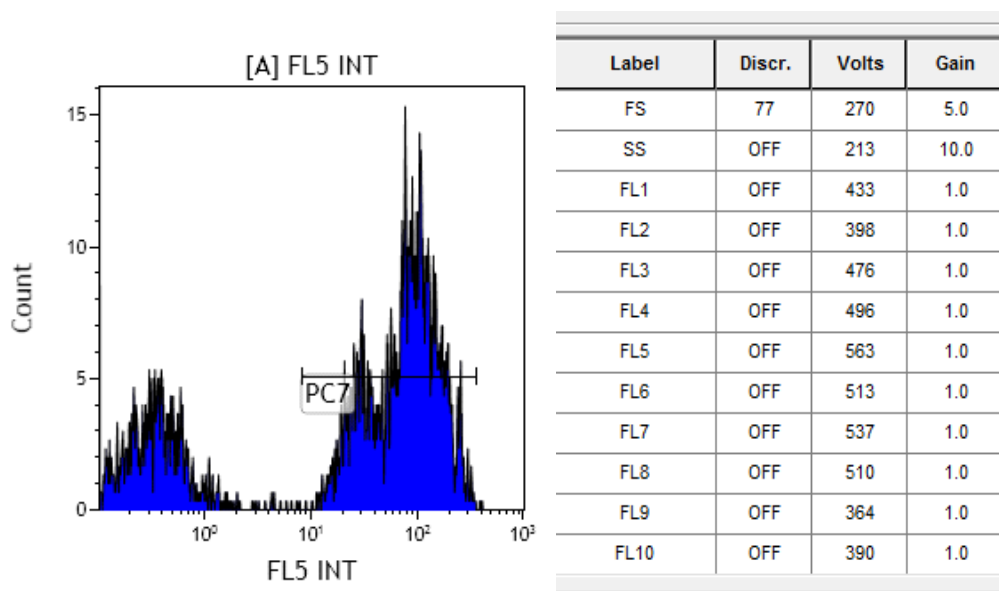


Figure 17 : Exemple d'un histogramme obtenu lors du réglage des voltages pour le fluorochrome APC, et settings obtenus et utilisés pendant notre étude.

Une fois ce réglage effectué nous avons passé des billes de contrôle (billes Flow Set de chez Beckman-Coulter, référence : A63492) pour fixer les valeurs cibles de sensibilité correspondant à ce réglage.

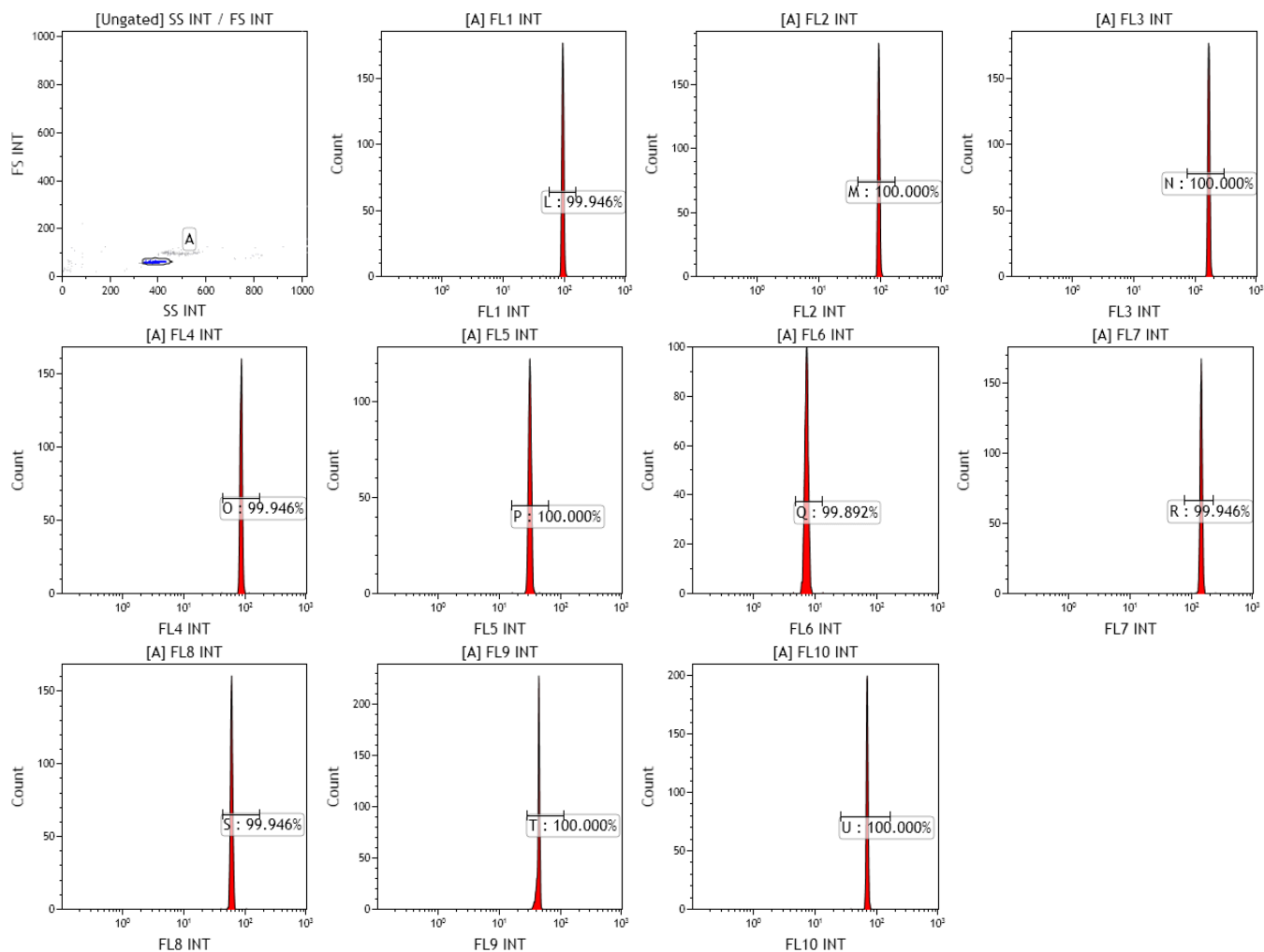


Figure 18 : Histogrammes obtenus lors de l'analyse des billes Flow Set avec les settings retenus

Durant toute cette étude tous les échantillons ont été passés avec cette sensibilité.

6.3.2. Matrice de compensation

Les spectres d'émission des différents fluorochromes peuvent se chevaucher.

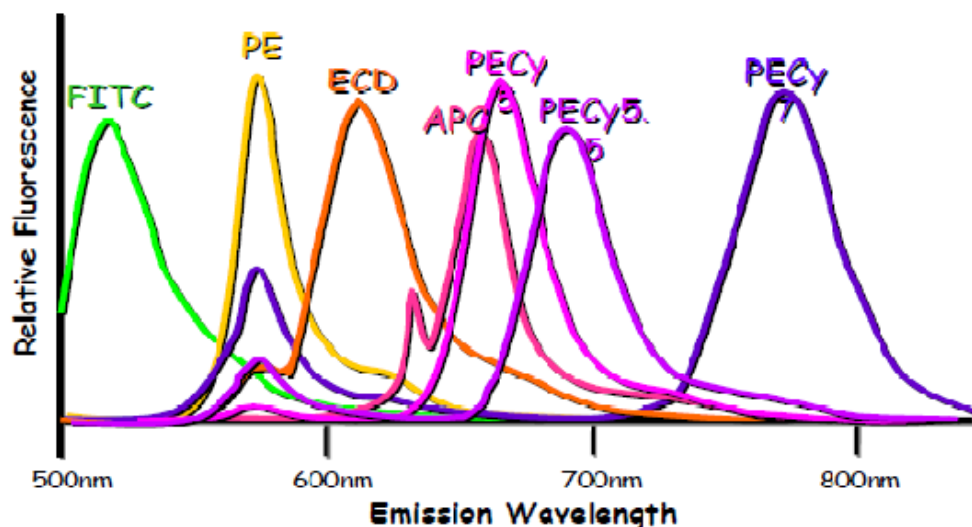


Figure 19 : Chevauchement des spectres de fluorescence des différents fluorochromes.

Le signal émis par un fluorochrome sera donc détecté par le photomultiplicateur (PMT) qui lui est dédié, mais également par le PMT voisin vers lequel il « fuit ». Si cette « fuite » n'est pas prise en compte dans l'analyse, elle faussera donc le résultat de MFI (moyenne d'intensité de fluorescence). Au niveau de chaque PMT, la compensation est une transformation mathématique consistant à soustraire les signaux non spécifiques provenant des autres fluorochromes.

Voici la matrice de compensation qui a été utilisée tout le temps de l'étude :

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8	FL9	FL10
FL1		2.500	0.000	0.000	0.100	0.100	0.000	0.500	0.000	0.400
FL2	9.300		3.700	1.200	0.600	0.000	0.000	0.100	0.600	0.200
FL3	5.400	67.300		1.500	0.700	0.000	0.000	0.300	0.000	0.100
FL4	0.500	13.000	26.000		0.200	0.200	0.400	0.100	0.500	0.000
FL5	0.000	1.900	5.000	30.200		0.000	0.500	1.500	0.000	0.000
FL6	0.000	0.000	0.100	2.100	0.000		7.600	11.200	0.500	0.000
FL7	0.000	0.000	0.000	20.800	0.300	23.900		7.900	0.100	0.000
FL8	0.000	0.000	0.000	8.800	8.700	5.800	28.000		0.100	0.000
FL9	0.300	0.000	0.200	0.000	0.000	0.000	0.000	0.500		2.400
FL10	3.900	6.900	0.500	4.600	0.400	0.200	0.600	0.600	14.300	

Figure 20 : Matrice de compensation retenue pour notre étude

6.4. Acquisition

Les cellules remises en suspension dans 500µl de PBS étaient passées sur le cytomètre afin d'acquérir au moins 500 000 cellules pour les prélèvements au diagnostic, et 1 000 000 cellules pour les prélèvements de MRD selon les recommandations d'I-BFM-ALL-FLOW-MRD. La durée d'acquisition variait de 300 ms au jusqu'à 500 ms en vitesse médium afin de recueillir le plus d'évènements possible.

6.5. Stratégie de réanalyse

L'évaluation et le suivi de la MRD d'un patient sont plus aisés si le phénotype aberrant (ou LAIP) des blastes leucémiques au diagnostic est connu. Nous avons établi une double stratégie d'analyse qui comprenait dans un premier temps une étude des cellules blastiques au diagnostic, puis une analyse du ou des prélèvements de maladie résiduelle du patient et dans un deuxième temps la comparaison des différents points de suivi avec des moelles de référence pour détecter la présence de cellules anormales présentant d'autres LAIP que ceux observés au diagnostic (glissement antigénique).

6.5.1. Au diagnostic

Nous avons établi un protocole d'analyse pour nos 2 combinaisons d'antigènes. Le principe d'analyse est identique pour les 2 combinaisons et se décompose en plusieurs étapes : en premier lieu, une étape visant à sélectionner les éléments cellulaires et éliminer les débris ainsi que les passages en doublets, puis dans un deuxième temps une sélection de la population blastique CD45 faible, et enfin, une dernière étape qui permet la mise en évidence du LAIP des blastes.

1) Elimination des débris et sélection des différentes populations cellulaires

En premier lieu, nous réalisons un graphique Time (nombres de cellules analysées en fonction du temps) afin de vérifier la régularité de l'acquisition et l'absence en fin d'acquisition d'une aspiration du fond du tube et donc d'air. Enfin ce graphe permet en fin d'analyse de vérifier si les événements positifs sont répartis uniformément pendant l'acquisition.

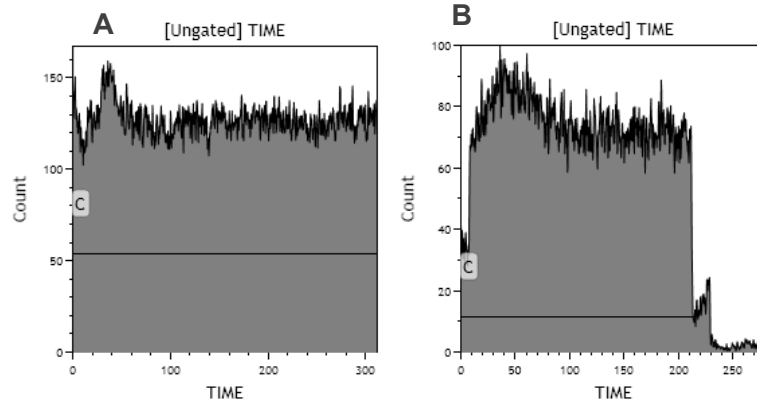


Figure 21 : Exemples d'histogrammes time : acquisition homogène sur 300ms (A), et une acquisition atteignant le fond de tube (B)

Ensuite, sur un graphique FS INT/FS PEAK conditionné sur le Time, nous éliminons les doublets pour ne garder que les singulets dans notre analyse.

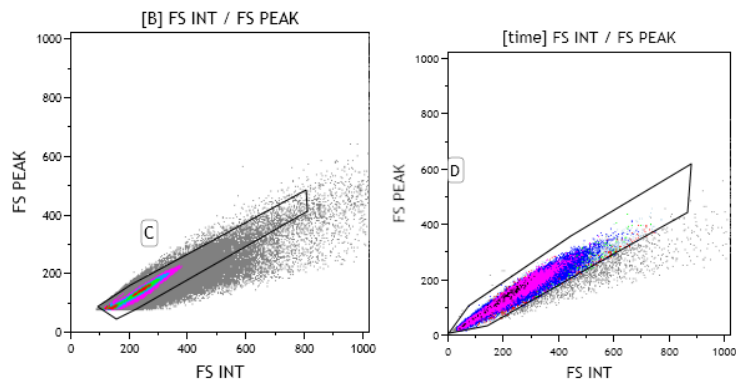


Figure 22 : Elimination des doublets

L'analyse de cellules en doublet correspond au passage devant le laser de 2 cellules accolées. Le signal émis par une cellule lors de son passage devant le cytomètre est converti en un signal (impulsion) électrique défini par une hauteur, une largeur et une aire sous la courbe. Si 2 cellules passent simultanément devant le laser, créant un doublet, cela engendrera une augmentation de l'aire sous la courbe sans augmentation de la hauteur du pic. Les événements correspondants à des passages de cellules isolées seront donc observés dans la fenêtre singulet autour de la bissectrice de l'histogramme "FS peak/FS int".

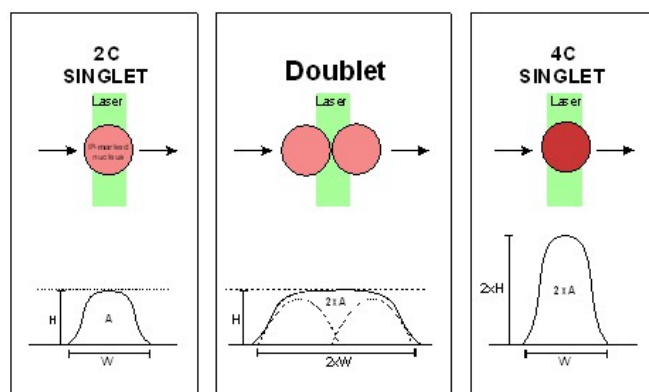


Figure 23 : représentation de la procédure utilisée pour la discrimination des doublets (72)

Dans un troisième temps, sur un graphique taille/ structure (FS/SS) (conditionné sur les singlets) nous sélectionnons une région appelée « cell » qui exclue de l'analyse les débris cellulaires.

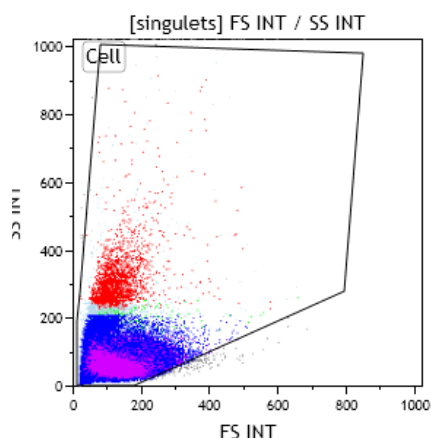


Figure 24 : Sélection de la fenêtre "Cell" avec élimination des débris cellulaires

Enfin, conditionné sur cette fenêtre « cell » nous réalisons un graphique CD45/SS sur lequel nous pouvons sélectionner nos différentes populations leucocytaires : monocytes, lymphocytes, granuleux et blastes (qui expriment plus faiblement le CD45 que les lymphocytes et monocytes). Sur ce même graphique, une fenêtre « mononucléées » englobant les monocytes, lymphocytes et les blastes et excluant les polynucléaires est créée. Le nombre d'événements compris dans cette fenêtre nous servira de dénominateur pour le calcul de la maladie résiduelle.

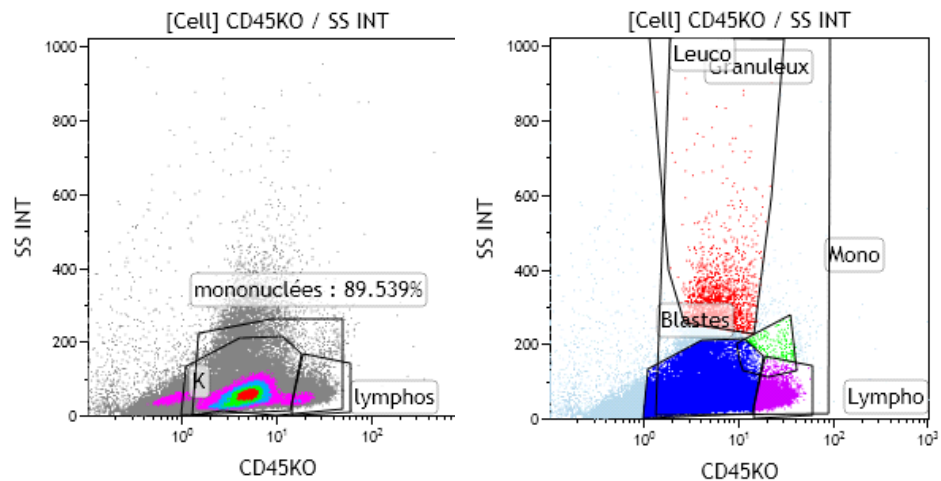


Figure 25 : différenciation des sous populations leucocytaires

Pour chaque anticorps de la combinaison, un graphique CD/SS est réalisé afin de voir avec quelle intensité la population blastique exprime le marqueur par rapport aux cellules normales. Ces graphiques nous permettent également de vérifier que tous les anticorps de la combinaison ont bien été distribués (présence de cellules positives pour le marqueur).

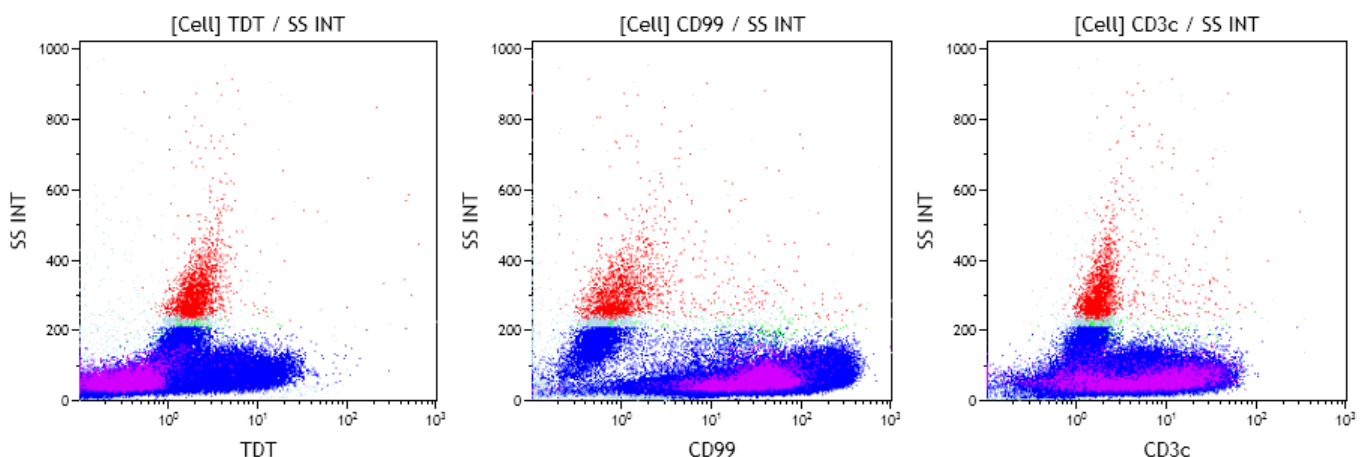


Figure 26 : Cellules positives et négatives pour les marqueurs TdT, CD99 et CD3c

2) Sélection des blastes

Dans l'idéal il est préférable de sélectionner les lymphoblastes leucémiques grâce à un marqueur de la lignée T afin d'exclure les myéloblastes. Cette approche s'est avérée irréalisable du fait que les marqueurs T (CD2, CD3, CD5 et CD7) ont une variabilité d'expression trop importante en fonction du patient et du type de LAL-T (ils sont en effet des marqueurs de LAIP). Cette approche n'aurait donc pas été reproductible d'un patient à l'autre. Les blastes leucémiques étant connus comme ayant le plus souvent une intensité d'expression du CD45 diminuée, et ce de façon quasi constante, il nous a paru

préférable d'utiliser une stratégie de sélection des blastes sur le CD45. La sélection des blastes était faite sur un graphique CD5/CD45, l'utilisation du CD5 servant à confirmer l'origine T des blastes.

Tous les histogrammes bi-paramétriques de la suite de l'analyse seront conditionnés sur cette fenêtre de sélection « CD45/CD5 ».

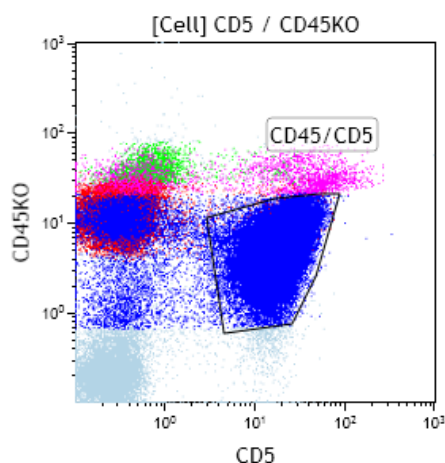


Figure 27 : sélection des blastes CD45 faibles

3) Mise en évidence du profil phénotypique des blastes

Le but de l'analyse des cellules leucémiques au diagnostic est de mettre en évidence la présence d'un ou plusieurs marqueurs aberrants qui permettront le suivi de la maladie résiduelle.

Pour cela, des histogrammes bi-paramétriques reprenant au moins une fois chacun des anticorps du panel sont créés, créant ainsi une combinaison de marqueurs. Sur chacun de ces histogrammes nous créons une fenêtre de sélection correspondant aux blastes, définissant ainsi un LAIP (masque de sélection).

