



UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE 2
FACULTE DE MEDECINE HENRI WAREMBOURG
Année : 2016

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

**Intérêt de l'évaluation précoce de la maladie résiduelle par cytométrie
en flux et biologie moléculaire (sur *WT1* et mutation de *NPM1*) dans les
leucémies aiguës myéloïdes**

Présentée et soutenue publiquement le 14 juin 2016 à 18 h
au Pôle Recherche
Par Claire Bories

JURY

Président :

Monsieur le Professeur Thierry FACON

Assesseurs :

Monsieur le Professeur Bruno QUESNEL

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

Monsieur le Docteur Florent DUMEZY

Directeur de Thèse :

Madame le Docteur Céline BERTHON

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

Liste des Abréviations

| | |
|----------|---|
| 2HG | 2-Hydroxy-glutarate |
| ABL1 | <i>Abelson Murine Leukemia virus oncogène homologue1</i> |
| ADN | Acide desoxyribonucléique |
| ALFA | <i>Acute Leukemia French Association</i> |
| ARF | <i>Auxin response factors</i> |
| ARN | Acide ribonucléique |
| ASXL1 | <i>