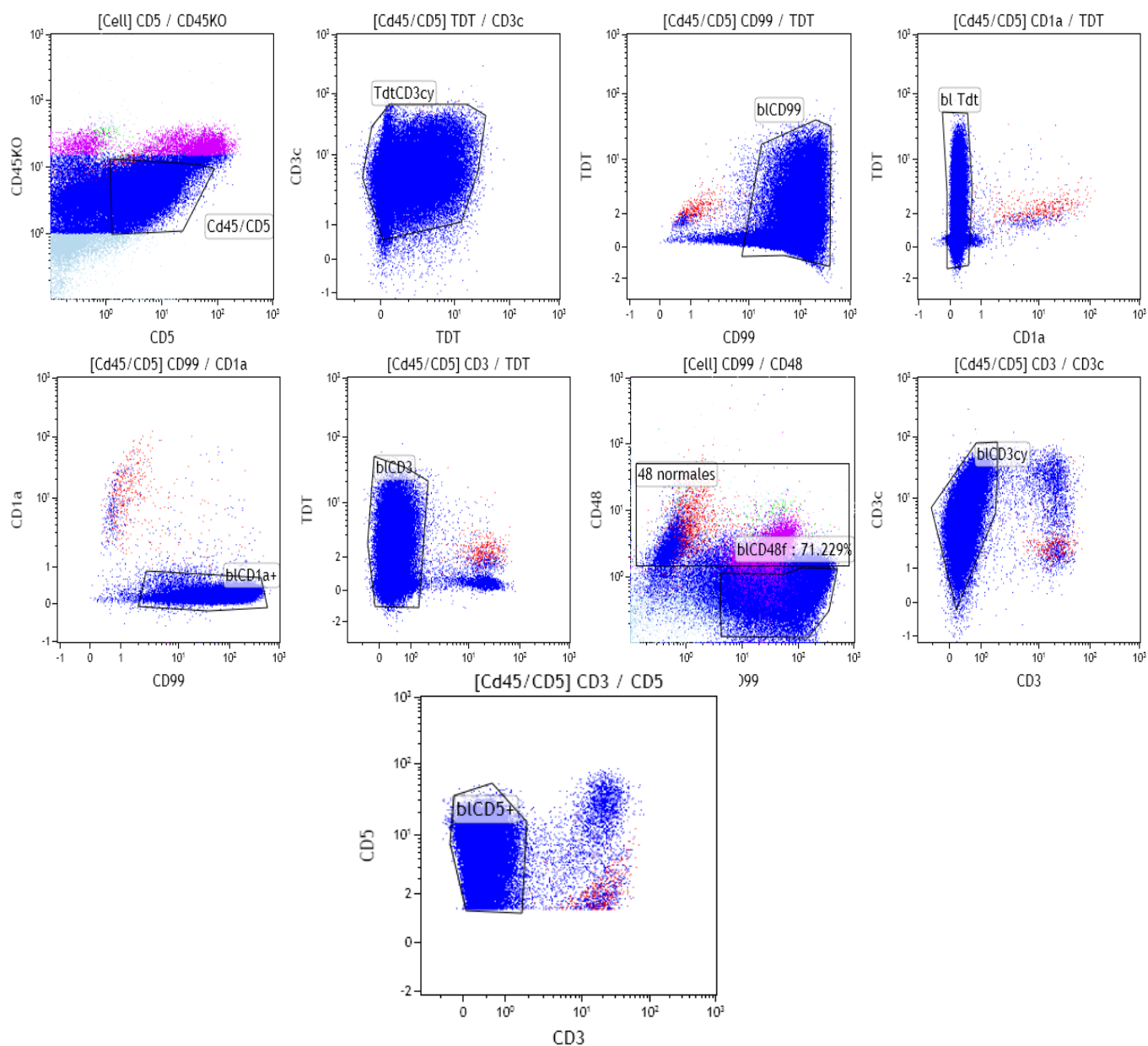


Figure 28 : exemple d'un masque d'analyse du diagnostic d'un patient pour la combinaison 1 intracellulaire.

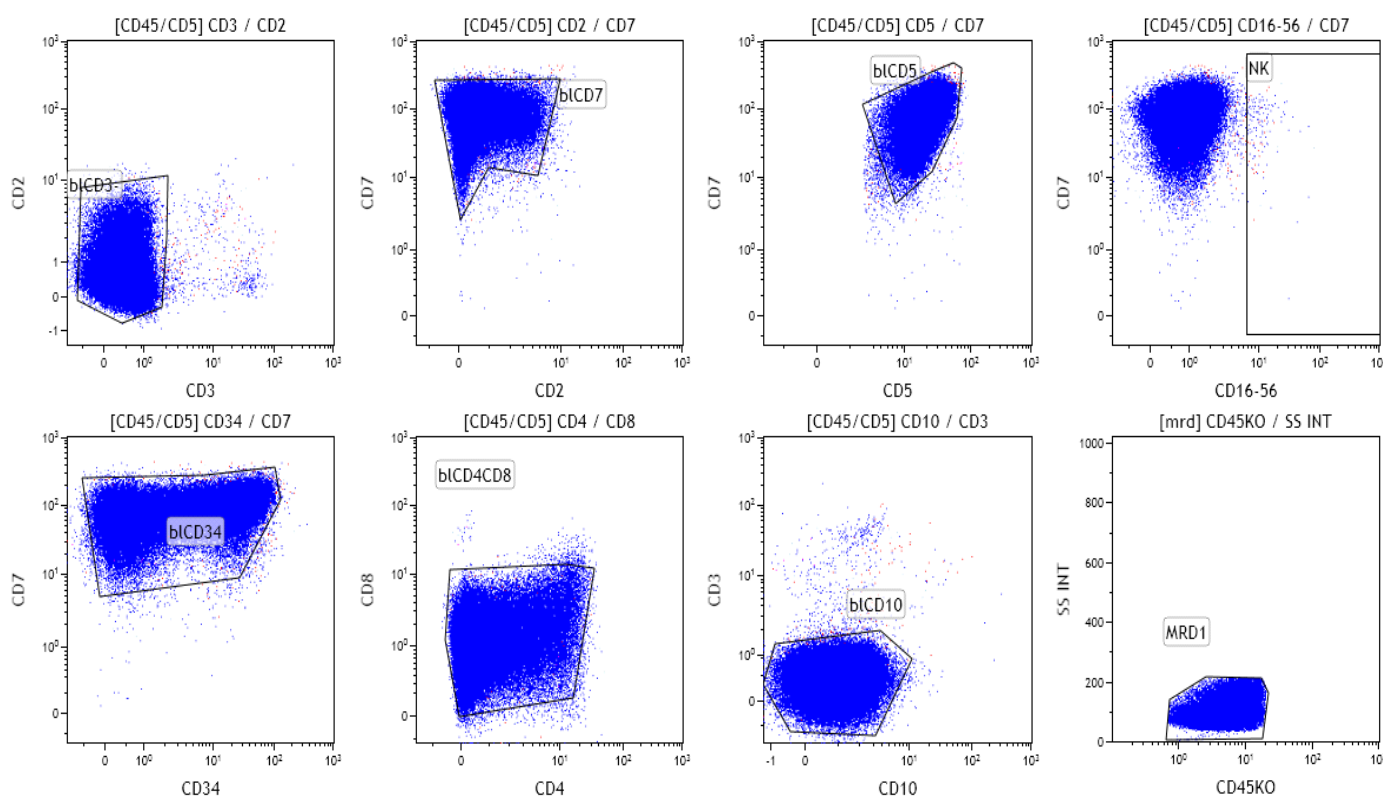


Figure 29 : exemple d'un masque d'analyse du diagnostic d'un patient pour la combinaison 2 membranaire

Nous définissons par la suite un opérateur booléen (« MRD ») d'intersection de toutes ces fenêtres.

Les cellules ainsi définies sont visualisées sur un histogramme « CD45/SS » montrant le degré d'homogénéité du cluster ainsi défini.

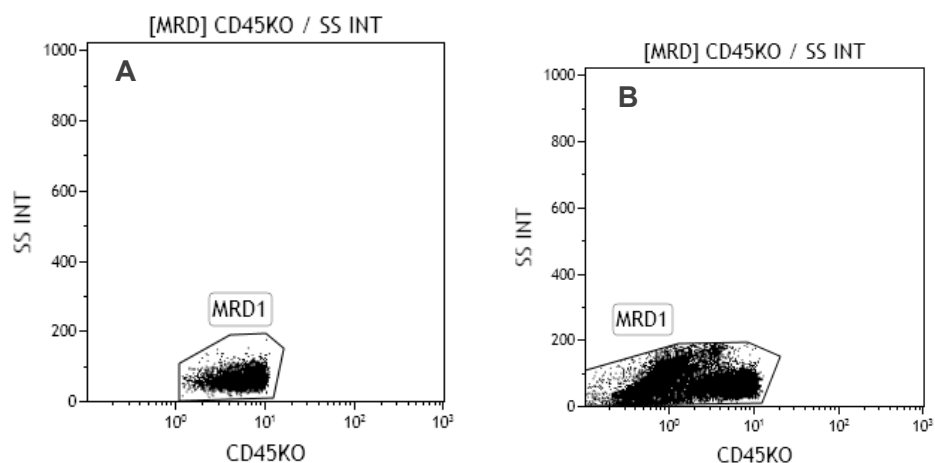


Figure 30 : Exemple d'un cluster homogène (A) et d'un cluster hétérogène (B)

Le nombre de ces cellules définit les événements cellulaires correspondant à la maladie résiduelle « MRD1 ».

Cependant il est plus facile d'homogénéiser le rendu des résultats en exprimant la maladie résiduelle sous la forme d'un pourcentage de cellules anormales. Pour cela nous étudions le nombre de cellules totales ainsi que le nombre de cellules mononucléées.

Le résultat final est obtenu en rapportant le nombre d'évènements « MRD1 » sur le nombre de cellules mononucléées ou le nombre de cellules totales et en multipliant par un facteur 100.

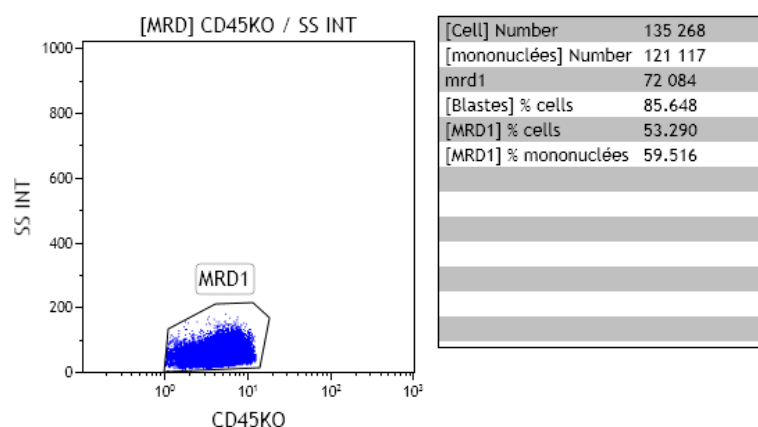


Figure 31 : Exemple d'un résultat de MRD sur un prélèvement au diagnostic

6.5.2. En maladie résiduelle

Lors de la recherche de maladie résiduelle, les cellules du prélèvement de MRD sont analysées sur le même masque d'analyse que celui issu de l'analyse du diagnostic. Les fenêtres positionnées sur les blastes sur chaque histogramme restent positionnées de manière strictement identique. Le graphique d'intersection des zones blastiques nous donne donc le nombre d'évènements ayant un phénotype identique à celui du diagnostic. Ce nombre d'évènements rapporté au nombre de cellules mononucléées et multiplié par 100 nous donne le pourcentage de cellules blastiques résiduelles, soit la MRD (nommée MRD1 dans le protocole d'analyse).

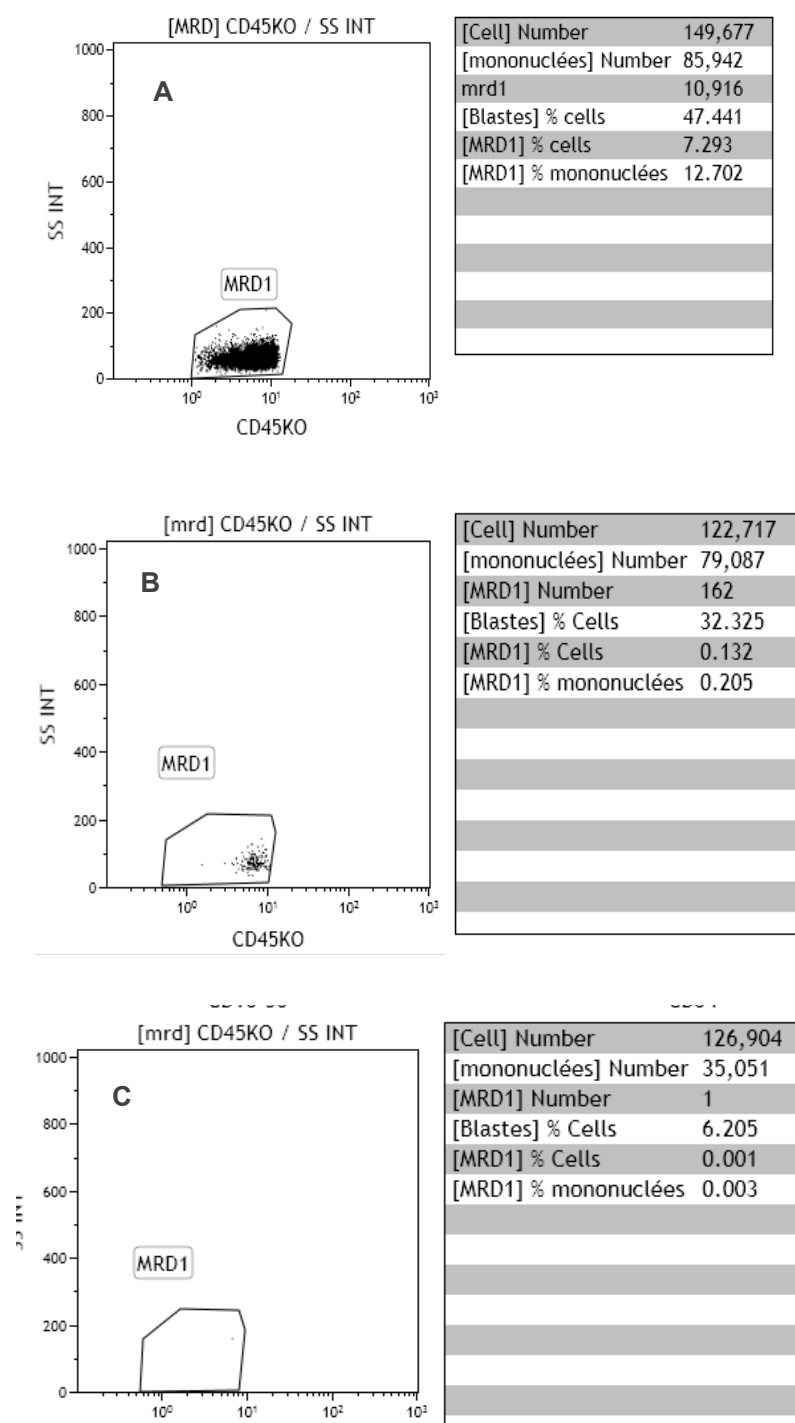


Figure 32 : Exemples de différents taux de MRD (A : point de rechute, B : point de suivi avec une MRD positive, C : point de suivi avec une MRD négative)

6.6. Interprétation biologique des résultats

L'interprétation biologique du résultat de la maladie résiduelle dépend :

- 1) Du nombre de cellules mononucléées analysées qui compose notre dénominateur

Comme nous travaillions à la fois sur des échantillons congelés et des prélèvements frais il s'est posé le problème du choix du dénominateur pour le calcul de la MRD. En effet, lors de la congélation les polynucléaires sont lysés, lors de l'analyse des cellules congelées ne resteront donc que les cellules mononucléées. Lorsque le prélèvement était analysé à l'état frais, toutes les cellules leucocytaires étaient représentées (polynucléaires et cellules mononucléées). Afin d'homogénéiser le rendu de nos résultats de MRD, nous avons choisi de rendre la MRD en pourcentage des cellules mononucléées plutôt qu'en pourcentage des leucocytes totaux, les cellules mononucléées étant sélectionnées sur un graphique CD45/SS (créant un pseudo Ficoll®).

- 2) Du nombre d'évènements retrouvés sur le graphique CD45/SS conditionné sur l'intersection des fenêtres centrées sur les blastes

En accord avec les recommandations I-BFM-ALL-FLOW-MRD, une MRD est dite positive si on retrouve un cluster de plus de 30 évènements.

Les éléments statistiques ayant conduit à ces recommandations découlent de calcul de probabilités. Les données de cytométrie peuvent être réduites à un critère d'interprétation simple : soit elles appartiennent à la catégorie ciblée soit elles n'y appartiennent pas, ceci indépendamment de la difficulté à les placer dans cette catégorie. On peut considérer que l'ensemble de ces données suit une loi binomiale et que tout sous ensemble de ces données (représentant moins de 5% de ces données) suit une loi de poisson (73).

A partir de là, il est facile, si l'on connaît la fréquence de l'évènement qui est recherché, de déterminer la variance et l'écart type de cette population positive. Si p est la fréquence de l'évènement alors la variance est calculée comme suit : $\text{Variance} = n * p * q$, où n est le nombre d'évènements, p sa fréquence et $q = 1 - p$.

Les tableaux ci-dessous montrent, pour des fréquences théoriques correspondant à nos valeurs cibles de MRD, le nombre d'évènements à acquérir et la taille minimale de cluster à considérer pour avoir une mesure se situant dans un intervalle de confiance de 95%.

MRD 0,01%				
R (taille du cluster)	5	30	60	100
N (Nombre d'évènements acquis)	50 000	300 000	600 000	1 000 000
Probabilité (MRD)	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
variance	5,00	30,00	59,99	99,99
écart type	2,24	5,48	7,75	10,00
CV	0,45	0,18	0,13	0,10
IC 90%	3,67	8,98	12,70	16,40
IC 95%	4,38	10,73	15,18	19,60
IC 99%	5,77	14,13	19,98	25,80

MRD 0,1%					
R (taille du cluster)	5	30	60	100	400
N (Nombre d'évènements acquis)	5 000	30 000	60 000	100 000	400 000
Probabilité (MRD)	0,001	0,001	0,001	0,001	0,001
variance	5,00	29,97	59,94	99,90	399,60
écart type	2,23	5,47	7,74	9,99	19,99
CV	0,45	0,18	0,13	0,10	0,05
IC 90%	3,67	8,98	12,70	16,39	32,78
IC 95%	4,38	10,73	15,17	19,59	39,18
IC 99%	5,77	14,12	19,97	25,79	51,57

Sur ces tableaux nous pouvons voir que tout cluster inférieur à 30 événements conduit à des intervalles de confiance à 95% où la présence certaine de cellules ne peut être affirmée. Exemples : pour un cluster de 5 événements l'IC 95% sera de (0,52-9,38), pour un cluster de 30 il sera de (19,27-40,73), donc dans le pire des cas au moins 19 cellules MRD positive sont présentes.

Ces tableaux montrent aussi l'augmentation drastique du nombre d'évènements à acquérir pour diminuer le CV de la mesure de MRD. Ainsi, pour des cibles à 0,1% pour passer d'un CV de 45% à 5% il faut passer d'une acquisition de 5000 à 400 000

événements. Approximativement, un gain d'une puissance de dix sur les CV ne peut se faire que par une multiplication par 100 du nombre de cellules à acquérir.

Interprétations biologiques

En fonction de ces paramètres, différentes interprétations biologiques peuvent être obtenues :

Cluster	Cellules mononucléées	MRD
Absence	< 100 000	Négative au seuil technique détection de (30/nombre d'évènement acquis) %
Absence	> 100 000	Négative au seuil de détection meilleur que 0,03%
>10 et < 30 évènements	< 100 000	déectable au seuil de détection de (30/nombre d'évènement acquis) %
>10 et < 30 évènements	> 100 000	déectable au seuil de détection meilleur que 0,03%
> 30 évènements	< 100 000	positive au seuil de détection de (30/nombre d'évènement acquis) %
> 30 évènements	> 100 000	positive au seuil de détection meilleur que 0,03%

Tableau 5 : Seuils de détection techniques en fonction du nombre d'évènements et du nombre de cellules analysées.

RESULTATS

1. Validation de méthode

1.1. Détermination des concentrations optimales en anticorps

Pour chaque anticorps utilisé dans le marquage de nos cellules, le fournisseur recommande un volume à utiliser de 4 à 20 µl pour un volume final de 100µl.

Afin d'optimiser notre méthode et de limiter le volume en anticorps, nous avons recherché pour chaque anticorps la concentration minimale saturante. Pour cela, 500 000 cellules (50µl) de sang témoin ont été incubées avec 5µl de CD45KO, et avec une gamme de concentration de l'anticorps à tester (0µl, 2,5µl, 5µl, 7,5µl et 10µl si la concentration recommandée était de 10µl).

Tube	Volume CD16 APC	Volume PBS+ SAB 0,1%	Volume 45 KO	Volume de suspension cellulaire
1	Auto	50,0 µl	5 µl	50 µl
2	2,5 µl	47,5 µl	5 µl	50 µl
3	5,0 µl	45,0 µl	5 µl	50 µl
4	7,5 µl	42,5 µl	5 µl	50 µl
5	10,0 µl	40,0 µl	5 µl	50 µl

Tableau 6 : Composition des tubes utilisés pour la détermination des concentrations minimales saturantes (exemple du CD16-APC).

Pour chaque concentration étudiée, la MFI était mesurée. Un graphique représentant la MFI des lymphocytes en fonction de la concentration en anticorps permet d'obtenir une courbe sur laquelle est observée une augmentation croissante de la MFI avec la concentration en anticorps, jusqu'à un point d'inflexion suivi d'un plateau correspondant à la saturation des sites antigéniques par l'anticorps. Nous avons déterminé la concentration minimale saturante comme étant celle se situant sur le plateau juste après le point d'inflexion.

Ces courbes de saturation ont été réalisées pour les AC utilisés exclusivement dans notre panel de MRD LAL-T : CD2/PE, CD8/PC5.5, CD16/APC, CD4/PB, TdT/FITC, CD99/PE, CD48/PB. Les autres anticorps, déjà utilisés en routine dans notre laboratoire pour d'autres analyses, ont été utilisés avec le volume habituellement utilisé.

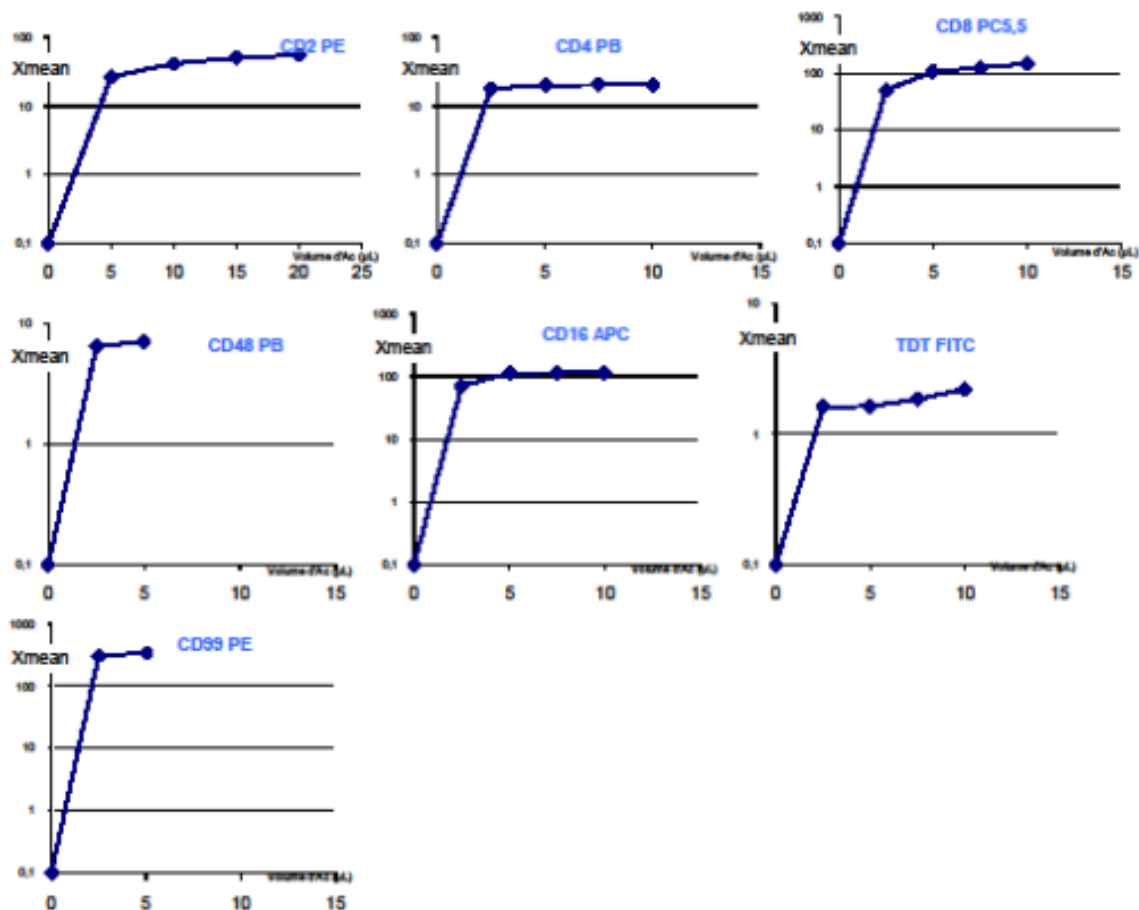


Figure 33 : Courbes de saturation obtenues pour les CD2-PE, CD4-PB, CD8-PC5.5, CD48-PB, CD16-APC, TdT-FITC et CD99-PE.

	CD7 (FITC)	CD2 (PE)	CD3 (ECD)	CD8 (PC5.5)	CD5 (PC7)	CD56 (APC)	CD16 (APC)	CD34 (AA700)	CD10 (AA750)	CD4 (PB)	CD45 (KO)
5 µl	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x
7,5 µl		x									
10 µl			x	x	x	x	x	x	x	x	x
20 µl	x	x									

Tableau 7 : Concentrations recommandées par le fournisseur pour notre panel (**noir**) et concentrations retenues (**orange**) pour le tube membranaire.

	TDT (FITC)	CD99 (PE)	CD3 (ECD)	CD5 (PC7)	CD1A (APC)	CD3 (AA750)	CD48 (PB)	CD45 (KO)
4 µl							xx	
5 µl	x	xx	x	x	x	x		x
10 µl	x		x	x	x	x		x

Tableau 8 : Concentrations recommandées par le fournisseur pour notre panel (**noir**) et concentrations retenues (**orange**) pour le tube intracellulaire.

1.2. Test des combinaisons d'anticorps sur des lymphocytes normaux

Dans un premier temps nous avons marqué des lymphocytes normaux avec notre panel d'anticorps afin de voir l'intensité d'expression des marqueurs étudiés par les lymphocytes circulants dans nos conditions expérimentales (réglages du cytomètre, panel d'anticorps aux concentrations retenues).

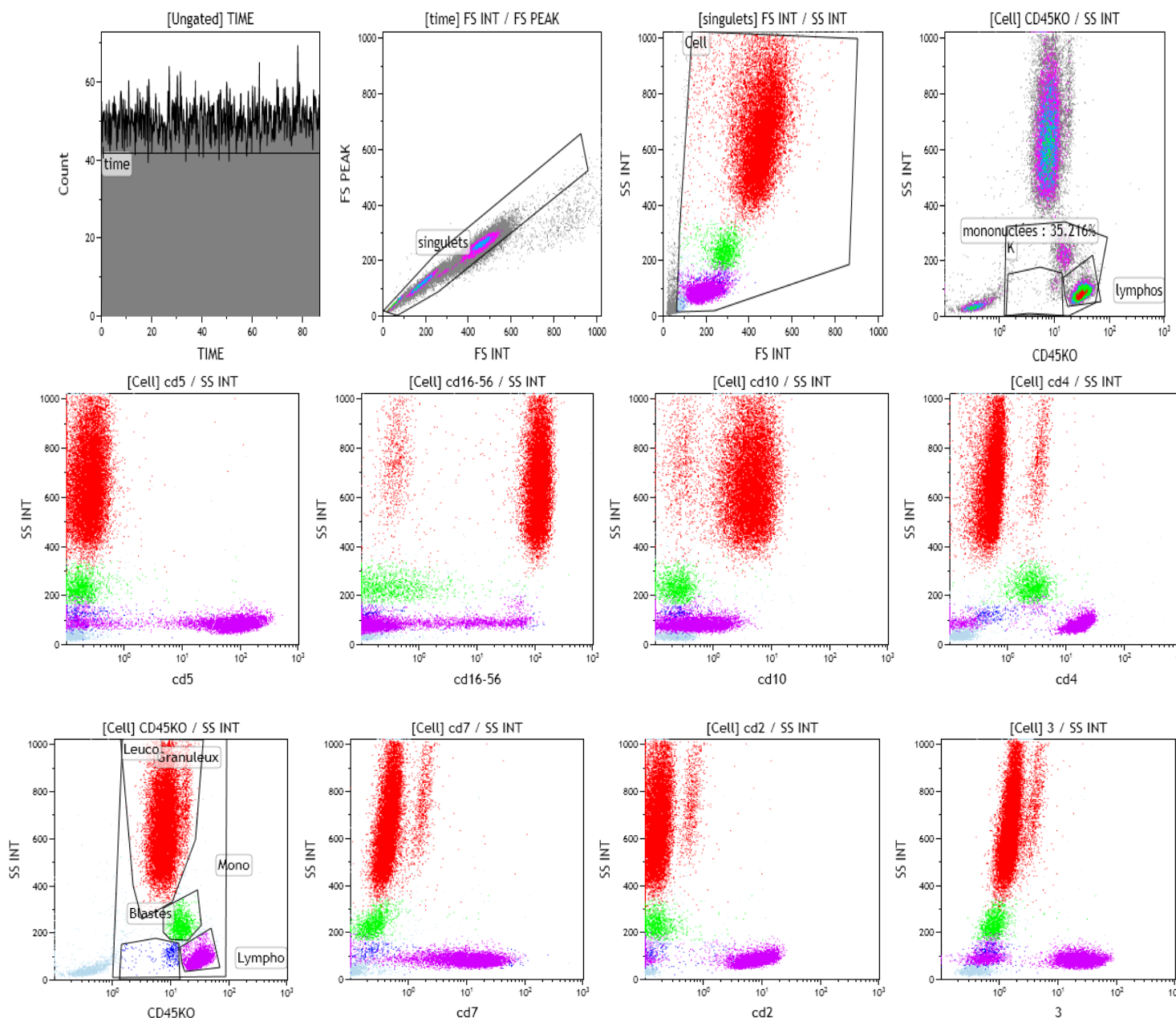


Figure 34 : Marquage d'un sang normal par les anticorps de la combinaison 2

Nous pouvons voir que les populations d'intérêt sont nettement séparées des cellules négatives.

1.3. Etude de la linéarité et de la sensibilité de la technique

Afin de tester la sensibilité technique de notre panel, nous l'avons testé sur une gamme de dilution de blastes. Pour cela, nous avons mélangé une moelle non envahie et une moelle de diagnostic de LAL T de phénotype connu (CD99++, CD1a+, CD3cyto+, CD48 diminué, CD7+, CD34-), afin d'obtenir des suspensions cellulaires comprenant

respectivement : 0%, 0,1%, 1% et 10% de blastes. Les 2 combinaisons de notre panel ont été testées pour chacune de ces dilutions, selon le même protocole de marquage que celui décrit précédemment. La stratégie d'analyse a permis de calculer la concentration blastique mesurée et de la comparer à la concentration blastique théorique attendue. Nous obtenons les résultats suivants :

Pourcentage théorique de blastes	Pourcentage de blastes mesuré		
	tube intracellulaire	tube membrane	moyenne
10%	9,5	15	12,25
1%	1,9	2	2
0,1%	0,18	0,2	0,19
0%	0	0,001	0

Tableau 9 : Pourcentage de blastes théorique et mesuré

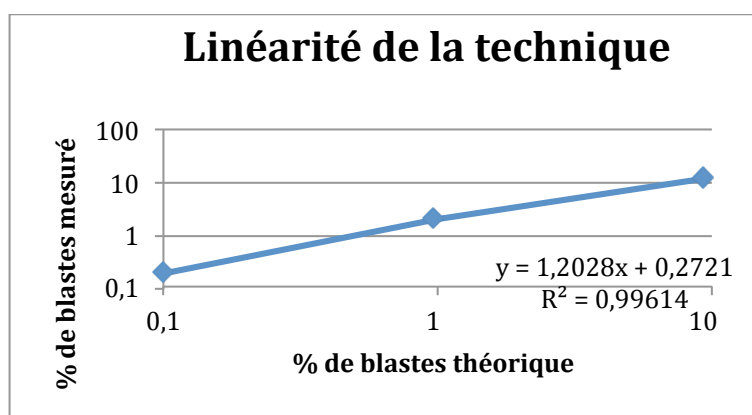


Figure 35 : Courbe linéarité : pourcentage de blastes mesuré en fonction du pourcentage de blaste théorique

On observe une linéarité correcte, la pente de la droite est de 1,2 et le coefficient de corrélation est de 0.99.

1.4. Evaluation de la représentativité des prélèvements

Nous avons mesuré le pourcentage de cellules CD34+ pour chaque prélèvement de MRD analysé, ainsi que sur 6 moelles de référence.

Prélèvement	CD34 absolu	CD34 % cellules totales	CD34 % cellules mononucléées
1(M20)	21551	14,429	26,6
1(M22)	77893	34,199	36
2(M24)	6420	5,438	7,3
3(J35)	2321	3,681	7,2
3(M24)	4572	1,612	4
4(M5)	2392	0,681	1,1
5(M6)	48	0,028	0,3
6(J35)	19999	15,872	23,46
6(M5)	4444	3,878	13,5
6(M11)	13901	5,567	11,4
7(J35)	1203	1,101	1,32
7(M6,5)	2304	3,598	6,2
7(M9)	5979	2,251	3,7
8(J35)	1626	2,201	3,3
8(J70)	2382	1,317	2,8
8(M6)	7003	1,676	5,8
9(J35)	2037	0,95	2
9(J70)	3787	1,984	4,6
10(J35)	8869	2,534	4
11(J35)	2377	0,6	2
11(M4,5)	3440	2,7	9
12(J35)	966	0,97	4,9
12(J70)	1538	0,657	3
13(J70)	7222	2,414	9,3
14(J35)	4775	1,592	5,5
MO normale 1	2 080	2,1	3,9
MO normale 2	2 600	5	8
MO normale 3	6 400	2	9
MO normale 4	5 300	3,1	10
MO normale 5	4730	1,3	5,3
MO normale 6	5 290	1,5	6,5

Tableau 10 : Nombre absolu et pourcentage de cellules CD34+ pour chaque prélèvement et 6 moelles de référence

Nous observons que sur des moelles osseuses de référence, non hémodiluées au vu de l'aspect en morphologie conventionnelle, le pourcentage de cellules CD34 était supérieur à 2% des cellules mononucléées.

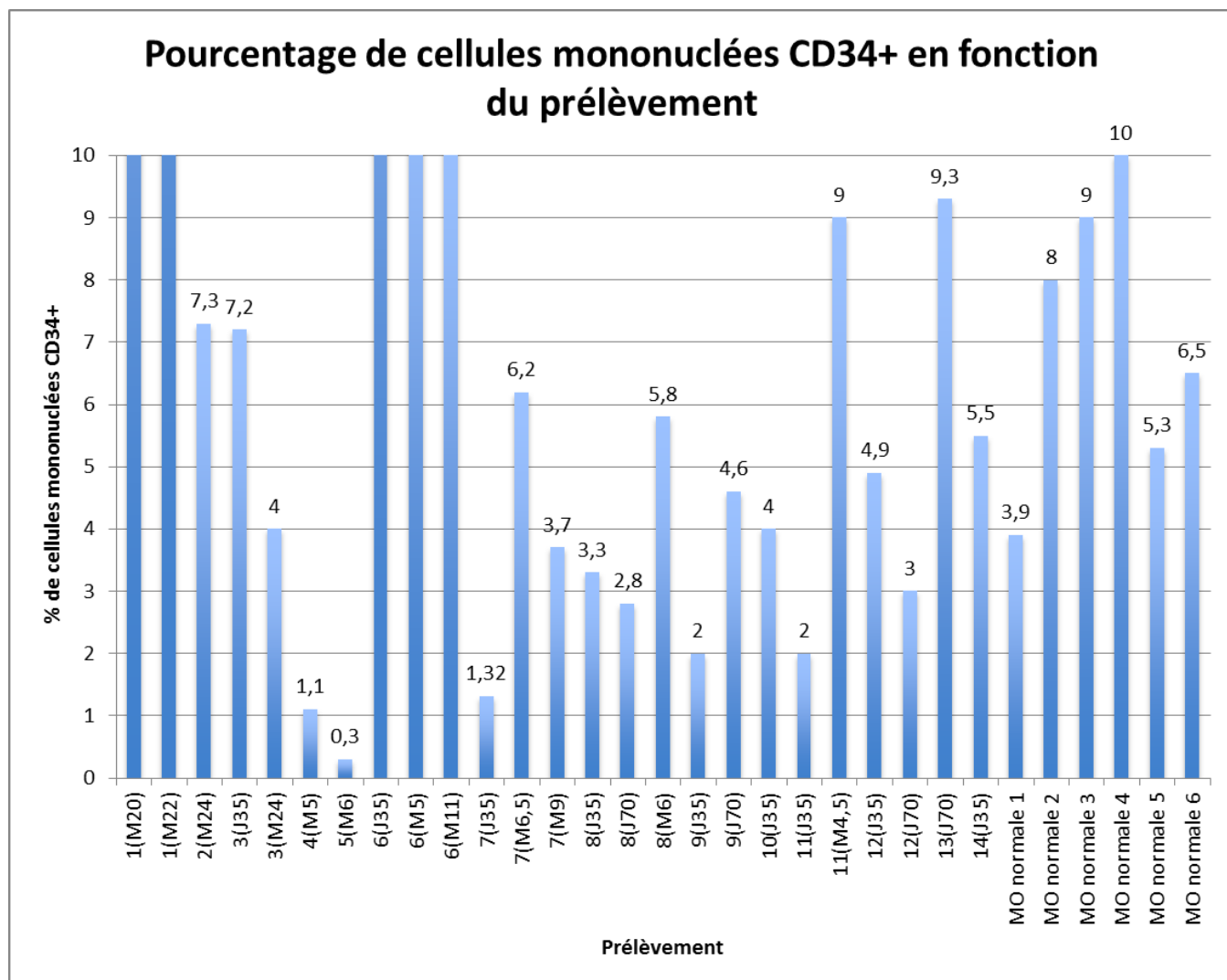


Figure 36 : pourcentage de cellules mononucléées CD34+ pour chaque prélèvement et 6 moelles de référence

On observe que 20% de nos prélèvements présentaient un pourcentage de CD34+ inférieur ou égal à ce chiffre.

2. Résultats de la MRD chez les patients

2.1. Etude de moelles témoins

Nous avons étudié 4 et 5 échantillons de moelles de référence pour le marquage respectivement par les combinaisons 1 et 2, moelles issues de patients en phase de rémission de LAL-B ou LAM, en sortie d'aplasie, et pour lesquelles une étude de la MRD avait été prescrite. Ces marquages de moelles de référence nous ont permis de définir si physiologiquement des cellules médullaires expriment les mêmes LAIP que nos patients. A partir de là nous avons définis des seuils « physiologiques » pour chacun des LAIP observés chez les patients. En effet, si le LAIP du patient peut être exprimé par des cellules normales, alors lors de la quantification de la MRD il existe un risque de surestimation de la MRD, les événements positifs pouvant être de véritables blastes leucémiques résiduels, mais pouvant aussi correspondre à des cellules normales.

Pour chaque combinaison, nous avons créé une moelle virtuelle en compilant les événements acquis à partir de 4 ou 5 moelles de référence (fonction « merge » du logiciel Kaluza©). Sur ce « merge » de moelles, les moelles peuvent être analysées individuellement ou de manière globale comme une moelle virtuelle unique. Cette technique permet à la fois de s'affranchir des variations individuelles et d'analyser un plus grand nombre d'événements autorisant ainsi une détermination plus précise des seuils physiologiques qui nous ont servi de valeurs de références.

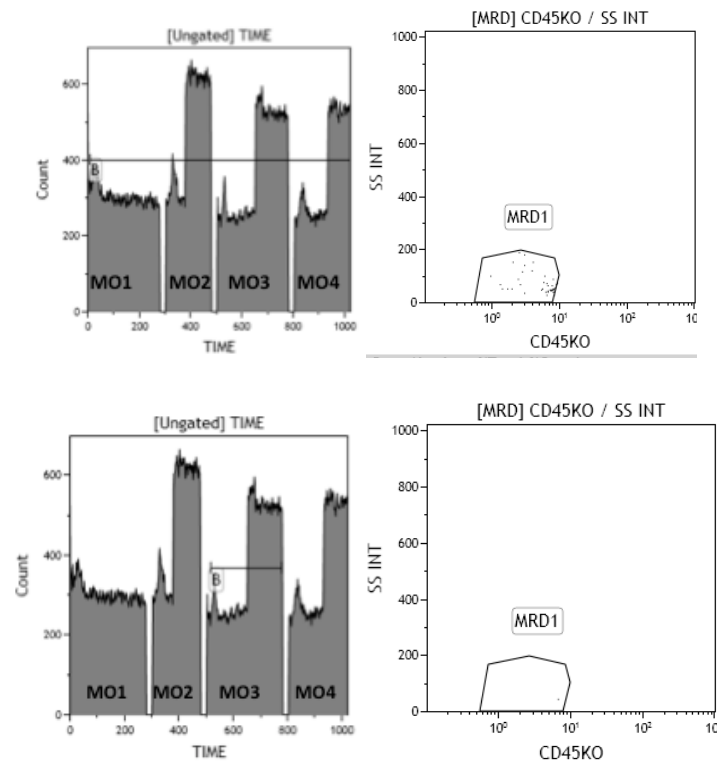


Figure 38 : Cluster obtenu lors de l'analyse des 4 moelles analysées en 1 seule moelle virtuelle, et cluster obtenu pour 1 moelle analysée individuellement après marquage par la combinaison 1

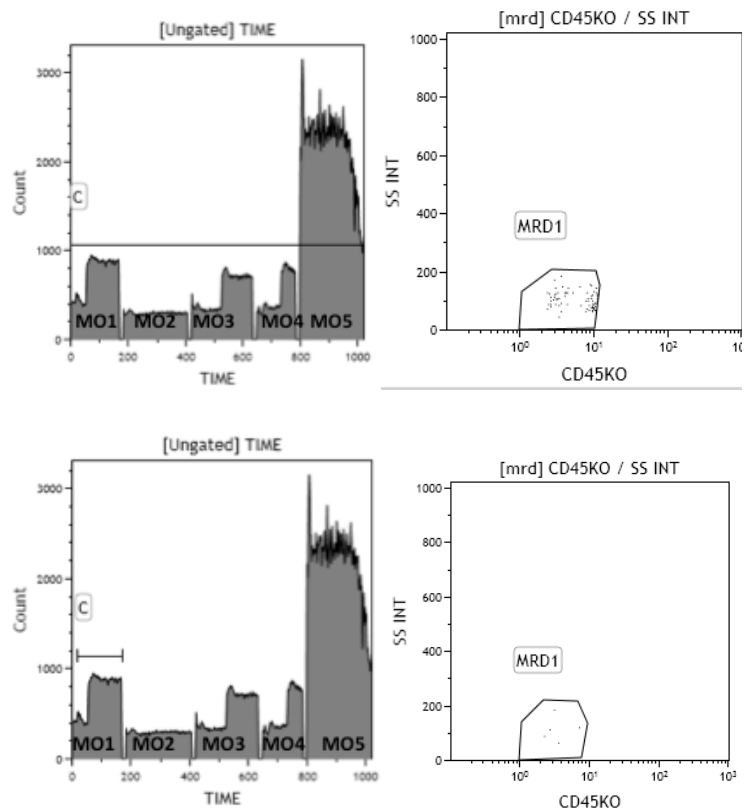


Figure 39 : Cluster obtenu lors de l'analyse des 5 moelles analysées en 1 seule moelle virtuelle, et cluster obtenu pour 1 moelle analysée individuellement après marquage par la combinaison 2

Le seuil de positivité de chaque LAIP était calculé comme suit : le pourcentage de MRD observé pour chaque moelle normale était relevé, une moyenne de ces valeurs de MRD était calculée, ainsi que l'écart type.

Le seuil de positivité était défini comme étant égal à la **moyenne + 2 écart-types**.

Voici les seuils que nous avons obtenus pour chaque LAIP :

Patient	LAIP	Seuil (moyenne +2ET)	% minimal	% maximal
1	CD99++ / CD3c+ / CD5 d'intensité faible / CD1a- / CD3s-	0,09	0,004	0,08
2	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s-	0,01	0	0,006
3	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a- / CD3s+	0	0	0
4	CD99+ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s-	0,08	0,009	0,06
5	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a- / CD3s+	0	0	0
6	CD99+ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0,13	0,012	0,1
7	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a- / CD3s+	0,07	0,007	0,05
8	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0	0	0
9	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0,008	0	0,007
10	CD99+ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0,008	0	0,006
11	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a- / CD3s-	0	0	0
12	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0	0	0
13	CD99++ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+	0	0	0
14	CD99+ / CD3c+ / CD5+ / CD1a+ / CD3s+d'intensité faible	0	0	0

Tableau 11 : Valeurs de références obtenues avec la combinaison intracellulaire pour les différents LAIP

Patient	LAIP	Seuil (moyenne+2ET)	% minimal	% maximal
1	CD7+ / CD2- / CD3s- / CD8- / CD5+ / CD34+ / CD10- / CD4-	0,07	0	0,06
2	CD7++ / CD2+ / CD3s- / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4+	0	0	0
3	CD7+ / CD2- / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34+ / CD10+ / CD4+	0,01	0	0,009
4	CD7+ / CD2+ / CD3s- / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4+	0,1	0,004	0,03
5	CD7++ / CD2- / CD3s+ / CD8- / CD5+ / CD34+ / CD10+ / CD4+	0,09	0	0,09
6	CD7+ / CD2+ / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10- / CD4-	0,1	0,001	0,09
7	CD7+ / CD2- / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34+ / CD10+ / CD4+	0,03	0	0,025
8	CD7+ / CD2+ / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10- / CD4+	0,03	0	0,03
9	CD7+ / CD2+ / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34+ / CD10+ / CD4+ et double positivité CD4/CD8	0,2	0	0,2
10	CD7+ / CD2+ / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4+	0,09	0	0,09
11	CD7++ / CD2+ / CD3s- / CD8+ / CD5+ / CD34+ / CD10+ / CD4+	0,03	0	0,03
12	CD7+ / CD2+ / CD3s- / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4-	0,01	0	0,008
13	CD7+ / CD2+ / CD3s- / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4+	0,09	0,01	0,09
14	CD7+ / CD2+ / CD3s+ / CD8+ / CD5+ / CD34- / CD10+ / CD4+	0,04	0	0,04

Tableau 12 : Valeurs de références obtenues avec la combinaison membranaire pour les différents LAIP

2.2. Nombre d'évènements acquis lors de la recherche de la MRD

Afin d'atteindre une sensibilité minimum de 10^{-4} il est important qu'au moins 100 000 cellules soient analysées. Plus le nombre de cellules analysées est important, plus la sensibilité augmente.

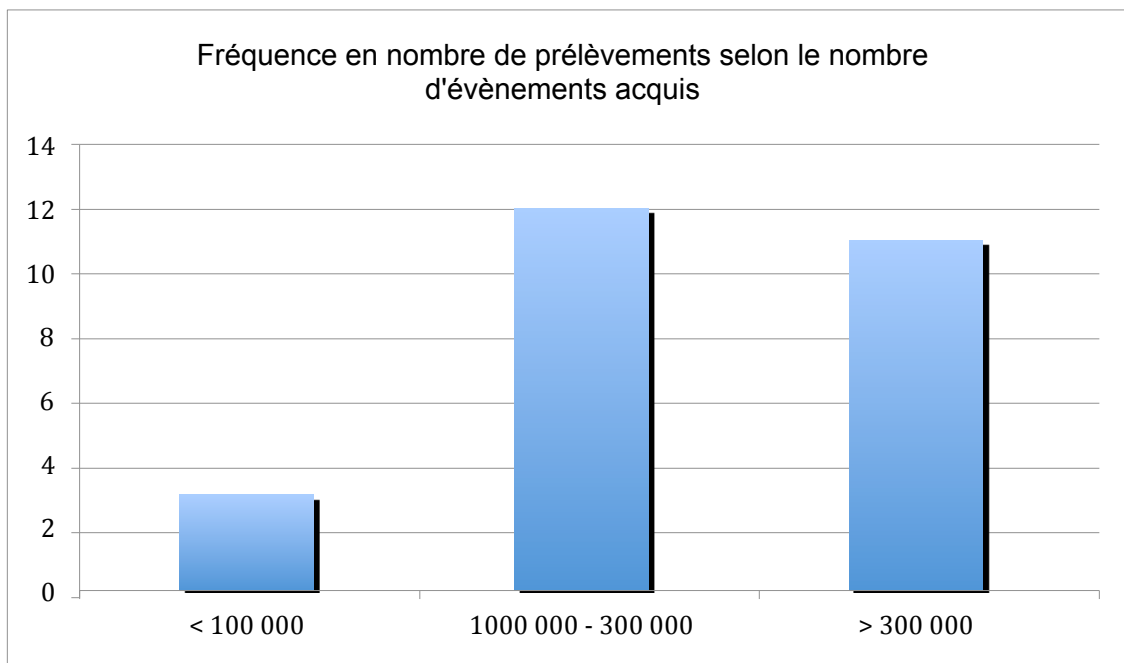


Figure 40 : Répartition du nombre de prélèvements en fonction du nombre de cellules analysées pour la recherche de MRD

Voici ce que nous obtenons :

- 3 prélèvements présentaient moins de 100 000 cellules analysées,
- 12 prélèvements avaient entre 100 000 et 300 000 cellules analysées,
- Et pour 11 prélèvements plus de 300 000 cellules étaient analysées.

Une sensibilité de 10^{-4} n'a donc pas pu être atteinte dans 3 cas sur 24, soit dans 13% des cas. Pour ces trois échantillons la sensibilité était de 4.10^{-4} et 3.10^{-4} .

2.3. LAIP au diagnostic

2.3.1. Nombre de patients autorisant un suivi de la MRD en CMF

Les 14 patients inclus possédaient tous au moins un LAIP au diagnostic, et ont donc tous pu bénéficier d'un suivi de leur maladie résiduelle en cytométrie en flux.

Un patient ne pouvait bénéficier du suivi de sa maladie résiduelle par technique de biologie moléculaire du fait de l'absence de réarrangement.

2.3.2. Répartition des types de LAIP au diagnostic

Le tube intracytoplasmique permettait de mettre en évidence des LAIP de type asynchronisme de maturation et variation d'intensité et/ou présence de précurseurs lymphoïdes T. Ces LAIP sont décrits en détail pour chaque patient dans les tableaux 11 et 12.

Le tube membranaire permettait de mettre en évidence des LAIP de type variation d'intensité, trou phénotypique.

2.4. Analyse de la MRD (deux lecteurs indépendants)

Les résultats pour chacun des échantillons ont été analysés et interprétés biologiquement par deux lecteurs indépendants, en aveugle du résultat de la biologie moléculaire.

1) Résultats

Voici les tableaux des résultats obtenus par chacun des lecteurs pour les 2 combinaisons d'anticorps.

Tube intracellulaire des patients 1 à 8								
Patient (point de suivi)	Lecteur 1				Lecteur 2			
	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique
1 (M20)	149 677	10 916	12,7	positive à 13% au seuil de 0,09%	149 000	13 300	9,2	positive à 9,2% au seuil de 0,09%
1 (M22)	255 115	82 302	37,5	positive à 37% au seuil de 0,09%	255 000	237 000	57	positive à 57% au seuil de 0,09%
2 (M24)	122 770	2	0,002	Négative au seuil de 0.01%	122 000	4	0,003	Négative au seuil de 0.01%
3 (J35)	64 897	4	0,011	négative au seuil de 0%	64 000	17	0,028	négative au seuil de 0%
3 (M24)	269 517	0	0	Négative au seuil de 0%	262 000	0	0	Négative au seuil de 0%
4 (M5)	205 431	82	0,05	négative au seuil de 0,08%	205 000	43	0,05	négative au seuil de 0,08%
5 (M6)	178 561	0	0	Négative au seuil de 0%	180 000	0	0	Négative au seuil de 0%
6 (J35)	160 285	403	0,429	positive à 0,4% au seuil de 0,13%	160 000	622	0,45	positive à 0,4% au seuil de 0,13%
6 (M5)	135 994	10	0,026	Négative au seuil de 0,13%	136 000	9	0,013	Négative au seuil de 0,13%
6 (M8)	307 087	99	0,13	négative au seuil de 0,13%	310 000	344	0,12	négative au seuil de 0,13%
6 (M11)	432 369	11	0,005	négative au seuil de 0,13%	429 000	4	0,002	négative au seuil de 0,13%
7 (J35)	92 074	20	0,02	Négative au seuil de 0,07%	60 800	14	0,024	Négative au seuil de 0,07%
7 (M6,5)	95 597	0	0	Négative au seuil de 0,07%	95 700	10	0,02	Négative au seuil de 0,07%
7 (M9)	429 344	4	0,003	Négative au seuil de 0,07%	243 200	6	0,002	Négative au seuil de 0,07%

Tableau 13 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube intracellulaire des patients 1 à 8

Tube intracellulaire des patients 8 à 14								
Patient (point de suivi)	Lecteur 1				Lecteur 2			
	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique
8 (J35)	231 557	0	0	Négative au seuil de 0%	138 000	0	0	Négative au seuil de 0%
8 (J70)	472 522	0	0	Négative au seuil de 0%	234 800	0	0	Négative au seuil de 0%
8 (M6)	211 300	0	0	Négative au seuil de 0%	478 500	0	0	Négative au seuil de 0%
9 (J35)	444 763	0	0	Négative au seuil de 0,008%	543 000	29	0,008	Négative au seuil de 0,008%
9 (J70)	361 222	0	0	Négative au seuil de 0,008%	366 000	0	0	Négative au seuil de 0,008%
10 (J35)	457 115	0	0	Négative au seuil de 0,008%	421 000	0	0	Négative au seuil de 0,008%
11 (J35)	416 996	0	0	Négative au seuil de 0%	417 000	0	0	Négative au seuil de 0%
11 (M4,5)	301 987	1	0,002	Négative au seuil de 0%	310 000	1	0,001	Négative au seuil de 0%
12 (J35)	196 472	0	0	Négative au seuil de 0%	198 500	0	0	Négative au seuil de 0%
12 (J70)	486 739	0	0	Négative au seuil de 0%	490 000	0	0	Négative au seuil de 0%
13 (J70)	233 175	0	0	Négative au seuil de 0%	234 000	0	0	Négative au seuil de 0%
14 (J35)	462 677	0	0	Négative au seuil de 0%	295 600	5	0,002	Négative au seuil de 0%

Tableau 14 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube intracellulaire des patients 8 à 14

Tube membranaire des patients 1 à 8								
Patient (point de suivi)	Lecteur 1				Lecteur 2			
	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique
1 (M20)	149 362	7 714	10,583	positive à 10,5% au seuil de 0,07%	154 000	15 500	10,7	positive à 10,7% au seuil de 0,07%
1 (M22)	227 766	129 342	63,127	positive à 63% au seuil de 0,07%	59 000	42 000	72	positive à 72% au seuil de 0,07%
2 (M24)	143 250	0	0	Négative au seuil de 0%	85 000	0	0	Négative au seuil de 0%
3 (J35)	63 060	3	0,008	négative au seuil de 0,01%	62 000	0	0	Négative au seuil de 0,01%
3 (M24)	283 549	4	0,005	négative au seuil de 0,01%	269 000	0	0	négative au seuil de 0,01%
4 (M5)	349 153	182	0,08	négative au seuil de 0,1%	348 000	84	0,034	négative au seuil de 0,1%
5 (M6)	169 639	0	0	négative au seuil de 0,09%	173 000	0	0	négative au seuil de 0,09%
6 (J35)	122 683	177	0,256	Positive à 0.256% au seuil de 0,1%	124 900	153	0,15	positive à 0,15% au seuil de 0,1%
6 (M5)	107 053	3	0,012	négative au seuil de 0,1%	108 000	3	0,006	négative au seuil de 0,1%
6 (M8)	348 112	23	0,03	négative au seuil de 0,1%	343 000	67	0,09	négative au seuil de 0,1%
6 (M11)	253 124	12	0,01	négative au seuil de 0,1%	260 000	9	0,008	négative au seuil de 0,1%
7 (J35)	109 309	9	0,009	négative au seuil de 0,03%	107 000	23	0,022	négative au seuil de 0,03%
7 (M6,5)	64 038	1	0,003	négative au seuil de 0,03%	62 700	0	0	négative au seuil de 0,03%
7 (M9)	347 464	0	0	négative au seuil de 0,03%	178 900	0	0	négative au seuil de 0,03%

Tableau 15 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube membranaire des patients 1 à 8

Tube membranaire des patients 8 à 14								
Patient (point de suivi)	Lecteur 1				Lecteur 2			
	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique	nombre de cellules acquises	MRD (en nombre d'événements)	MRD (en %)	Interprétation biologique
8 (J35)	174 857	14	0,019	négative au seuil de 0,03%	78 200	1	0,003	négative au seuil de 0,03%
8 (J70)	390 029	1	0,001	négative au seuil de 0,03%	147 000	14	0,025	négative au seuil de 0,03%
8 (M6)	134 500	0	0	négative au seuil de 0,03%	426 000	4	0,003	négative au seuil de 0,03%
9 (J35)	246 473	20	0,022	négative au seuil de 0,2%	198 000	18	0,01	négative au seuil de 0,2%
9 (J70)	191 638	12	0,013	négative au seuil de 0,2%	193 000	39	0,04	négative au seuil de 0,2%
10 (J35)	350 101	21	0,01	négative au seuil de 0,09%	357 000	172	0,078	négative au seuil de 0,09%
11 (J35)	410 919	27	0,021	négative au seuil de 0,03%	421 000	43	0,015	négative au seuil de 0,03%
11 (M4,5)	126 904	1	0,003	négative au seuil de 0,03%	152 800	0	0	négative au seuil de 0,03%
12 (J35)	104 630	4	0,019	Négative au seuil de 0,01%	93 700	6	0,03	Négative au seuil de 0,01%
12 (J70)	278 081	4	0,007	Négative au seuil de 0,01%	279 000	5	0,009	Négative au seuil de 0,01%
13 (J70)	315 858	16	0,016	négative au seuil de 0,09%	302 000	2	0,001	négative au seuil de 0,09%
14 (J35)	299 844	0	0	négative au seuil de 0,04%	109 000	0	0	négative au seuil de 0,04%

Tableau 16 : Résultats de la MRD et interprétation biologique en fonction des seuils obtenus pour les moelles témoins pour le tube membranaire des patients 8 à 14

La comparaison des résultats obtenus par les 2 lecteurs montre que :

- 23 MRD sont négatives, 3 sont positives,
- Les deux combinaisons détectent une MRD positive supérieure à 0,1% pour le prélèvement 6 (J35),

- Les 2 prélèvements de MRD du patient 1 sont retrouvés avec une MRD positive supérieure à 1% dans les 2 combinaisons,
- 23 prélèvements sont interprétés négatifs par les 2 lecteurs (MRD inférieure au seuil physiologique).

2) Influence de l'opérateur sur la valeur de MRD obtenue

- Combinaison 1 :

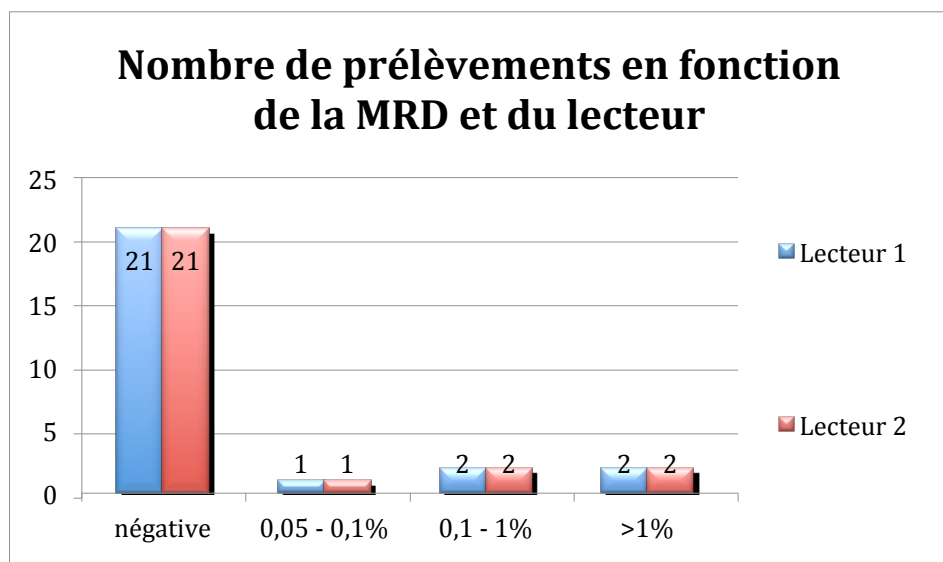


Figure 41 : Répartition des pourcentages de MRD détectée avec la combinaison 1 par deux lecteurs différents

- Combinaison 2 :

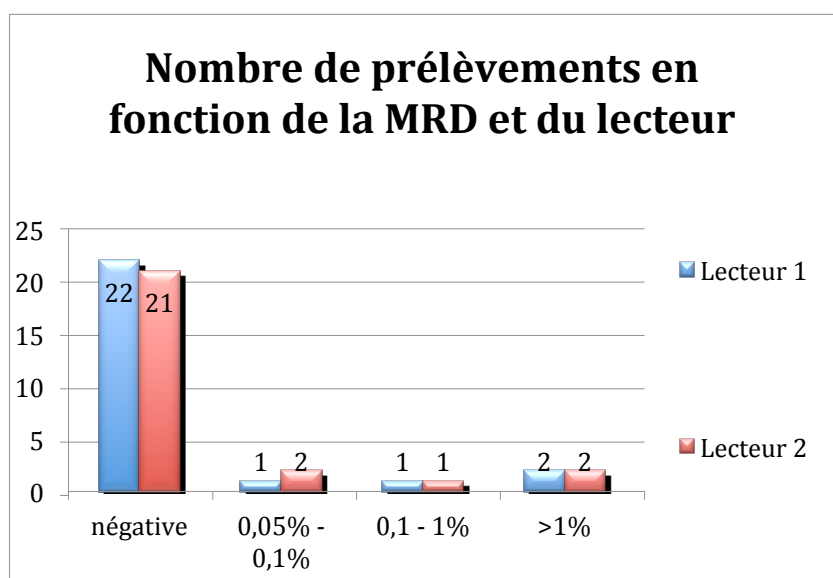


Figure 42 : Répartition des pourcentages de MRD détectée avec la combinaison 2 par deux lecteurs différents

Pour les deux combinaisons, le lecteur 1 comme le lecteur 2 obtiennent une MRD<0,05% pour 21 prélèvements, et une MRD>0,05% pour 5 prélèvements (dont seulement 3 seront interprétées positives du fait des seuils physiologiques).

Pour la combinaison 2, on observe un résultat discordant : la maladie résiduelle 10(J35) est quantifiée à 0,01% par le lecteur 1 et 0,078% par le lecteur 2. Cependant le seuil « physiologique » de ce LAIP était élevé (0,09%), et l'interprétation biologique est rendue négative par les 2 lecteurs.

3) Comparaison des interprétations lecteur 1 / lecteur 2

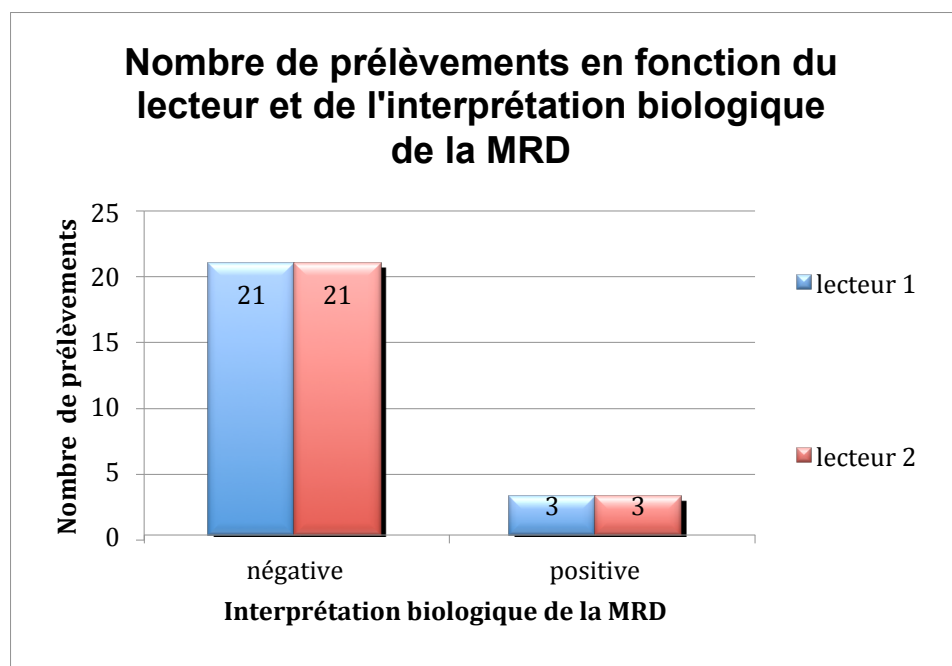


Figure 43 : Interprétation biologique de la MRD pour les 26 prélèvements par deux lecteurs différents

En terme de quantification de la MRD, les résultats obtenus sont homogènes quel que soit le lecteur pour la combinaison 1 intracellulaire. Une discordance est retrouvée avec la combinaison 2.

Cependant, en termes d'interprétation biologique, une concordance de 100% entre les 2 lecteurs est retrouvée.

Au total, une MRD n'a été interprétée positive que pour deux patients, à deux points de suivi pour le premier, et uniquement en MRD1 pour le second.

2.5. Comparaison aux résultats de biologie moléculaire

2.5.1. Résultats

Afin d'évaluer la fiabilité du suivi de la MRD par technique de cytométrie en flux, nous avons comparé les résultats que nous avons obtenus en cytométrie pour nos patients avec ceux obtenus en biologie moléculaire.

Les résultats de MRD par technique CMF sont obtenus en faisant une moyenne des résultats des 2 lecteurs et des 2 combinaisons.

Interprétation biologique des MRD analysées				
Patient (point de suivi)	CMF		BM	Glissement antigénique
	Conclusion	Remarques	Conclusion	
1 (M20)	positive		non réalisable	non
1 (M22)	positive		non réalisable	non
2 (M24)	négative		négative	non
3 (J35)	négative		négative	non
3 (M24)	négative		négative	non
4 (M5)	négative	moelle infiltrée d'érythroblastes, faible sensibilité	positive	non
5 (M6)	négative	pureté 34%	négative	non
6 (J35)	positive	LAIP suivi peu spécifique	négative	non
6 (M5)	négative		négative	non
6 (M8)	négative		négative	non
6 (M11)	négative		négative	non
7 (J35)	négative	moelle infiltrée d'érythroblastes: faible sensibilité	positive non quantifiable	non
7 (M6,5)	négative		négative	non
7 (M9)	négative		négative	non
8 (J35)	négative		négative	non
8 (J70)	négative		négative	non
8 (M6)	négative		négative	non
9 (J35)	négative	moelle infiltrée d'érythroblastes: faible sensibilité	positive	non
9 (J70)	négative		négative	non

10 (J35)	négative	pureté 35%	négative	non
11 (J35)	négative	moelle infiltrée d'érythroblastes	positive	diminution CD3cyto
11 (M4,5)	négative		négative	diminution CD3cyto
12 (J35)	négative	pureté 36%	négative	non
12 (J70)	négative		négative	non
13 (J70)	négative		non réalisée	non
14 (J35)	négative	pureté 34%	négative	non

Tableau 17 : *Interprétation biologique des 26 MRD analysées par CMF et biologie moléculaire (en surligné les résultats discordants)*

Les résultats sont concordants dans 18 cas sur 23 (soit 78%). Les MRD sont retrouvées négatives par les deux techniques.

La maladie résiduelle du patient 1 n'a pas été réalisée en biologie moléculaire du fait de l'absence de réarrangement retrouvé au diagnostic. Cependant, la clinique et la cytologie confirme notre résultat puisque le patient a été diagnostiqué comme en rechute à partir du point de suivi M20.

La MRD M5 du patient 4 est retrouvée négative en CMF, et positive en biologie moléculaire. L'échantillon analysé comportait 55% d'érythroblastes.

La MRD J35 du patient 6 est retrouvée positive en CMF et négative en PCR. Le suivi était réalisé sur le LAIP suivant CD34 -, CD10-, CD5+, CD8+, CD3s+, CD2+, CD7+, CD1a+, CD4-, CD99+, CD3c +, CD48 diminué qui est peu spécifique puisque retrouvé à hauteur de 0,13% sur nos moelles témoins. La sensibilité de détection ne peut être bonne sur ce type de LAIP.

La MRD J35 du patient 7 est retrouvée positive non quantifiable par PCR, et négative en CMF. La moelle analysée en CMF est composée de 55% d'érythroblastes et comprend de nombreux débris cellulaires. La sensibilité technique de la CMF est donc faible pour ce prélèvement.

Les MRD J35 des patients 9 et 11 étaient négatives en CMF et positives en biologie moléculaire. Pour ces 2 patients les moelles étaient infiltrées d'érythroblastes (51 et 48% d'érythroblastes respectivement).

L'étude de la MRD par PCR n'a pas pu être réalisée pour le patient 13 du fait d'un nombre de cellules insuffisant pour réaliser l'extraction d'ADN.

2.5.2. Etude des discordances

Nous observons donc 5 résultats discordants :

1) Prélèvement 4 MRD(M5)

Faux négatif en CMF. Ce patient avait 19 ans et présentait une LAL-T III hyperleucocytaire, avec envahissement méningé et cortico-résistance. Il présentait une translocation SIL-TAL et une trisomie 8. La biologie moléculaire retrouve des réarrangements des gènes des chaînes gamma (VG1J1J2 et VG1J1/2 et VG11J1J2) et delta (VD1JD1) du TCR.

Le LAIP au diagnostic est le suivant : CD99++, CD3cyto+, CD5+, CD1a+, CD3s-, CD7+, CD2+, CD8+, CD34-, CD10+ de faible intensité, présence d'une double positivité CD4/CD8.

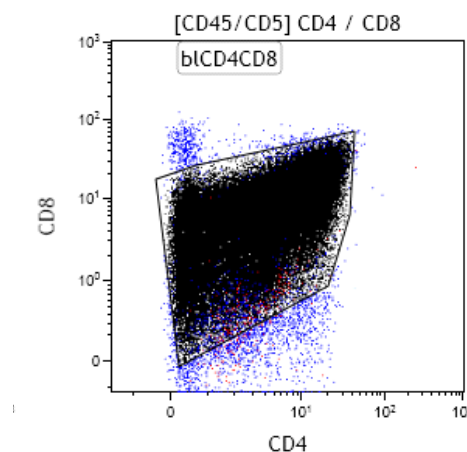


Figure 44 : LAIP des blastes du patient 4, présence d'une double positivité CD4/CD8

Le patient était traité par le protocole GRAALL 2005. L'hémogramme à J8 objectivait une corticorésistance.

Ce point de suivi était réalisé à 5 mois du diagnostic, après une chimiothérapie de rattrapage suite à une première rechute :

- Le myélogramme ne montrait pas d'excès de blastes,
- La quantification de la MRD en biologie moléculaire était positive 0,2%,
- La quantification de la MRD est négative en CMF à 0,05% pour un seuil physiologique de 0,08% pour la combinaison 1, et à 0,05% pour un seuil à 0,1% pour la combinaison 2. Il n'était pas observé de glissement antigénique. La sensibilité technique en CMF était de 2.10^{-4} .

Lors de l'analyse du prélèvement en cytométrie, nous objectivons une moelle infiltrée d'érythroblastes avec la présence de 50% d'érythroblastes, ainsi que la présence de nombreux éléments lytiques dus aux étapes de congélation et décongélation. Ces cellules lysées et érythroblastiques présentes en grand nombre diminuaient le nombre de cellules disponibles pour la quantification de la MRD, et diminuaient donc notre sensibilité technique. L'étude de la MRD par PCR inclut la réalisation d'un Ficoll®, l'analyse de la MRD s'affranchi de la présence d'érythroblastes, ce qui permet à la biologie moléculaire d'obtenir une meilleure sensibilité.

De plus, pour ce patient les seuils de détection de 0,08 et 0,1% posaient un problème de spécificité.

Nous ne possédons pas de prélèvement de suivi ultérieur à ce point de suivi pour ce patient, cependant, il rechutait à nouveau 1 mois plus tard.

2) Prélèvement 6 MRD(J35)

Faux positif en CMF. Ce prélèvement provient d'un patient de 3 ans présentant une LAL-TIII hyperleucocytaire à caryotype normal, sans envahissement méningé initial. La biologie moléculaire retrouve des réarrangements des gènes des chaînes gamma (VGIIJ1J2) et delta (VD2DD3) du TCR.

Le LAIP au diagnostic est le suivant : CD34 -, CD10-, CD5+, CD8+ faible, CD3s+, CD2+, CD7+, CD1a+, CD4-, CD99+, TDT faible intensité, CD3c +, CD48 diminué.

Des marqueurs des deux combinaisons forment le LAIP.

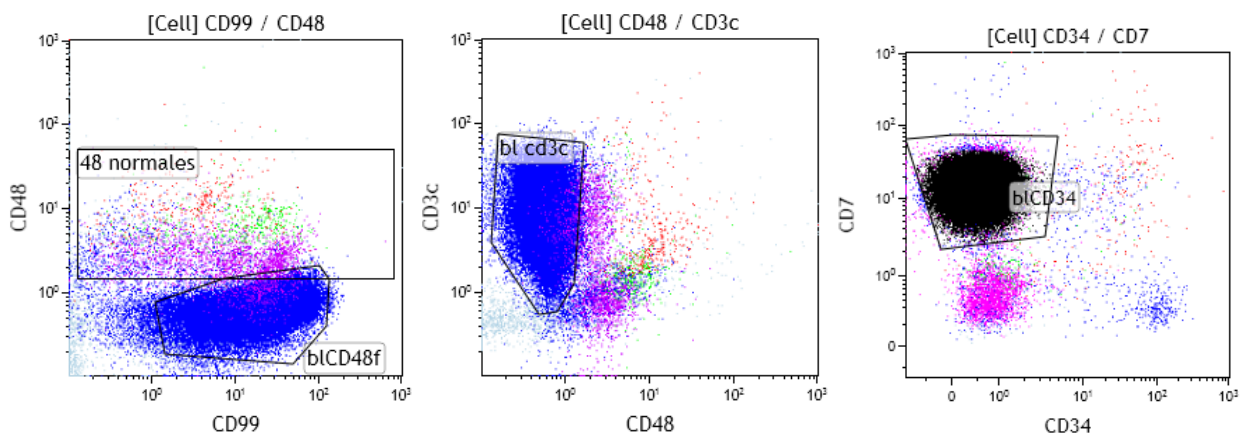


Figure 45 : LAIP des blastes du patient 6

Le patient était traité par le protocole EORTC 58081. L'hémogramme réalisé à J8 du début de la corticothérapie objectivait une corticorésistance (82% de blastes). Le patient présentait 2 facteurs de mauvais pronostic : hyperleucocytose au diagnostic, et corticorésistance. Il rentrait alors dans le bras VHR du protocole EORTC.

Ce premier point de suivi correspondait au J35 :

- Le myélogramme montrait une rémission cytologique,
- La quantification de la MRD en biologie moléculaire était négative avec une sensibilité de 5.10^{-4} ,
- La CMF retrouvait une MRD positive à 0,3% pour un seuil de détection à 0,13%. Sur ce LAIP nous observons un réel problème de spécificité, le LAIP étant exprimé par 0,13% de cellules médullaires physiologiques. La sensibilité technique était de 3.10^{-4} .

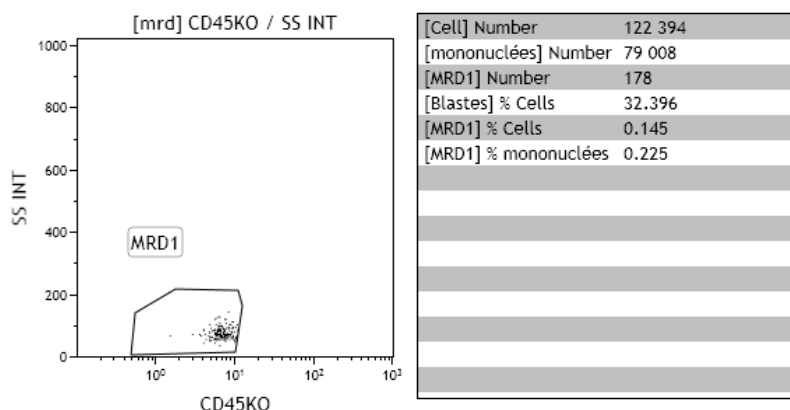


Figure 46 : MRD du prélèvement 6(J35)

Depuis, les prélèvements effectués au début et à la fin de la phase intermédiaire montraient une rémission cytologique et moléculaire. La MRD était retrouvée négative en CMF également pour ces 2 points de suivi.

3) Prélèvement 7 MRD(J35)

Négatif en CMF et positif non quantifiable en biologie moléculaire. Ce prélèvement provient d'un enfant de 14 ans, présentant une LAL-TII non hyperleucocytaire, à caryotype complexe, avec envahissement méningé initial. La biologie moléculaire retrouve des réarrangements des gènes codant pour les chaînes lourdes des immunoglobulines (FR1 et FR3), et des réarrangements des gènes des chaînes gamma (VG1J1J2 et VG10J1J2) et delta (VD1JD1 et DD2JD1) du TCR, ainsi qu'un transcrit de fusion HOX11L2. Le LAIP détecté au diagnostic est le suivant : CD34-, CD3+, CD5+, CD7+, CD99++, CD3cyto++, CD10++, CD48 diminué.

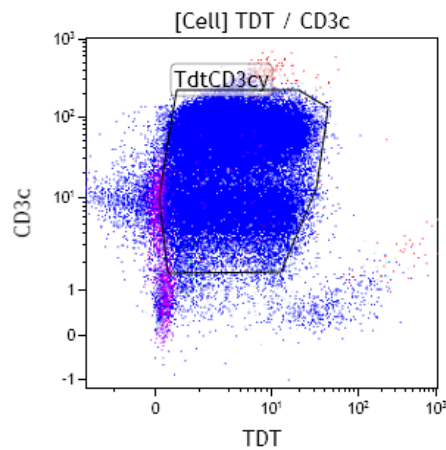


Figure 47 : LAIP des blastes du patient 7

Le patient était traité par le protocole EORTC 58081 dans le bras VHR. Le patient était cortico-sensible.

Ce premier point de suivi correspondait au J35 :

- Le myélogramme objectivait une rémission cytologique,
- La MRD en biologie moléculaire était positive non quantifiable, inférieure au seuil de 10^{-4} pour le marqueur JH6 et positive non quantifiable, inférieure au seuil de $5 \cdot 10^{-4}$ pour le marqueur Vd1,
- La MRD était négative à 0,02% en CMF avec une sensibilité technique de $3 \cdot 10^{-4}$. Il n'est pas observé de glissement antigénique. Un cluster de 20 cellules type LAIP est observé. Le seuil physiologique pour ce LAIP est de 0,07% pour le tube intracellulaire et 0,03% pour le tube membranaire.

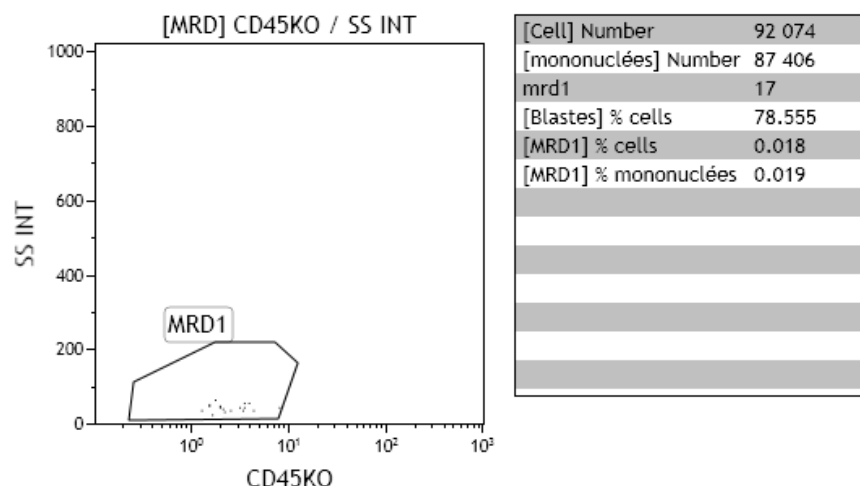


Figure 48 : MRD du prélèvement 7(J35)

Les 2 points de suivi de MRD suivant étaient négatifs en biologie moléculaire et en CMF. Le patient est actuellement à 1 an de son diagnostic, il n'a pas présenté de rechute.

La MRD quantifiée au deuxième point de suivi (J70) était négative en biologie moléculaire et en CMF.

4) Prélèvement 9 MRD(J35)

Faux négatif en CMF. Ce prélèvement est issu d'un patient de 15 ans atteint d'une LAL-TIII non hyperleucocytaire. La biologie moléculaire retrouve au diagnostic des chaînes gamma (VGIJP1/2) et delta (Ja29) du TCR.

La cytométrie en flux retrouve le LAIP suivant : TdT+, CD99++, CD3cyto++, CD48 diminué, CD34+, CD1a+, une double positivité CD4/CD8, et une double population en CD3s.

Le patient était inclus dans le protocole EORTC, bras AR2-T, il était cortico-inévaluable à J8.

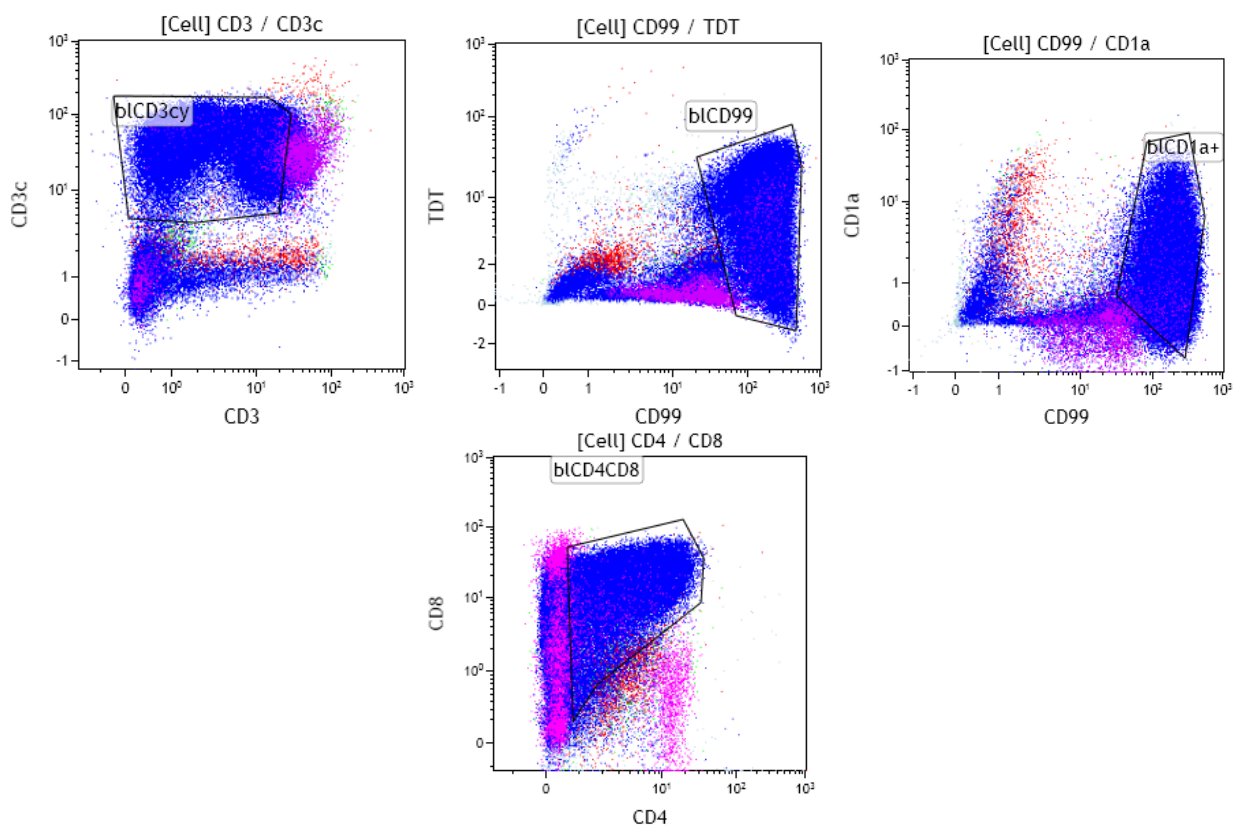


Figure 49 : LAIP des blastes du patient 9

Au point de suivi à J35 la MRD était positive à 0,107% de blastes en biologie moléculaire.

En cytométrie, la sensibilité technique était de 2.10^{-4} , la pureté du prélèvement était de 66%, la MRD était négative 0,004% avec la combinaison intracellulaire, et à 0,016% avec la combinaison membranaire. Le seuil de détection pour le tube membranaire était de 0,2%, le LAIP observé avec ce tube est donc peu spécifique. De plus, le rpélèvement contenait plus de 50% d'érythroblastes.

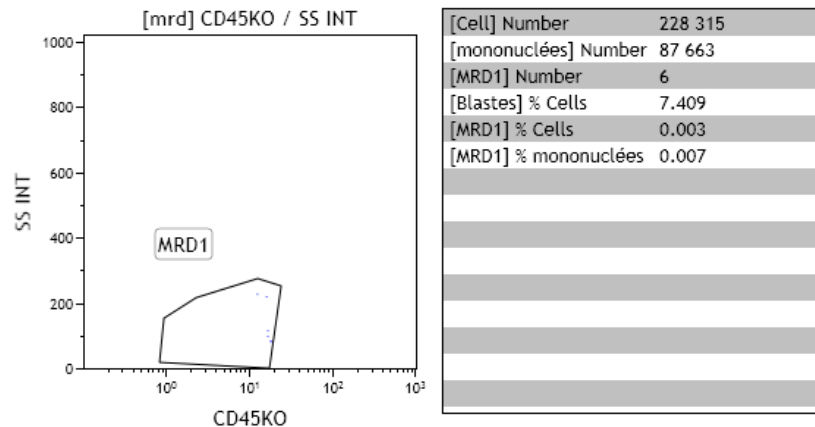


Figure 50 : MRD du prélèvement 9(J35)

5) Prélèvement 11 MRD(J35)

Faux négatif en CMF. Ce prélèvement provient d'un patient de 10 ans présentant une LAL-TII hyperleucocytaire, avec une délétion 13q22 au caryotype, avec envahissement méningé initial et syndrome tumoral médiatisal.

Au diagnostic, la biologie moléculaire retrouve des réarrangements des gènes des chaînes gamma (VGIJ1J2 et VG9J1J2) du TCR, ainsi qu'un transcrit HOX11L2 et NUP214-ABL.

Le LAIP au diagnostic est le suivant : CD99++, CD3cyto+, CD3s-, CD48 diminué, CD8-, CD2 diminué.

La patiente était traitée par le protocole EORTC 58081, elle était cortico-résistante à J8, et était incluse dans le bras VHR du protocole.

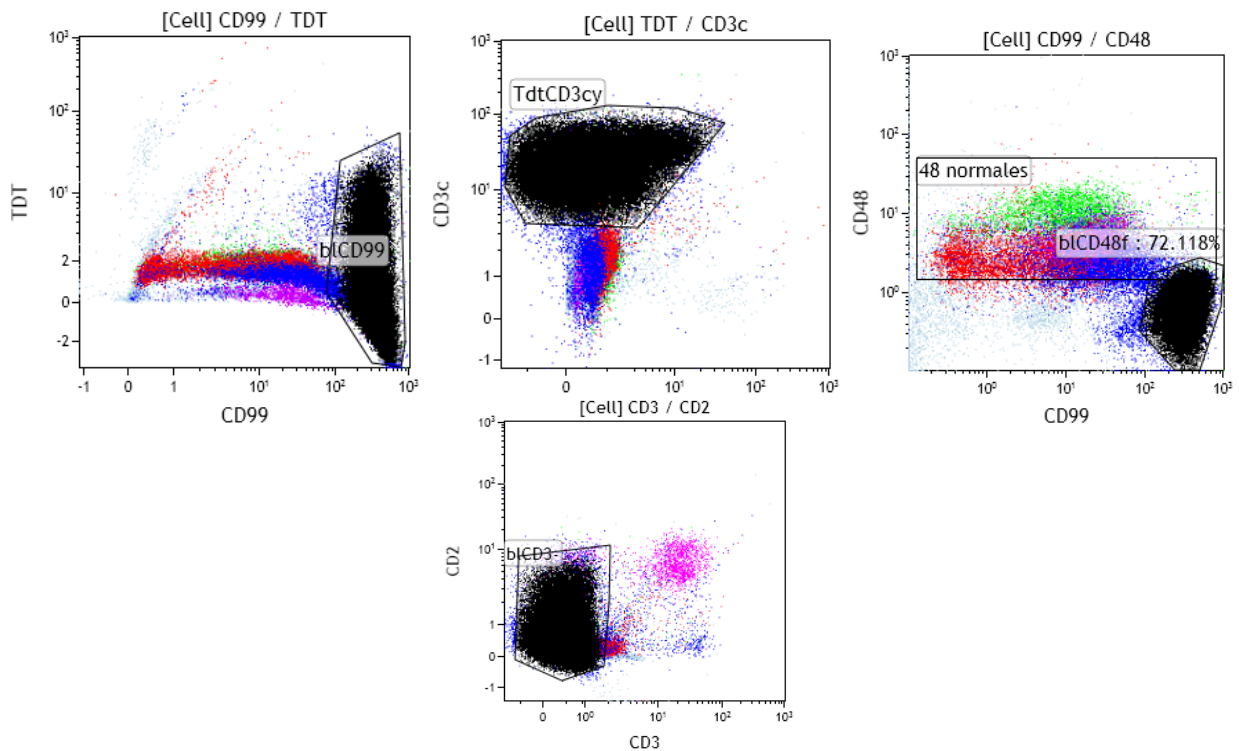


Figure 51 : LAIP des blastes du patient 11

Au point de suivi J35, elle était en rémission cytologique.

La quantification de la MRD était de 0,009% (valeur entre 0 et 0,021% selon le lecteur) en cytométrie en flux avec une sensibilité technique de $4 \cdot 10^{-4}$. On observait un switch antigénique de type diminution de l'expression du CD3 intracytoplasmique.

En biologie moléculaire la MRD était positive à 0,2% de blastes.

La moelle osseuse était composée de 51% d'érythroblastes, on retrouve donc un problème de sensibilité, avec peu de cellules mononucléées disponibles pour l'analyse de la MRD malgré plus de 400 000 événements acquis.

Au deuxième point de suivi à J70, la maladie résiduelle était négative en CMF et en biologie moléculaire ($< 5 \cdot 10^{-4}$). Elle entrait donc en rémission moléculaire. Fin juin elle débutait la phase intermédiaire.

6) Bilan de l'étude des discordances

Au total, les discordances observées correspondaient à 1 résultat faux positif et 4 résultats faux négatifs. On retrouve pour tous les prélèvements discordants soit un problème de sensibilité (moelle composée de plus de 50% d'érythroblastes), soit un problème de spécificité avec des seuils physiologiques élevés.

2.6. Impact de l'hémodilution sur l'interprétation du résultat.

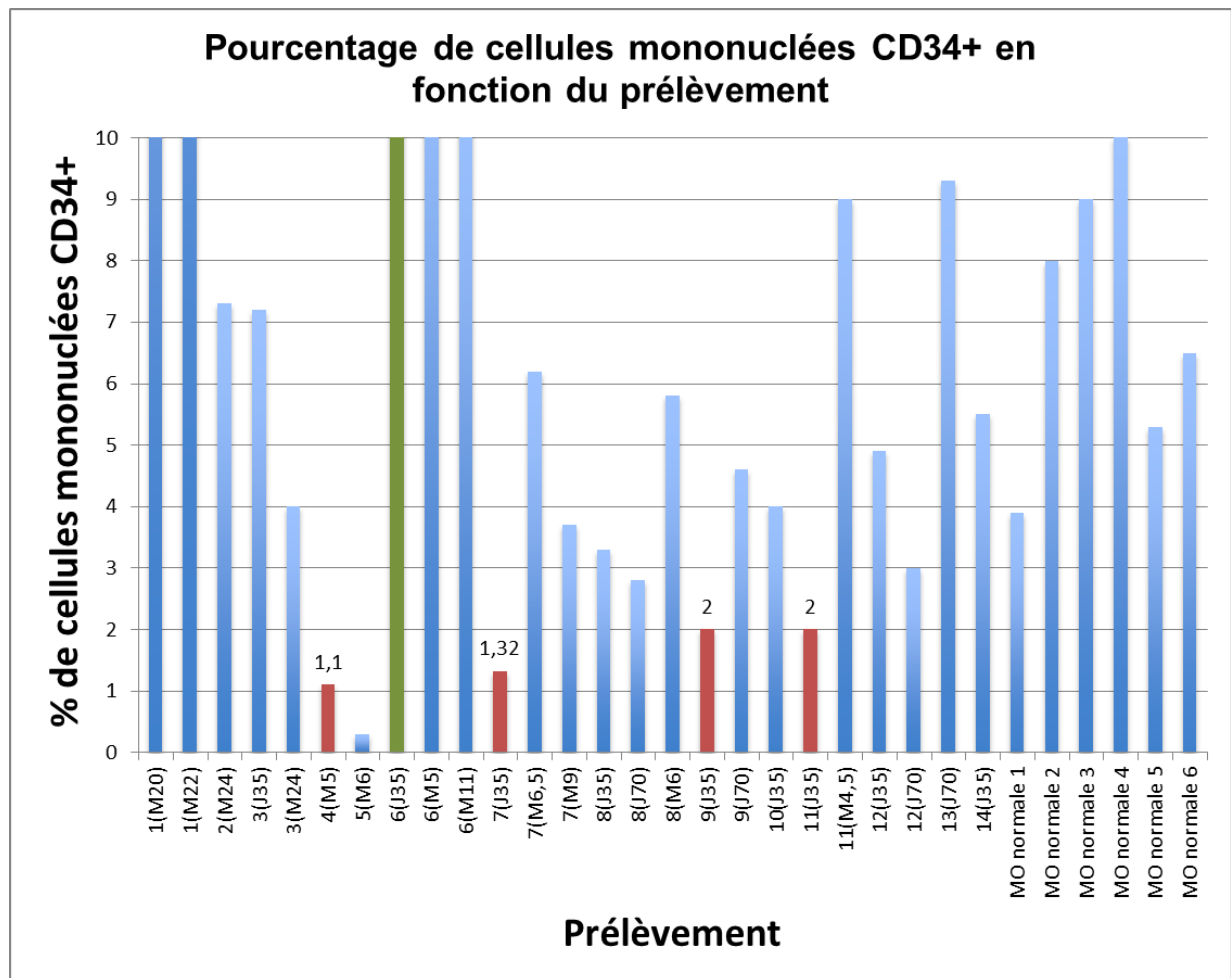


Figure 52 : Pourcentage de cellules mononuclées CD34+, avec en rouge les résultats faussement négatifs, et en vert le prélèvement faussement positif

Nous observons que 20% des échantillons totaux et 100% des échantillons faussement négatifs contenaient moins de 2% de cellules mononuclées CD34+.

Parmi les prélèvements pour lesquels les résultats étaient discordants entre la CMF et la biologie moléculaire, nous pouvons observer que :

- Les 4 échantillons pour lesquels on observait un résultat faussement négatif en CMF par rapport à la biologie moléculaire contenaient moins de 2% de cellules CD34. Ces prélèvements comportant peu de cellules médullaires, la sensibilité technique ne pouvait pas être élevée et cela contribue à expliquer la négativité des résultats.

- L'échantillon 6(J35) pour lequel on retrouvait un résultat faussement positif en CMF était composé de 20% de cellules CD34+. Il était donc de bonne qualité et la présence d'autant de cellules immatures nous laisse à penser que notre résultat positif n'est peut-être pas erroné.

Au total : avant de rendre un résultat de MRD pour un patient, il est important de systématiquement évaluer la qualité du prélèvement grâce au pourcentage de cellules CD34+. En dessous d'un seuil de 2%, en cas de résultat négatif il faudra se poser la question de la pertinence de rendre le résultat au clinicien au vu du risque de résultat faussement négatif par manque de sensibilité.

2.7. Comparaison de nos résultats de MRD à l'évolution clinique

A la clôture de notre étude, les patients inclus ont bénéficié d'un suivi entre 5 et 36 mois, le temps moyen de suivi est de 21,8 mois.

2.7.1. Patients avec une MRD négative au premier point de suivi

Parmi les 11 patients dont la MRD a été négative dès le premier point de suivi, 1 patient a rechuté.

Il s'agit du **patient 3** qui présentait une LAL-T IV, avec 2 facteurs de mauvais pronostic : une hyperleucocytose et une cortico-résistance. Il était muté HOX11L2 et présentait une monosomie 8 au caryotype. La rechute a eu lieu à 3 mois du diagnostic. A J35, il était en rémission cytologique, la quantification de la MRD effectuée était négative à la fois en biologie moléculaire et en CMF. En cours de phase de consolidation, à M3, on notait l'apparition de blastes dans le LCR, définissant une rechute méningée, l'indication de greffe était posée. Il était greffé à M6, la MRD pré-greffe en biologie moléculaire était négative inférieure au seuil de 10^{-4} pour le marqueur JJ et négative inférieure au seuil de 10^{-5} pour le marqueur Jd1 (on ne disposait pas de prélèvement en CMF pour ce point de suivi). A 18 mois post-greffe le patient est en rémission cytologique et moléculaire avec une MRD négative en biologie moléculaire, qui était retrouvée négative en CMF.

2.7.2. Patients avec une MRD positive

Parmi les 3 patients dont la MRD était positive en CMF (patients 1, 4 et 6), deux ont rechuté et sont décédés (patients 1 et 4) respectivement à 2 et 1 ans du diagnostic. Le patient 6 avait une MRD négative en BM et est en rémission complète.

- Le **patient 1** était âgé de 57 ans. Il présentait une LAL-T II traitée par le protocole GRAALL 2005. Il était cortico-résistant à J8 et était allogreffé à M7. Le patient entrait en rémission cytologique. La MRD ne pouvait être suivie en BM du fait de l'absence de réarrangement.

Le myélogramme réalisé à un an de la greffe (M19 du diagnostic) ne retrouvait pas d'excès de blastes (3%). Un mois et demi plus tard, la mise en évidence de blastes circulants induisait la réalisation d'un myélogramme sur lequel il était retrouvé 78% de blastes. Le patient présentait donc une rechute médullaire à 21 mois (M21) du diagnostic. Le patient décédait 4 mois plus tard (M25).

La rechute était donc objectivée sur le myélogramme à M21. Or, l'analyse rétrospective en cytométrie en flux du prélèvement réalisé à M19 objective la présence d'une MRD à 10%. Le patient n'ayant pas de réarrangement et ne pouvant être suivi en biologie moléculaire, le suivi de la MRD en CMF aurait permis d'anticiper le diagnostic de rechute de 1,5 mois par rapport à la cytologie.

- Le **patient 4** avait 19 ans et présentait une LAL-T III hyperleucocytaire, avec envahissement méningé, et cortico-résistance. Il présentait une translocation SIL-TAL et une trisomie 8. Il était traité par le protocole GRAALL 2005. Il entrait en première rémission cytologique à J35.

Il présentait une première rechute médullaire et méningée à M4, puis entrait en deuxième rémission complète. Il rechutait à nouveau à M6. Il était allogreffé 15 jours plus tard. La MRD réalisée un mois avant la deuxième rechute (M5) était positive en biologie moléculaire. En CMF elle était retrouvée négative, cependant, la sensibilité technique était faible pour 2 raisons :

- ▶ La moelle comprenait 51% d'érythroblastes,
- ▶ On notait lors de l'analyse la présence de très nombreux débris cellulaires correspondant à des cellules lysées sur le frottis.

Ces 2 éléments réduisaient le nombre de cellules viables disponibles pour la quantification de la MRD.

Il présentait une troisième rechute, médullaire et méningée à M8 et bénéficiait d'une deuxième allogreffe (M8). Il entrait en rémission complète médullaire et méningée au décours. Deux mois plus tard, à M10, il présentait une nouvelle rechute neuroméningée (M10.) Le décès survenait à M12.

2.7.3. MRD et greffe

Quatre patients ont été greffés (1, 3, 4 et 5).

- Pour les patients 1, 4, et 5, patients adultes, la décision de greffe était prise sur les facteurs de mauvais pronostic présents au diagnostic.

Le patient 1 a rechuté 14 mois après la greffe. Nous ne disposons pas de prélèvement pour ce patient en pré-greffe ni en post-greffe et ne pouvons donc pas évaluer l'impact pronostic de la MRD.

Le patient 4 était greffé suite à 2 rechutes. Nous ne disposons pas de prélèvement de moelle prélevé en pré ou post-greffe.

Les deux sont décédés.

La patiente 5 était traitée selon le protocole GRAALL 2005, était cortico et chimio-résistante. Elle a bénéficié d'une allogreffe de sang placentaire à M3. Elle a depuis eu 1 point de suivi de MRD, à J100 post greffe, qui était négatif en biologie moléculaire et en CMF. Elle n'a pas présenté de rechute et est actuellement à 14 mois de suivi du diagnostic.

- Le patient 3, enfant de 12 ans, était greffé suite à une rechute méningée. Nous ne possédons pas de point de suivi encadrant la greffe. Il est à 30 mois de suivi du diagnostic et n'a pas présenté de nouvelle rechute. Son dernier point de suivi correspondant à la fin du traitement était négatif en BM et en CMF.

2.7.4. MRD et facteurs de risques

- Les 3 patients qui ont rechuté (patients 1, 3 et 4) étaient cortico-résistants, deux étaient hyperleucocytaires au diagnostic et un présentait un envahissement méningé.
- Les 2 patients chez lesquels nous avons retrouvé une MRD positive en CMF (patients 1 et 6) présentaient des facteurs de mauvais pronostic : ils étaient cortico-résistants et hyperleucocytaires, le patient 6 présentait également un syndrome tumoral.
- Parmi les 11 patients ayant une MRD négative en CMF tout au long de leur suivi, deux patients étaient cortico-résistants (patients 3 et 11), 3 étaient hyperleucocytaires (patients 3, 5, 11), 1 présentait une mutation de HOX11L2 et NUP214-ABL (patient 11) (association de mauvais pronostic), 3 présentaient un envahissement méningé (patients 4, 7 et 11) et 8 un syndrome tumoral (patients 2, 3, 8, 9, 10, 11, 12 et 14) au diagnostic.
- La patiente 11 possède de nombreux facteurs de mauvais pronostic. Sa MRD était négative en CMF à J35 mais positive en BM, elle était négative dans les 2 techniques à J70. Elle n'a pas présenté de rechute, mais nous ne sommes qu'à 6 mois du diagnostic. Les rechutes dans les LAL-T surviennent le plus souvent dans les deux premières années suivant le diagnostic, il sera intéressant de voir si les prochains points de suivi de MRD de cette patiente se négativent en BM, et de suivre l'évolution clinique.

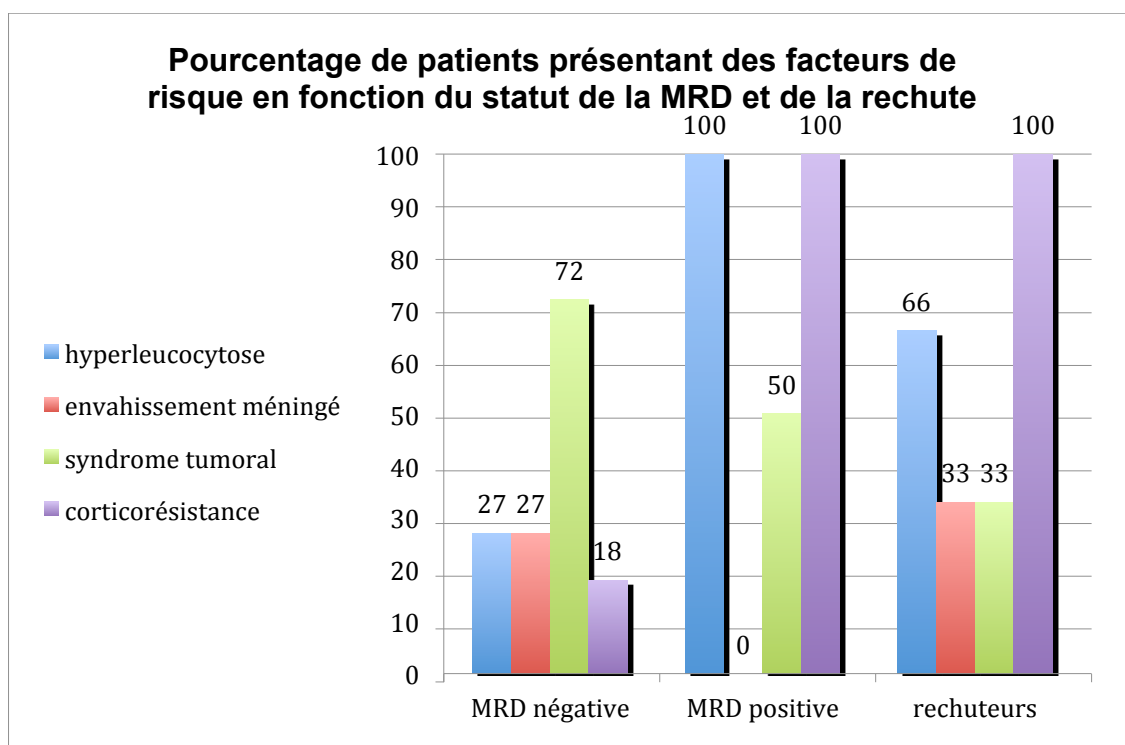


Figure 53 : Pourcentage de patients présentant un facteur de risque donné en fonction de son taux de MRD et pour les patients rechuteurs

DISCUSSION

Le suivi de la MRD dans les LAL-T en cytométrie en flux nous a imposé dans un premier temps de lever les obstacles méthodologiques suivants. Nous avons pu dans second temps comparer les résultats de la CMF à ceux de la méthode de référence.

1. Méthodologie

1.1. Choix du panel d'anticorps

La détection de la MRD au niveau médullaire dans les LAL T est relativement facilitée du fait de l'absence théorique de précurseurs lymphoblastiques T dans la moelle osseuse. Une combinaison d'anticorps permettant d'identifier ce type de cellules peut apparaître comme suffisante.

Jusqu'à récemment, la plupart des équipes effectuaient la quantification de la maladie résiduelle en cytométrie en flux dans les LAL-T avec des cytomètres 4 ou 5 couleurs. Leur panel d'anticorps était de ce fait plus limité et se composait des marqueurs suivants: CD99, TdT, CD7, sCD3, cCD3, CD5, et nécessitait au moins 2 tubes, voire 3. Certaines équipes ajoutaient les CD34, CD10 et CD1a, augmentant alors le nombre de tubes et donc le nombre de cellules nécessaires pour l'analyse. Dans tous les cas la stratégie consistait à identifier les précurseurs T immatures. (17,40,61,74–79)

Au laboratoire, nous avons la possibilité de travailler avec des cytomètres 10 couleurs. Outre les anticorps utilisés dans ces études précédentes, nous avons donc pu ajouter d'autres anticorps. Notre choix était motivé par les données suivantes.

Les antigènes TdT et CD99 peuvent subir des variations d'intensité d'expression importantes au cours de l'évolution de la maladie et suite au traitement, en particulier par la Prednisolone (75,80). Nous avons choisi d'ajouter des marqueurs d'intensité plus stable au cours du traitement : CD2, CD8, CD4. Nous avons choisi d'étudier également le CD48 qui a été rapporté par Wood comme étant un marqueur spécifique des blastes et ayant un taux d'expression stable au cours de l'évolution de la maladie (69). En effet, une des difficultés du suivi de la MRD par la cytométrie en flux est le phénomène de glissement antigénique. Lors de l'évolution de la maladie, et notamment sous chimiothérapie le

phénotype des blastes leucémiques peut varier. Certains antigènes vont voir leur niveau d'expression diminuer ou disparaître, d'autres augmenter, c'est ce qu'on appelle le "switch" ou glissement antigénique. Dans ces cas, le LAIP n'est alors plus identique à celui identifié au diagnostic, et si notre panel d'anticorps et notre masque d'analyse ne permettent pas d'identifier ces glissements antigéniques il existe un risque de rendre un résultat de MRD faussement négatif. Le fait d'avoir une approche multiparamétrique avec 8 à 10 couleurs utilisées par combinaison d'anticorps permet de repérer plus facilement ces glissements antigéniques, et de pouvoir analyser la maladie résiduelle en présence d'un glissement.

Nous avons donc réparti nos anticorps d'intérêt sur 2 tubes :

- Un tube TdT/ CD99/ CD3cyto/ CD5/ CD1a/ CD3/ CD48/ CD45,
- Et un tube CD7 / CD2/ CD3/ CD8 / CD5/ CD56-CD16/ CD34/ CD10/ CD4/ CD45.

Le premier tube comprend à la fois des marqueurs intracytoplasmiques et de surface et vise à détecter "l'immaturité" des cellules. Le deuxième est composé exclusivement de marqueurs de surface. Ce tube exclusivement membranaire a été un choix motivé par le fait que les LAIP dans les LAL-T sont souvent de type variation d'intensité, or l'étape de perméabilisation lors du marquage intracytoplasmique peut engendrer une altération du marquage de surface et donc un biais (81). Notre combinaison membranaire est finalement proche de celle proposée par Roshal, mise à part l'ajout dans notre tube du CD10 et permet de s'affranchir de cette source de biais méthodologique.

Le choix de notre panel a été validé :

- 100% de nos patients présentaient au moins un LAIP, pouvaient donc voir le suivi de leur maladie résiduelle réalisé en CMF,
- Notre panel a été testé sur des sangs et des moelles de référence, objectivant le comportement des cellules physiologiques vis-à-vis de nos anticorps,
- Nos deux tubes sont complémentaires. Le tube membranaire permet l'analyse des LAL-T matures, et permet de repérer les glissements antigéniques. Le tube intracellulaire cible des antigènes spécifiques de LAIP (marqueurs d'immaturité),
- Le CD48, anticorps peu utilisé dans la littérature, a démontré son intérêt dans l'opérateur booléen de sélection de la MRD en étant toujours exprimé plus faiblement par les blastes leucémiques que par les cellules normales. Ainsi nous avons confirmé les données de Wood (69).
- Nous n'avons pas observé de problème de compensation entre les différents fluorochromes,
- La répartition des anticorps du panel sur seulement 2 tubes permet de réduire le nombre de cellules nécessaires à l'analyse.

1.2. Sensibilité et spécificité

1.2.1. Facteurs pouvant influencer la sensibilité

Le niveau de sensibilité atteint lors d'une analyse de maladie résiduelle est lié aux conditions techniques : qualité du prélèvement (hémodilution), nombre de cellules analysées, et temps d'acquisition.

Le nombre de cellules analysées est conditionné par le temps d'acquisition au cytomètre et par le nombre de tubes constituant le panel. La constitution de notre panel, qui ne nécessitait que deux tubes pour effectuer l'analyse, permettait de faire l'acquisition d'au moins 100 000 événements pour les deux combinaisons en 15 minutes. De ce fait le temps d'acquisition n'était pas un paramètre bloquant dans ce travail. La médiane du nombre d'événements analysés était de 232 366. Ainsi dans notre travail, la sensibilité technique moyenne était de 0,011% (valeurs extrêmes allant de 0,04% à 0,006%) pour le tube intracellulaire et de 0,013% (0,05% à 0,007%) pour le tube membranaire. Ceci est proche des objectifs théoriques qui sont d'obtenir une sensibilité de 10^{-4} (40,82,83). Actuellement la stratification thérapeutique se fait sur des taux de MRD >1% à j35 ou >0,1% à J70, notre sensibilité technique permet d'atteindre ces valeurs avec de la marge.

Classiquement le paramètre d'évaluation de l'hémodilution est la formule de Brooimans. Notre travail étant rétrospectif il nous a fallu trouver un autre mode d'évaluation de la représentativité du prélèvement analysé. Il nous a semblé que l'évaluation de la présence dans le prélèvement de cellules à domiciliation purement médullaire était un moyen d'y parvenir. Nous avons retenu les précurseurs hématopoïétiques comme cible. En effet notre panel de marquage incluait le CD45 et le Cd34. L'étude des moelles de référence nous a montré que plus de 2% des cellules mononucléées sont CD34+ quand une moelle n'est pas hémodiluée (84,85). Nous observons que 20% des échantillons totaux et 100% des échantillons faussement négatifs contenaient moins de 2% de cellules mononucléées CD34+. Ceci confirme l'importance de la prise en compte de ce paramètre dans l'évaluation de la MRD afin d'éviter de rendre des résultats faussement négatifs. La qualité du prélèvement conditionne de manière importante la sensibilité de la MRD. L'importance de la prise en compte de la représentativité de la moelle et de l'absence d'hémodilution est également retrouvée dans l'étude coopérative menée par le French Multicenter Study Group for pediatric and adult ALL (62). Le meilleur estimateur d'hémodilution de la moelle reste cependant à définir.

1.2.2. Facteurs pouvant influencer la spécificité

L'identification des blastes résiduels repose sur leurs différences immunophénotypiques d'avec les cellules de la moelle normale.

1) Cas particulier des LAL Early T

Il est particulièrement difficile d'identifier les lymphoblastes T les moins engagés dans la différenciation lymphoïde T qui sont observés dans les LAL de type early T (20).

L'étude combinée des niveaux d'expression des CD5, CD8 et CD1a permet de suspecter un immunophénotype leucémique de type Early T : CD5 faible, CD1a négatif, CD8 négatif, associés à la présence de marqueurs myéloïdes ou de cellule souche hématopoïétique. Cette expression fréquente de marqueurs myéloïdes rend parfois difficilement différenciables les LAL Early T des LAM0. De plus, elles présentent des profils mutationnels plus proches de ceux observés dans les LAM que dans les LAL T. L'équipe de Grossmann (86) a montré que 27% des Early T présentaient une mutation de RUNX1 (contre 7% des LAL non ETP), mutation habituellement connue pour être présente dans 30% des LAM ; l'équipe de Zhang (23) retrouvait des mutations de RUNX1 et FLT3 chez les patients ETP. Dans ces 2 études ces mutations étaient plus fréquemment retrouvées dans les ETP que dans les non ETP-LAL.

Même si notre panel autorise l'identification de ces cas, les leucémies de type early T sont mieux suivies grâce à l'association du panel de MRD LAM et de notre tube membranaire.

2) Autres LAL-T

Deux grandes stratégies permettent d'identifier les cellules leucémiques résiduelles :

- La première est une identification positive reposant sur les LAIP observés au diagnostic que nous cherchons à mettre en évidence dans les prélèvements de suivi. Une des limites d'utilisation de la CMF comme méthode de quantification de la MRD avec cette stratégie serait l'absence d'expression de marqueurs aberrants au diagnostic. Dans la littérature, on retrouve que plus de 95% des LAL-T possèdent un LAIP (87–90)

Dans notre étude, au moins un LAIP dans chaque tube a été mis en évidence au diagnostic pour tous nos patients, le suivi de la MRD pouvait donc se faire pour tous par technique de cytométrie en flux.

- La deuxième repose sur l'identification de cellules ne faisant pas partie des éléments physiologiques de la moelle. Pour cette dernière stratégie, il n'est pas forcément essentiel d'avoir le profil phénotypique des cellules du diagnostic, en revanche il est nécessaire d'avoir une grande expertise des moelles normales. C'est pourquoi nous avons étudié avec notre méthodologie un panel de moelles de références et avons ainsi montré la présence de cellules qui expriment un phénotype proche de précurseurs T qui seraient extra-thymiques. Théoriquement, les précurseurs T sont localisés dans le thymus et le thymus n'exporte que des cellules T matures. Cependant plusieurs équipes ont montré l'existence de précurseurs T dans la moelle osseuse qui sont à l'origine de la colonisation

thymique. Cette domiciliation intra thymique des précurseurs lymphoïdes T n'apparaît pas toutefois absolue puisque certains auteurs décrivent la possibilité de migration de précurseurs lymphoïdes T à différents stade de différenciation vers d'autres organes. En revanche ces précurseurs extra thymiques ne connaîtront pas de différenciation (3–6).

Nos résultats sur des moelles normales confirment la présence de cellules médullaires possédant des marqueurs d'immaturité de la lignée T, et présentant parfois un immunophénotype très proche de lymphoblastes thymiques. Les valeurs observées pour ces « précurseurs T » médullaire allaient de 0 à 0,1%. Notre étude des moelles normales confirme qu'il existe un passage de cellules physiologiques thymiques dans la moelle et que ces précurseurs T influent sur la spécificité de la MRD.

Par ailleurs nous avons également observé des cellules présentant des phénotypes proches ou semblables aux LAIP présents chez les patients. Les valeurs observées variaient entre 0 et 0,2%. Ces cellules peuvent avoir des caractéristiques immunophénotypiques communes avec les lymphoblastes leucémiques, les fenêtres "blastiques" de notre masque d'analyse sont ainsi contaminées, et la quantification de la MRD pouvait être surestimée. Ceci nous a amené à définir des valeurs de références pour chacun des LAIP à partir des moelles témoins.

La présence d'un LAIP peu spécifique est un facteur limitant pour l'étude de la maladie résiduelle par technique de cytométrie en flux, et justifie l'étude systématique de moelles normales et la détermination de seuils de détection propres à chaque patient et à chaque LAIP.

- Enfin, concernant les glissements antigéniques, ceux-ci surviennent surtout sur les marqueurs d'immaturité (CD99, TdT, CD10) et sont donc observés sur le tube 1 intracellulaire. Le fait que notre panel comprenne un tube exclusivement membranaire permet de palier à l'existence potentielle d'un glissement antigénique. En effet, en cas de glissement touchant le tube 1, la combinaison 2 permettra une quantification de la MRD s'affranchissant de ce switch et donc sans risque de résultat faussement négatif.

De plus l'analyse systématique de moelles normales permet de détecter la présence de cellules présentant un immunophénotype non physiologique, et donc de détecter la présence de blastes résiduels en cas de glissement antigénique.

Dans notre travail un seul patient présentait un switch. Il s'agissait d'une diminution du CD3 intracytoplasmique, et concernait donc le tube 1 intracellulaire uniquement. Le tube membranaire permettait donc de palier à ce switch et de quantifier la MRD sans risque de faux négatif.

1.3. Faisabilité

La faisabilité du suivi de la maladie résiduelle par technique de cytométrie en flux dépend de plusieurs facteurs :

- Des conditions techniques : pour être assez sensible, il faut analyser un nombre important de cellules, idéalement plus de 500 000 par tubes. Comme nous disposons de 0,5ml de moelle osseuse, ce nombre est généralement atteint,
- Il faut que le prélèvement puisse être traité à l'état frais, dans les 24 heures suivant l'aspiration médullaire, la technique ne doit donc pas être trop longue. La technique ne nécessitant pas de Ficoll[®], la lyse étant réalisée après marquage et la distribution des anticorps pouvant être automatisée, tout prélèvement arrivant au laboratoire avant 15h pourra être pris en charge le jour même. La technique est donc réalisable en routine hospitalière,
- Il faut que les rendus de résultats soient homogènes quel que soit le biologiste en charge de l'interprétation des dossiers, qu'il n'y ait pas de variabilité inter-opérateur. Dans notre étude, nous avons montré que l'interprétation biologique était homogène entre les 2 lecteurs. La reproductibilité d'interprétation est aidée par le fait qu'un protocole d'analyse avec un masque d'analyse défini est utilisé pour l'analyse de l'échantillon. Cela ne devrait donc pas constituer un facteur limitant.

Au total, l'étude de la maladie résiduelle dans les LAL-T selon nos conditions techniques et analytiques est applicable en routine hospitalière.

2. Résultats

2.1. Evaluation de la MRD en CMF

Notre travail a porté sur 14 patients, pour lesquels nous possédions à la fois un prélèvement de moelle au diagnostic et à au moins un point de suivi de maladie résiduelle ont pu être inclus, avec pour chacun d'eux entre 1 et 4 prélèvements de suivi de maladie résiduelle analysés soit un total de 40 prélèvements analysés. Ce faible recrutement s'explique par le fait que la leucémie aigüe lymphoïde T est une pathologie peu fréquente. En effet les adultes sont préférentiellement atteints de LAM et les enfants de LAL de type B. Les LAL-T ne représentent au total que 4% des leucémies de l'adulte et 15% des leucémies de l'enfant. En France, l'incidence de diagnostic de LAL-T est de 4,7 par an et par million d'habitants (91). Dans le bassin de population du Nord-Pas-de-Calais ceci représente environ 18 cas par an.

Notre étude étant à la fois rétrospective et prospective, certains prélèvements ont été congelés avant analyse, d'autres ont pu être analysés à l'état frais. Ceci engendrait un problème d'homogénéité et de comparabilité dans le rendu des résultats : le Ficoll© réalisé avant congélation éliminant les cellules polynucléées, la MRD était rendue en pourcentage de cellules mononucléées pour les échantillons congelés. Et pour les échantillons analysés à l'état frais, les cellules mononucléées étaient sélectionnées sur le graphique CD45/SS (créant un pseudo Ficoll©) et le nombre de cellules ainsi estimé servait de dénominateur pour le calcul de la maladie résiduelle. Ainsi tous nos résultats étaient rendus de façon comparable. Plusieurs études quantifient la MRD sur les cellules mononucléées, nos résultats sont donc comparables à la littérature (48).

2.2. Comparaison de nos résultats à ceux de la biologie moléculaire

L'interprétation de la quantification de la maladie résiduelle en cytométrie en flux a donné 78% de résultats comparables à ceux obtenus en biologie moléculaire. Dans la récente étude publiée par Fossat et al, des discordances étaient observées dans 14% des cas, cette valeur est proche de celle observée dans notre travail (22%) mené sur une cohorte beaucoup moins grande (62). D'autres études rapportent des taux de concordance allant de 75 à 86% (92,93).

La concordance était de 100% pour les suivis de MRD à J70. A ce point de suivi, aucun des patients ne présentait de MRD positive aussi bien par biologie moléculaire qu'en CMF.

Parmi les 5 cas où les résultats étaient discordants entre les deux techniques, 1 point de suivi à J35 était positif en CMF et négatif en biologie moléculaire, et 4 négatifs en CMF et positifs en BM (3 J35 et un J150).

Ces discordances ont différentes origines.

1) Cas des faux négatifs

Pour ces 4 prélèvements il apparaît que notre sensibilité de détection en CMF était trop faible pour identifier les blastes résiduels. Cette faible sensibilité résultait

- Soit de combinaisons LAIP peu spécifiques (ceci dans deux cas avec des valeurs du LAIP sur nos moelles témoins respectivement de 0.2% et 0.1% pour le tube membranaire),
- Soit d'une part importante d'hémodilution (pour les 4 cas la valeur du nombre de cellules CD34+ était inférieur à 2%) associée à des moelles riches en érythroblastes qui perturbent le dénominateur du calcul de MRD.

2) Cas du faux positif

Ce prélèvement était un point de suivi à J35.

La CMF retrouvait une MRD positive à 0,3% pour un seuil de détection à 0,13%. Sur ce LAIP nous observons un réel problème de spécificité, le LAIP étant exprimé par 0,13% de cellules médullaires physiologiques.

De plus il est observé sur ce prélèvement un pourcentage très élevé de cellules CD34+ (20%) témoignant très probablement d'une moelle en phase de régénération importante. La combinaison LAIP (CD34-, CD3s+, CD8+ CD7+ CD5+ CD2+) basée sur uniquement des variations d'intensité des marqueurs lymphoïdes T peut être retrouvée suite à la stimulation de lymphocytes T. En effet, des variations d'intensité d'expression du CD7 et/ou du CD5 peuvent être observées sur des populations lymphocytaires T CD8+ secondairement à des infections virales (94). De même, des variations d'intensité d'expression du CD7 peuvent être observées sur des lymphocytes CD4+ de type mémoire selon les stimulations de ces lymphocytes (95). Dans tous les cas ces variations d'origine non tumorale engendrent une réelle difficulté à suivre la MRD en CMF dans les cas de LAL T matures CD3+ ne présentant pas de marqueurs d'immaturité fortement exprimés, ce qui est le cas de ce patient (CD99 faible, CD1a positif faible).

Ce prélèvement objective donc une des limites du suivi de la MRD en CMF, et dans ce cas, le suivi en biologie moléculaire est préconisé.

3) Sur nos 5 résultats discordants

Pour le faux positif : la CMF n'apparaît pas être la technique de choix pour le suivi de ce patient du fait d'un LAIP peu spécifique, et pose le problème du choix de la technique de suivi de la MRD en CMF pour les LAL-T de phénotype mature (T IV selon EGIL) ne présentant pas ou peu de LAIP type asynchronisme de maturation et dont les blastes présentent des phénotypes très proches de populations lymphocytaires T (réactionnelles, secondaires à des infections ou à des maladies auto-immunes) (94,95).

Pour les 4 faux négatifs : on retrouvait un problème de sensibilité avec des moelles érythroblastiques et présentant moins de 2% de cellules mononucléées CD34+ pour les 4 patients, un problème de sensibilité pour le patient 7 avec l'acquisition de moins de 100 000 cellules mononucléées, et un problème de spécificité avec des seuils de détection de LAIP élevés pour 3 patients. Il ne peut pas non plus être exclu qu'une partie des fragments d'ADN mis en évidence par les techniques de biologie moléculaire soit issue de cellules en voie d'apoptose qui ne sont pas évaluables par notre technique de CMF.

2.3. Comparaison de nos résultats de MRD à l'évolution clinique

Notre cohorte est faible (14 patients) il est donc difficile d'en tirer des conclusions robustes et générales. Cependant, nous avons étudié le suivi clinique de nos patients, à la clôture de notre étude, les patients inclus ont bénéficié d'un suivi entre 5 et 36 mois, le temps moyen de suivi est de 21,8 mois.

1) Patients avec une MRD négative

Parmi les 12 patients dont la MRD était négative à tous les points de suivi, 2 patients (n° 3 et n°4) ont rechuté. L'un sous forme méningée à J100, cette rechute ne s'est pas accompagnée d'une MRD positive à J35. L'autre sous forme méningée et médullaire, ce patient fait partie des discordants puisque positif en biologie moléculaire à M5 et négatif en CMF avec une sensibilité faible (pourcentage de CD34<2%).

2) Patients avec une MRD positive

Parmi les 2 patients dont la MRD était positive en CMF (patients 1, et 6), un seul (patients 1) a rechuté et est décédé à 2 ans du diagnostic. Le patient 6 fait partie des discordants, il avait une MRD négative en biologie moléculaire et est toujours en rémission complète. Nous avons vu précédemment que l'évaluation de sa MRD en CMF ne pouvait être retenu du fait de la faible sensibilité du LAIP suivi.

Globalement, et en dehors des chiffres de MRD obtenus sur des prélèvements qui ne permettaient pas de rendre une MRD avec sensibilité et/ou spécificité, on retrouve et une absence de rechute chez les patients MRD négatifs. Ceci confirme les résultats des études précédentes que ce soit en CMF ou biologie moléculaire. L'association entre une MRD positive et la rechute ne peut être analysée car pour le patient 1 la MRD était prélevée alors que le patient était en rechute, et pour le deuxième patient le LAIP manquait de sensibilité pour permettre le suivi de sa maladie résiduelle en CMF.

3) MRD et greffe

Quatre patients ont été greffés. Nous ne disposions pas de prélèvement de moelle réalisé en pré-greffe, ni en post-greffe pour ces patients. Nous ne pouvons donc pas conclure sur l'impact pronostic de ces points de suivi en termes de survie sans rechute.

4) MRD et facteurs de risques

Même si notre série comporte peu de patients, nous voyons que les patients ayant une MRD positives sont plus souvent hyperleucocytaires et corticorésistants. L'impact pronostic d'une mutation de *Notch1* n'a pas pu être évaluée car tous les patients n'ont pas bénéficié d'une recherche de mutations par technique NGS. Cependant, sur les 12

patients ayant eu des MRD négatives, la recherche de mutation a été faite pour 10 d'entre eux. Elle était positive pour 8 de ces 10 patients.

5) La rechute peut-elle être prédite grâce à la quantification de la MRD en CMF ?

Pour un patient l'étude de la MRD par CMF aurait permis de diagnostiquer la rechute 2 mois avant la rechute cytologique. En effet, ce patient ne pouvait bénéficier d'un suivi de MRD par PCR du fait de l'absence de réarrangement. Le prélèvement de moelle réalisé à M19 ne retrouvait pas d'excès de blastes en cytologie, la quantification en CMF retrouvait une MRD à 10%. La rechute n'a été mise en évidence au myélogramme qu'à M21.

Pour les 2 autres patients de notre cohorte ayant rechuté, les prélèvements pour quantification de la MRD étaient prélevés 1 mois avant la rechute méningée et étaient négatifs en CMF. La quantification de la MRD par CMF n'aurait pas permis de prédire la rechute pour ces 2 patients.

Au total

Notre cohorte étant composée de peu de patients, il ne nous est pas possible de conclure avec certitude sur la corrélation entre la quantification de la MRD et l'évolution clinique du patient. Pour cela, une étude sur une plus grande cohorte est nécessaire.

3. Choix de la technique d'étude de la MRD

La recherche et le suivi de la MRD reposent sur le principe que la leucémogénèse entraîne des changements moléculaires et cellulaires permettant de distinguer les cellules normales des cellules leucémiques. Ainsi, les techniques de biologie moléculaire et de cytométrie en flux sont toutes les deux adaptées à l'étude de la MRD. La cytologie a quant à elle une trop faible sensibilité et ne peut suffire pour suivre la MRD.

Dans notre laboratoire, l'étude de la maladie résiduelle dans les LAL-T se fait actuellement par PCR, grâce à la recherche des réarrangements clonaux des gènes des immunoglobulines et du TCR. Depuis la découverte de l'intérêt du suivi de la maladie résiduelle dans l'évaluation pronostique des patients atteints de leucémie aigüe, les techniques de biologie moléculaire ont été privilégiées. En effet, avant l'essor de la cytométrie, la PCR était la seule technique permettant d'atteindre des niveaux de sensibilité de l'ordre de 10^{-5} (détection de 1 cellule leucémique parmi 100 000 cellules). Cependant, depuis l'apparition des approches en cytométrie multi-paramétrique, il a été

démontré que la cytométrie en flux était capable d'atteindre une sensibilité de 10^{-4} , donc était suffisante pour établir un suivi de MRD à J35 et J70 (42,51). Il nous a donc paru logique d'essayer de mettre au point l'étude de la MRD par la cytométrie en flux, d'autant plus que celle-ci permet d'obtenir un résultat plus rapidement qu'avec la biologie moléculaire, ce qui est cliniquement intéressant lorsque ce résultat de MRD entraîne une modification de la stratégie thérapeutique.

Principaux avantages et inconvénients de la CMF pour l'étude de la MRD

L'étude de la maladie résiduelle par technique de cytométrie en flux présente plusieurs **avantages** :

- Elle permet de quantifier la maladie résiduelle même si le LAIP au diagnostic n'est pas connu ou si les blastes leucémiques ont subi des modifications antigéniques au cours de l'évolution de la maladie. En effet, même si dans des conditions optimales la comparaison de l'immunophénotype blastique au point de suivi à celui au diagnostic est souhaitée pour l'évaluation de la MRD, en cas d'immunophénotype au diagnostic non disponible, une comparaison de l'échantillon à une base de données de moelles de références permet d'appréhender la présence de cellules leucémiques.
- Elle ne nécessite pas de "design" d'amorces propres au patient contrairement à la méthode de référence.
- Elle permet de rendre un résultat de MRD aux cliniciens plus rapidement qu'avec la biologie moléculaire. Ceci est particulièrement intéressant au vu des implications thérapeutiques que peut avoir la découverte d'une MRD positive. En effet, l'impact pronostic péjoratif d'une MRD positive quel que soit le temps du point de suivi a été largement démontré (41–45).

En contrepartie, la CMF présente également des **inconvénients** qu'il faut palier pour rendre un résultat le plus fiable possible.

Tout d'abord l'utilisation de la CMF nécessite d'évaluer la qualité de l'échantillon, ceci par l'estimation du degré d'hémodilution du prélèvement de moelle osseuse. Dans un prélèvement hémodilué, la proportion de cellules médullaires et donc de potentiels blastes leucémiques résiduels est sous-estimée. L'analyse d'un prélèvement hémodilué entrainera un risque de résultat faussement négatif. Le degré d'hémodilution peut être estimé de plusieurs façons :

- Par l'analyse cytologique du frottis médullaire : la qualité du prélèvement est évalué par la présence de cellules spécifiques de la moelle osseuse : mégacaryocytes et érythroblastes. De plus, la présence de plus de 50% de lymphocytes et polynucléaires neutrophiles laisse supposer une hémodilution,

- Par une estimation cytométrique : une moelle est considérée comme significativement hémodiluée lorsqu'elle contient plus de 40% de polynucléaires neutrophiles, ou plus de 20 % de lymphocytes, ou moins de 5% d'érythroblastes. L'estimation de l'hémodilution par la CMF nécessite donc l'utilisation de marqueurs ciblant les polynucléaires neutrophiles, les lymphocytes et les érythroblastes, et induit donc l'emploi d'un tube de marquage supplémentaire, ce qui réduit le nombre de cellules disponibles pour l'analyse de la MRD. Nous n'avons donc pas utilisé cette technique,
- Par la formule de Brooimans : cette formule a été utilisée lors de l'analyse d'échantillons à l'état frais,
- Par l'étude de la représentativité du prélèvement grâce à l'étude du CD34. Notre travail sur les moelles normales nous a permis de mettre en évidence un nouveau critère utilisable afin d'évaluer la qualité du prélèvement. En effet, en accord avec les données de la littérature (84,85), nous avons pu définir qu'un échantillon de moelle comprenant moins de 2% de cellules mononucléées CD34+ n'était pas représentatif de la moelle et impliquait un risque de résultat erroné. Pour chaque échantillon nous avons donc mesuré ce taux de cellules CD34+.

Un deuxième inconvénient de la CMF est qu'elle nécessite une grande expérience et une bonne connaissance de la part du biologiste des spécificités immunologiques de la lymphopoïèse T. En effet, le phénotype des blastes leucémiques peut chevaucher celui des cellules normales, notamment lors d'une forte régénération cellulaire, comme après une chimiothérapie, où certains marqueurs normalement absents d'une moelle de patient sain peuvent être exprimés. Les combinaisons de marqueurs utilisées pour définir le LAIP devraient donc ne pas être exprimées par des cellules saines. Ceci implique l'utilisation simultanée de plusieurs marqueurs et donc de cytomètres multiparamétriques (8 à 10 couleurs). De plus, lors de l'évolution de la maladie il peut survenir des glissements antigéniques, et l'immunophénotype leucémique étant alors modifié, si le biologiste ne les détecte pas des résultats faussement négatifs peuvent être rendus (61). Ce risque peut être diminué à nouveau par l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs de LAIP.

Enfin, notre travail a posé la problématique du suivi des LAL-T matures (T IV selon EGIL) en cytométrie en flux. Nous avons constaté que ce type de leucémie présente des LAIP reposant sur des antigènes exprimés également par les cellules T matures physiologiques mais à des niveaux d'intensité d'expression différents. L'étude des moelles normales a montré que les moelles de référence peuvent comporter jusqu'à 0,2% de cellules avec un phénotype proche des LAIP. Dans notre travail, pour ces cas la CMF n'était pas assez sensible.

4. Evolution vers le NGS

LA PCR reste la méthode de référence pour le diagnostic et la quantification de la maladie résiduelle des LAL et peut atteindre une sensibilité de 10^{-5} . Cependant elle n'est pas applicable à tous les patients (patients chez lesquels on ne retrouve pas de mutation). La CMF permet la quantification de la MRD avec une sensibilité de 10^{-4} , son interprétation est opérateur-dépendante, et elle est peu standardisée. Une nouvelle technique de quantification de la MRD est en plein essor et permettrait le diagnostic d'un plus grand nombre de mutations et serait donc plus sensible : le NGS (96).

Le NGS (next generation sequencing), ou séquençage haut débit, est une technique de séquençage en plein essor, qui permet le séquençage rapide de gènes entiers (exon + intron). Son utilisation dans la quantification de la MRD dans les hémopathies aiguës permet d'atteindre une sensibilité de l'ordre de 10^{-6} (68,97–99).

L'équipe de Wu a travaillé sur la quantification de la MRD dans les LAL-T par technique NGS, comparativement à la CMF. Dans son étude, parmi les 31 patients présentant un réarrangement du TCR β , les résultats de MRD obtenus en CMF et NGS étaient similaires dans 21 cas, et dans 10 cas (32%) la MRD n'était trouvée positive que par la technique NGS, confirmant une meilleure sensibilité de la technique par rapport à la CMF. Wu avançait aussi que le séquençage du TCR β est plus spécifique que le séquençage du TCR γ , et montrait que le séquençage NGS permettrait de diagnostiquer les types early-T de LAL-T par l'absence de réarrangement des gènes du TCR β dans ce phénotype (68).

L'équipe de Faham comparait la technique NGS au gold standard qu'est la PCR, mais dans le cadre des LAL-B. Il retrouvait une meilleure sensibilité du NGS, avec 96% de résultats concordants entre les 2 méthodes, et 3% de cas où la MRD n'était détectée que par la technique NGS. Dans cette même étude il comparait le NGS à la CMF, et retrouvait à nouveau une supériorité du NGS avec 10% de cas positifs en NGS et négatifs en CMF (97).

Le NGS semble donc être une technique d'avenir dans l'étude de la maladie résiduelle des hémopathies malignes.

5. Expression des résultats

Notre travail pose aussi la question de la complexité d'expression du rendu des résultats et de son format idéal.

L'analyse des résultats obtenus et leur confrontation à ceux obtenus en biologie moléculaire ont fait apparaître que la pertinence du résultat de MRD en CMF est conditionnée par les paramètres suivant :

- Un seuil technique de sensibilité (dépendant de la qualité de l'acquisition et du nombre d'évènements acquis),
- Un seuil de spécificité défini selon le LAIP,
- Un seuil de représentativité de l'échantillon analysé (degré d'hémodilution).

Le résultat biologique de la MRD peut être exprimé soit en pourcentage des cellules médullaires totales, soit en pourcentage des cellules mononucléées, soit en pourcentage des cellules CD34+, soit en nombre absolu. Habituellement, les résultats de MRD sont rendus de la façon suivante :

- MRD positive,
- MRD négative au seuil de sensibilité technique de X%.

Ceci engendre des "confusions" lors de l'interprétation par le clinicien. En effet, les seuils de stratification thérapeutique sont les suivants pour les LAL-T : MRD positive si $>1\%$ à J35, et si $>0,1\%$ à J70. En CMF, une MRD était interprétée et rendue au clinicien comme positive si on retrouvait plus de 30 évènements et une valeur supérieure au seuil physiologique. Nous voyons donc que pour un J35, le clinicien pouvait recevoir un résultat de MRD interprété positif alors que la valeur de la MRD était inférieure au seuil de stratification (1%), et donc était finalement interprétée comme négative par le clinicien.

Suite à ce travail, il nous apparaît donc souhaitable de réfléchir à une nouvelle façon d'exprimer les résultats de MRD. Une possibilité serait la suivante :

- En cas d'absence d'évènements semblables aux blastes du diagnostic, nous pourrions rendre "MRD indétectable au seuil de sensibilité de X%",
- En cas d'évènements détectés : "MRD détectable à X%",
- L'interprétation "positive" ou "négative" serait laissée à l'appréciation du clinicien, en fonction des seuils de stratification thérapeutique,
- En cas de LAIP au diagnostic peu spécifique (étude des moelles normales montrant plus de X% de cellules physiologiques présentant un phénotype semblable au LAIP du patient, avec ce seuil qui reste à définir) : "MRD non évaluable".

Dans ce dernier cas, où la sensibilité atteinte par la CMF est trop faible pour suivre la maladie résiduelle du patient en CMF, la biologie moléculaire devra être privilégiée. Les points de suivi de ces patients peuvent être tout de même analysés en CMF à la recherche d'un glissement antigénique permettant l'identification de blastes leucémiques suffisamment différents des cellules physiologiques, ou d'une rechute sous un autre phénotype que celui du diagnostic.

Une réflexion clinico-biologique devra être menée afin de standardiser les résultats de maladie résiduelle.

CONCLUSION

L'étude de la maladie résiduelle dans les hémopathies malignes tient une place importante dans le suivi des patients en termes de risque de rechute et de stratification thérapeutique. Actuellement, les seuils de MRD stratifiant dans les différents protocoles thérapeutiques ont été établis sur des résultats obtenus par technique de biologie moléculaire. Celle-ci reste la technique de référence pour l'étude de la maladie résiduelle, cependant elle est coûteuse et techniquement lourde, avec la nécessité d'amorces "designées" spécifiquement pour chaque patient. Les résultats publiés par de nombreuses études, ainsi que ceux obtenus dans ce travail, montrent que la cytométrie en flux est une alternative complémentaire à la biologie moléculaire.

La mise au point méthodologique a permis de mettre en place une analyse applicable à tous les patients porteurs de LAL-T, et de définir des critères de qualité du prélèvement nécessaires au bon rendu des résultats. Ce travail a montré que la cytométrie en flux permet de suivre les patients ne présentant pas de marqueurs de suivi en biologie moléculaire et pour lesquels la MRD n'était donc pas évaluable lors de la seule utilisation de la PCR. Notre méthode a permis de détecter un LAIP au diagnostic pour chacun de nos patients, et les résultats obtenus par les deux techniques sur des prélèvements de bonne qualité étaient presque toujours comparables.

La cytométrie s'avère être un bon complément à la biologie moléculaire car elle permet de suivre les patients ne possédant pas de marqueurs de suivi en biologie moléculaire. Sa limite reste une sensibilité plus faible que celle obtenue avec la biologie moléculaire. Si une sensibilité de 10^{-3} est souhaitée, la CMF est suffisante pour le suivi de la MRD. Par contre, elle atteint plus difficilement une sensibilité de 10^{-4} , niveau de sensibilité que la biologie moléculaire est capable d'atteindre. La sensibilité à 0,01% de la MRD en CMF est étroitement dépendante de la spécificité du LAIP de suivi, nous avons vu dans ce travail que le suivi de la MRD en CMF est peu sensible pour les patients présentant une LAL-T mature (TIV EGIL), ceci ne représente toutefois qu'un faible nombre de patients. Dans les autres cas une sensibilité voisine de 0,01% est atteignable.

L'autre élément qui revêt une grande importance pour obtenir un résultat fiable du suivi de la MRD, est d'avoir un prélèvement de moelle osseuse non dilué, ceci est encore plus vrai en CMF qu'en biologie moléculaire du fait de la plage de sensibilité plus faible de cette technique. Clairement, il apparaît que le pourcentage de cellules CD34+ dans le prélèvement conditionne notre capacité à rendre un résultat pertinent.

Du fait du faible effectif de notre cohorte, une corrélation à l'évolution clinique des patients n'a pas été possible. Cependant nous observons que nos patients MRD positifs présentaient souvent des facteurs de mauvais pronostic (hyperleucocytose et/ou corticorésistance). De même, les patients ayant rechuté présentaient un chiffre de MRD positif, sauf le patient qui a fait une rechute méningée isolée.

Finalement, le choix de la technique pour le suivi de la MRD va dépendre des marqueurs cellulaires et moléculaires mis en évidence au diagnostic ou à la rechute, et de la sensibilité recherchée. La CMF est tout à fait adaptée si la sensibilité souhaitée est de 10^{-3} , comme c'est le cas dans le protocole EORTC où la valeur de MRD engendrant un changement de traitement est de 0,1%. Lorsqu'une sensibilité de 10^{-4} est souhaitée par le clinicien, la cytométrie atteint ses limites de sensibilité et le suivi en biologie moléculaire est recommandé en particulier pour les LAL-T matures comme l'a rappelé Campana dans le tableau ci-dessous.

Cible	Méthode	% de patients pouvant être suivi	Sensibilité	avantages	inconvénients
Réarrangements des gènes des IG et du TCR	RQ-PCR	90%	0.01%-0.001%	Sensibilité élevée. Protocoles standardisés Quantification précise. ADN stable. Plupart des protocoles sont basés sur la quantification par PCR.	Laborieux et coûteux. Evolution clonale : faux-négatifs. Besoin de plus d'une cible et d'amorces spécifiques du patient.
Transcrits de fusion	RQ-PCR	40%	0.01%-0.001%	Rapide. Association stable avec le clone leucémique. Stable sous traitement.	Quantification incertaine. ARN fragile: faux-négatifs. Risque de contamination: faux-positifs
LAIP	cytométrie en flux	95%	0.01%	Rapide Réalisable en routine Donne des informations sur les cellules normales.	Expérience du biologiste. Switch antigéniques: CMF multiparamétrique.

Tableau 18 : Principaux avantages et inconvénients de la biologie moléculaire et de la CMF pour l'étude de la maladie résiduelle (50)

Au total, ce travail a permis de montrer la faisabilité en pratique hospitalière de routine du suivi de la MRD dans les LAL-T par cytométrie en flux. Cette méthode est maintenant mise en application en routine, ce qui permettra un recueil de patients plus important et permettra d'étudier cette corrélation clinico-biologique sur une plus grande série.

ANNEXES

Annexe 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques des 14 patients

n°	sexe	âge	EGIL	leucocytose au diagnostic (G/L)	caryotype	mutation	marqueurs BM	protocole	rechute (en mois après le diagnostic)	greffe (en mois après le diagnostic)	décès (en mois après le diagnostic)	dernières nouvelles
1	M	57	T II	NC	normal	/	/	GRAALL 2005	M21	M7	M25	décédé
2	M	12	T III	20,53	normal	WT1	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC
3	M	12	T IV	302,76	monosomie 8	HOX11L2	TCR	EORTC 58081 VHR	M3	M6		RC
4	M	19	T III	406	trisomie 8	SIL TAL	TCR	GRAALL 2005	M4 - M6 - M8 - M10	M6,5 - M8	M12	décédé
5	F	19	T IV	65,77	normal	HOX11L2 et WT1	TCR	GRAALL 2005		M3		RC
6	M	3	T III	241,82	normal	/	TCR	EORTC 58081 VHR				RC
7	M	14	T II	13,43	complexe	HOX11L2	Ig et TCR	EORTC 58081 VHR				RC
8	M	15	T III	14,85	trisomie 8	/	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC
9	M	15	T III	7,74	NC	/	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC
10	M	10	T III	13,88	NC	HOX11	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC
11	F	10	T II	101,36	del 13q22	HOX11L2 et NUP214- ABL	TCR	EORTC 58081 VHR				RC
12	M	12	T III	12,46	complexe	/	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC
13	M	17	T III	NC	NC	NC	TCR	NC	NC	NC	NC	NC
14	M	5	T III	31,14	Délétion	HOX11	TCR	EORTC 58081 AR2T				RC

RC = rémission complète

NC = non connu

Annexe 2 : Caractéristiques des anticorps utilisés

CD	Fluorochrome	Fournisseur	Clone	Isotype
TdT	FITC	Dako	HT6	IgG1
CD1a	APC	Beckman-Coulter	BL6	IgG1
CD2	PE	Beckman-Coulter	39C1.5	IgG2a
CD3	ECD et Alexa750	Beckman-Coulter	UCHT1	IgG1
CD4	Pacifique blue	Beckman-Coulter	13B8.2	IgG1
CD5	PC7	Beckman-Coulter	BL1a	IgG2a
CD7	FITC	Beckman-Coulter	MT701	IgG1
CD8	PC5.5	Beckman-Coulter	B9.11	IgG1
CD10	Alexa 750	Beckman-Coulter	ALB1	IgG1
CD16	APC	Beckman-Coulter	6G8	IgG1
CD34	Alexa 700	Beckman-Coulter	581	IgG1
CD45	KO	Beckman-Coulter	J33	IgG1
CD48	Pacific blue	Exbio	MEM102	IgG1
CD56	APC	Beckman-Coulter	N901	IgG1
CD99	PE	eBioscience	3B2/TA8	IgG2a
CD56	APC	Beckman-Coulter	N901	IgG1
CD99	PE	eBioscience	3B2/TA8	IgG2a

BIBLIOGRAPHIE

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, et Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 1 nov 2001;414(6859):105-11.
2. Shi J, Fallahi M, Luo J-L, et Petrie HT. Nonoverlapping functions for Notch1 and Notch3 during murine steady-state thymic lymphopoiesis. *Blood*. 1 sept 2011;118(9):2511-9.
3. Bhandoola A, von Boehmer H, Petrie HT, et Zúñiga-Pflücker JC. Commitment and Developmental Potential of Extrathymic and Intrathymic T Cell Precursors: Plenty to Choose from. *Immunity*. juin 2007;26(6):678-89.
4. Boudil A, Zeponi V, Skhiri L, et Ezine S. T cell lymphopoiesis, the end of a long journey through multiple sites and potentialities. *Hématologie*. 2011;2(1):24-39.
5. Petrie HT, et Kindcale P. Many roads, one destination for T cell progenitors. *J Exp Med*. 27 juin 2005;202(1):11-3.
6. Cavazzana-Calvo M, Six E, André-Schmutz I, et Coulombel L. Hématopoïèse humaine : des cellules CD34 aux lymphocytes T. *médecine/sciences*. févr 2007;23(2):151-60.
7. Petrie HT. Cell migration and the control of post-natal T-cell lymphopoiesis in the thymus. *Nat Rev Immunol*. nov 2003;3(11):859-66.
8. Ferrando AA. The role of NOTCH1 signaling in T-ALL. *Hematology*. 1 janv 2009;2009(1):353-61.
9. Radtke F, Wilson A, Stark G, Bauer M, van Meerwijk J, MacDonald HR, et al. Deficient T cell fate specification in mice with an induced inactivation of Notch1. *Immunity*. mai 1999;10(5):547-58.
10. Tanigaki K et Honjo T. Regulation of lymphocyte development by Notch signaling. *Nat Immunol*. mai 2007;8(5):451-6.
11. Armstrong SA, et Look AT. Molecular genetics of acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 sept 2005;23(26):6306-15.
12. Aifantis I, Raetz E, et Buonamici S. Molecular pathogenesis of T-cell leukaemia and lymphoma. *Nat Rev Immunol*. mai 2008;8(5):380-90.

13. De Keersmaecker K, Marynen P, et Cools J. Genetic insights in the pathogenesis of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. août 2005;90(8):1116-27.
14. Bassan R, Gatta G, Tondini C, et Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. juin 2004;50(3):223-61.
15. International Agency for Research on Cancer, éditeur. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues: [... reflects the views of a working group that convened for an Editorial and Consensus Conference at the International Agency for Research on Cancer (IARC), Lyon, October 25 - 27, 2007]. 4. ed. Lyon: Internat. Agency for Research on Cancer; 2008. 439 p.
16. Barry E, DeAngelo DJ, Neuberg D, Stevenson K, Loh ML, Asselin BL, et al. Favorable Outcome for Adolescents With Acute Lymphoblastic Leukemia Treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium Protocols. *J Clin Oncol*. 16 janv 2007;25(7):813-9.
17. Cheng SH, Lau KM, Li CK, Chan NPH, Ip RKL, Cheng CK, et al. Minimal Residual Disease-Based Risk Stratification in Chinese Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia by Flow Cytometry and Plasma DNA Quantitative Polymerase Chain Reaction. *PLoS ONE*. 25 juill 2013;8(7):e69467.
18. Patrick K et Vora A. Update on biology and treatment of T-cell acute lymphoblastic leukaemia: *Curr Opin Pediatr*. févr 2015;27(1):44-9.
19. Vaitkevičienė G, Forestier E, Hellebostad M, Heyman M, Jonsson OG, Lähteenmäki PM, et al. High white blood cell count at diagnosis of childhood acute lymphoblastic leukaemia: biological background and prognostic impact. Results from the NOPHO ALL-92 and ALL-2000 studies: High WBC count at diagnosis of childhood ALL. *Eur J Haematol*. janv 2011;86(1):38-46.
20. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. févr 2009;10(2):147-56.
21. Patrick K Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman AV, Rowntree C, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol*. août 2014;166(3):421-4.
22. Wood BL. T-Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Shows Excellent Outcome, Lack of Significance of the Early Thymic Precursor (ETP) Immunophenotype, and Validation of the Prognostic Value of End-Induction Minimal Residual Disease (MRD) in Children's Oncology Group (COG) Study AALL0434. 2014 décembre; ASH, San Francisco.

23. Zhang J, Ding L, Holmfeldt L, Wu G, Heatley SL, Payne-Turner D, et al. The genetic basis of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. 11 janv 2012;481(7380):157-63.
24. Weng AP, Ferrando AA, Lee W, Morris JP, Silverman LB, Sanchez-Irizarry C, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 8 oct 2004;306(5694):269-71.
25. O'Neil J, Grim J, Strack P, Rao S, Tibbitts D, Winter C, et al. FBW7 mutations in leukemic cells mediate NOTCH pathway activation and resistance to gamma-secretase inhibitors. *J Exp Med*. 6 août 2007;204(8):1813-24.
26. Van Vlierberghe P, et Ferrando AA. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1 oct 2012;122(10):3398-406.
27. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, van der Spek PJ, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1 mai 2008;111(9):4668-80.
28. Soulier J, Clappier E, Cayuela J-M, Regnault A, García-Peydró M, Dombret H, et al. HOXA genes are included in genetic and biologic networks defining human acute T-cell leukemia (T-ALL). *Blood*. 1 juill 2005;106(1):274-86.
29. Ferrando AA, Neuberg DS, Staunton J, Loh ML, Huard C, Raimondi SC, et al. Gene expression signatures define novel oncogenic pathways in T cell acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. févr 2002;1(1):75-87.
30. Ferrando AA, Neuberg DS, Dodge RK, Paietta E, Larson RA, Wiernik PH, et al. Prognostic importance of TLX1 (HOX11) oncogene expression in adults with T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. févr 2004;363(9408):535-6.
31. Attarbaschi A, Pisecker M, Inthal A, Mann G, Janousek D, Dworzak M, et al. Prognostic relevance of TLX3 (HOX11L2) expression in childhood T-cell acute lymphoblastic leukaemia treated with Berlin-Frankfurt-Münster (BFM) protocols containing early and late re-intensification elements. *Br J Haematol*. janv 2010;148(2):293-300.
32. Ballerini P, Blaise A, Busson-Le-Coniat M, Su XY, Zucman-Rossi J, Adam M, et al. HOX11L2 expression defines a clinical subtype of pediatric T-ALL associated with poor prognosis. *Blood*. 18 juill 2002;100(3):991-7.
33. Cavé H, Suciú S, Preudhomme C, Poppe B, Robert A, Uyttebroeck A, et al. Clinical significance of HOX11L2 expression linked to t(5;14)(q35;q32), of HOX11 expression, and of SIL-TAL fusion in childhood T-cell malignancies: results of EORTC studies 58881 and 58951. *Blood*. 15 janv 2004;103(2):442-50.

34. van Grotel M, Meijerink JPP, Beverloo HB, Langerak AW, Buys-Gladdines JGCAM, Schneider P, et al. The outcome of molecular-cytogenetic subgroups in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia: a retrospective study of patients treated according to DCOG or COALL protocols. *Haematologica*. sept 2006;91(9):1212-21.
35. van Grotel M, Meijerink JPP, van Wering ER, Langerak AW, Beverloo HB, Buijs-Gladdines JGCAM, et al. Prognostic significance of molecular-cytogenetic abnormalities in pediatric T-ALL is not explained by immunophenotypic differences. *Leukemia*. janv 2008;22(1):124-31.
36. Breit S, Stanulla M, Flohr T, Schrappe M, Ludwig WD, Tolle G, et al. Activating NOTCH1 mutations predict favorable early treatment response and long-term outcome in childhood precursor T-cell lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 août 2006;108(4):1151-7.
37. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 déc 2013;31(34):4333-42.
38. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. oct 1995;9(10):1783-6.
39. Maecker HT, McCoy JP, et Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. *Nat Rev Immunol*. 17 févr 2012;
40. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2691-6.
41. Schrappe M. Minimal residual disease: optimal methods, timing, and clinical relevance for an individual patient. *Educ Program Am Soc Hematol*. 2012;2012:137-42.
42. Hauwel M, et Matthes T. Minimal residual disease monitoring: the new standard for treatment evaluation of haematological malignancies? *Swiss Med Wkly*. 22 janv 2014;
43. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical Significance of Minimal Residual Disease in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 27 août 1998;339(9):591-8.
44. Coustan-Smith E, Behm FG, Sanchez J, Boyett JM, Hancock ML, Raimondi SC, et al. Immunological detection of minimal residual disease in children with acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. févr 1998;351(9102):550-4.
45. Flohr T, Schrauder A, Cazzaniga G, Panzer-Grümayer R, van der Velden V, Fischer S, et al. Minimal residual disease-directed risk stratification using real-time quantitative PCR analysis of

immunoglobulin and T-cell receptor gene rearrangements in the international multicenter trial AIEOP-BFM ALL 2000 for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. avr 2008;22(4):771-82.

46. van der Velden VHJ, Jacobs DCH, Wijkhuijs AJM, Comans-Bitter WM, Willemse MJ, Hähnen K, et al. Minimal residual disease levels in bone marrow and peripheral blood are comparable in children with T cell acute lymphoblastic leukemia (ALL), but not in precursor-B-ALL. *Leukemia*. août 2002;16(8):1432-6.
47. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, Rivera GK, et al. Use of peripheral blood instead of bone marrow to monitor residual disease in children with acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 18 sept 2002;100(7):2399-402.
48. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: Proceedings of the Second International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18–20 September 2008. *Leukemia*. mars 2010;24(3):521-35.
49. Schrappe M, Valsecchi MG, Bartram CR, Schrauder A, Panzer-Grumayer R, Moricke A, et al. Late MRD response determines relapse risk overall and in subsets of childhood T-cell ALL: results of the AIEOP-BFM-ALL 2000 study. *Blood*. 25 août 2011;118(8):2077-84.
50. Campana D. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology*. 1 déc 2010;2010(1):7-12.
51. Campana D. Role of Minimal Residual Disease Monitoring in Adult and Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. oct 2009;23(5):1083-98.
52. Bar M, Wood BL, Radich JP, Doney KC, Woolfrey AE, Delaney C, et al. Impact of Minimal Residual Disease, Detected by Flow Cytometry, on Outcome of Myeloablative Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Lymphoblastic Leukemia. *Leuk Res Treat*. 2014;2014:1-9.
53. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. sept 2002;16(9):1668-72.
54. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic Value of Minimal Residual Disease Quantification Before Allogeneic Stem-Cell Transplantation in Relapsed Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia: The ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol*. 15 déc 2008;27(3):377-84.
55. Giebel S, Stella-Holowiecka B, Krawczyk-Kulis M, Gökbuget N, Hoelzer D, Doubek M, et al. Status of minimal residual disease determines outcome of autologous hematopoietic SCT in adult ALL. *Bone Marrow Transplant*. juin 2010;45(6):1095-101.

56. Pui CH, Campana D, et Evans WE. Childhood acute lymphoblastic leukaemia--current status and future perspectives. *Lancet Oncol.* oct 2001;2(10):597-607.
57. Parham P. The immune system. 3rd ed. London ; New York: Garland Science; 2009.
58. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, et Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol.* avr 2006;24(1):541-70.
59. Van Vlierberghe P, van Grotel M, Tchinda J, Lee C, Beverloo HB, van der Spek PJ, et al. The recurrent SET-NUP214 fusion as a new HOXA activation mechanism in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 1 mai 2008;111(9):4668-80.
60. Zhou M et Yang Q. NUP214 fusion genes in acute leukemia (Review). *Oncol Lett.* 18 juin 2014;
61. Campana D et Coustan-Smith E. Minimal Residual Disease Studies by Flow Cytometry in Acute Leukemia. *Acta Haematol.* 2004;112(1-2):8-15.
62. Fossat C, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A french multicenter study: MRD Assessment by Flow Cytometry in ALL. *Cytometry B Clin Cytom.* janv 2015;88(1):21-9.
63. Brooimans RA, Kraan J, van Putten W, Cornelissen JJ, Löwenberg B, et Gratama JW. Flow cytometric differential of leukocyte populations in normal bone marrow: Influence of peripheral blood contamination¹. *Cytometry B Clin Cytom.* janv 2009;76B(1):18-26.
64. Ortolani C. Flow cytometry of hematological malignancies. Chichester, West Sussex, UK: Wiley-Blackwell; 2011. 311 p.
65. Campana D, Coustan-Smith E, et Janossy G. The immunologic detection of minimal residual disease in acute leukemia. *Blood.* 1 juill 1990;76(1):163-71.
66. Roshal M, Fromm JR, Winter S, Dunsmore K, et Wood BL. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: Implications for minimal residual disease detection. *Cytometry B Clin Cytom.* 12 févr 2010;78B(3):139-46.
67. Boles KS, Stepp SE, Bennett M, Kumar V, et Mathew PA. 2B4 (CD244) and CS1: novel members of the CD2 subset of the immunoglobulin superfamily molecules expressed on natural killer cells and other leukocytes. *Immunol Rev.* juill 2001;181(1):234-49.
68. Wu D, Sherwood A, Fromm JR, Winter SS, Dunsmore KP, Loh ML, et al. High-Throughput Sequencing Detects Minimal Residual Disease in Acute T Lymphoblastic Leukemia. *Sci Transl Med.* 16 mai 2012;4(134):134ra63-134ra63.

69. Wood BL. High-Throughput Screening by Flow Cytometry Identifies Reduced Expression of CD48 As a Universal Characteristic of T-ALL and a Suitable Target for Minimal Residual Disease (MRD) Detection. 2011 décembre; ASH.
70. Amiot M, Dastot H, Schmid M, Bernard A, et Boumsell L. Analysis of CD1 molecules on thymus cells and leukemic T lymphoblasts identifies discrete phenotypes and reveals that CD1 intermolecular complexes are observed only on normal cells. *Blood*. sept 1987;70(3):676-85.
71. Martin LH, Calabi F, Lefebvre FA, Bilsland CA, et Milstein C. Structure and expression of the human thymocyte antigens CD1a, CD1b, and CD1c. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1987;84(24):9189-93.
72. Lopez-Sanchez N, et Frade JM. Genetic Evidence for p75NTR-Dependent Tetraploidy in Cortical Projection Neurons from Adult Mice. *J Neurosci*. 24 avr 2013;33(17):7488-500.
73. Hoy, Terry. Flow cytometry: clinical applications. Macey MG, éditeur. Oxford: Blackwell Scientific Publications; 1994. 308 p.
74. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. *Leukemia*. sept 2012;26(9):1908-75.
75. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Zen LD, Gaipa G, Ratei R, et al. CD99 expression in T-lineage ALL: implications for flow cytometric detection of minimal residual disease. *Leukemia*. avr 2004;18(4):703-8.
76. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grumayer R, Buldini B, Silvestri D, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 oct 2012;97(10):1582-93.
77. Dworzak MN, Fröschl G, Printz D, Mann G, Potschger U, Mühlegger N, et al. Prognostic significance and modalities of flow cytometric minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 mars 2002;99(6):1952-8.
78. Basso G, Veltroni M, Valsecchi MG, Dworzak MN, Ratei R, Silvestri D, et al. Risk of Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Is Predicted By Flow Cytometric Measurement of Residual Disease on Day 15 Bone Marrow. *J Clin Oncol*. 1 nov 2009;27(31):5168-74.
79. Coustan-Smith E, Sancho J, Behm FG, Hancock ML, Razzouk BI, Ribeiro RC, et al. Prognostic importance of measuring early clearance of leukemic cells by flow cytometry in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 17 juin 2002;100(1):52-8.

80. Gaipa G, Basso G, Maglia O, Leoni V, Faini A, Cazzaniga G, et al. Drug-induced immunophenotypic modulation in childhood ALL: implications for minimal residual disease detection. *Leukemia*. 11 nov 2004;
81. Roshal M, Valsecchi MG, et Bartram CR. Detection of minimal residual lymphoblastic leukemia. *Int Clin Cytom Soc*. 2011;II(1).
82. Neale GAM, Coustan-Smith E, Stow P, Pan Q, Chen X, Pui C-H, et al. Comparative analysis of flow cytometry and polymerase chain reaction for the detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. mai 2004;18(5):934-8.
83. Björklund E., Mazur J, Söderhäll S, et Porwit-MacDonald A. Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. janv 2003;17(1):138-48.
84. Bender JG Unverzagt K, Walker DE, Lee W, Smith S, Williams S, et al. Phenotypic analysis and characterization of CD34+ cells from normal human bone marrow, cord blood, peripheral blood, and mobilized peripheral blood from patients undergoing autologous stem cell transplantation. *Clin Immunol Immunopathol*. janv 1994;70(1):10-8.
85. Van Epps DE, Bender J, Lee W, Schilling M, Smith A, Smith S, et al. Harvesting, characterization, and culture of CD34+ cells from human bone marrow, peripheral blood, and cord blood. *Blood Cells*. 1994;20(2-3):411-23.
86. Grossmann V, Kern W, Harbich S, Alpermann T, Jeromin S, Schnittger S, et al. Prognostic relevance of RUNX1 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 déc 2011;96(12):1874-7.
87. Campana D, et Coustan-Smith E. Advances in the immunological monitoring of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. mars 2002;15(1):1-19.
88. Kerst G, Kreyenberg H, Roth C, Well C, Dietz K, Coustan-Smith E, et al. Concurrent detection of minimal residual disease (MRD) in childhood acute lymphoblastic leukaemia by flow cytometry and real-time PCR. *Br J Haematol*. mars 2005;128(6):774-82.
89. Dworzak MN. Immunological Detection of Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Onkologie*. 2001;24(5):442-8.
90. Bruggemann M, Raff T, et Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*. 29 nov 2012;120(23):4470-81.
91. Clavel J, Goubin A, Auclerc MF, Auvrignon A, Waterkeyn C, Patte C, et al. Incidence of childhood leukaemia and non-Hodgkin's lymphoma in France: National Registry of Childhood Leukaemia and Lymphoma, 1990-1999. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. avr 2004;13(2):97-103.

92. Thörn I, Forestier E, Botling J, Thuresson B, Wasslavik C, Björklund E, et al. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry. *Br J Haematol.* mars 2011;152(6):743-53.
93. Gaipa G, Cazzaniga G, Panzer-Grumayer R, Veltroni M, Karawajew L, Buldini B, et al. Time Point-Dependent Concordance of Flow Cytometry and RQ-PCR in the MRD Detection in Childhood ALL: The Experience of the AIEOP-BFM- ALL MRD Study Group. *ASH Annual Meeting Abstracts.* 16 nov 2008;
94. Weisberger J, Cornfield D, Gorczyca W, et Liu Z. Down-Regulation of Pan-T-Cell Antigens, Particularly CD7, in Acute Infectious Mononucleosis. *Am J Clin Pathol.* 1 juill 2003;120(1):49-55.
95. Reinhold U, Liu L, Sesterhenn J, et Abken H. CD7-negative T cells represent a separate differentiation pathway in a subset of post-thymic helper T cells. *Immunology.* nov 1996;89(3):391-6.
96. Marceau-Renaut A, Renneville A, Nibourel O, Jardin-Mathé O, Demay C, Villenet C, et al. New-generation sequencing (NGS) in hematologic oncology laboratories. *Hématologie.* 2013;4;(2):112-22.
97. Logan AC, Vashi N, Faham M, Carlton V, Kong K, Buño I, et al. Immunoglobulin and T Cell Receptor Gene High-Throughput Sequencing Quantifies Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia and Predicts Post-Transplantation Relapse and Survival. *Biol Blood Marrow Transplant.* sept 2014;20(9):1307-13.
98. Faham M, Zheng J, Moorhead M, Carlton VEH, Stow P, Coustan-Smith E, et al. Deep-sequencing approach for minimal residual disease detection in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 20 déc 2012;120(26):5173-80.
99. Pulsipher MA, Carlson C, Langholz B, Wall DA, Schultz KR, Bunin N, et al. IgH-V(D)J NGS-MRD measurement pre- and early post-allotransplant defines very low- and very high-risk ALL patients. *Blood.* 28 mai 2015;125(22):3501-8.

AUTEUR : Dericquebourg Anaïs

Date de Soutenance : 28/09/2015

Titre de la Thèse : Mise en place du suivi de la maladie résiduelle des LAL-T par cytométrie en flux multiparamétrique.

Thèse - Médecine - Lille 2015

Cadre de classement : hématologie

DES de Biologie médicale

Mots-clés : maladie résiduelle, LAL-T, cytométrie en flux.

Résumé :

Le suivi de la maladie résiduelle (MRD) dans les LAL-T peut être réalisé par techniques de cytologie, de biologie moléculaire et de cytométrie en flux (CMF) principalement sur prélèvement de moelle osseuse. La quantification de la MRD permet d'évaluer l'efficacité thérapeutique, d'estimer l'importance du risque de rechute et commence à être utilisée pour la stratification thérapeutique, ce qui implique de proposer aux cliniciens des méthodologies fiables, robustes et rapides. Ce travail visait à mettre en place le suivi de la MRD des LAL-T par CMF multiparamétrique en pratique quotidienne au laboratoire. Après avoir (i) défini un panel de 19 anticorps répartis en deux tubes pour identifier les LAIP (leukemia aberrant immunophenotype) et (ii) optimisé les stratégies de marquage et de réanalyse, nous avons quantifié la MRD sur 26 prélèvements et comparé nos résultats à ceux obtenus en biologie moléculaire. Nos résultats montrent que cette approche permet la mise en évidence d'un LAIP au diagnostic dans 100% des cas, ainsi que la détection ou la quantification de la MRD dans 100% des cas, avec une sensibilité voisine de 0,01% en dehors des cas de LAL-T matures. Les résultats obtenus en CMF sont superposables à ceux de biologie moléculaire dans 78% des cas, montrant la capacité de cette méthodologie à quantifier rapidement (<24h) la MRD des LAL-T. Les rares discordances observées (faux négatifs en CMF) résultaient le plus souvent de mauvais paramètres préanalytiques, la qualité du prélèvement et l'absence d'hémodilution de la moelle osseuse apparaît comme élément essentiel pour un rendu de résultats fiables pour le suivi de la MRD en CMF.

Composition du Jury :

Président : Pr Preudhomme

Assesseurs : Pr Quesnel - Pr Yakoub Agha - Dr Nelken - Dr Roumier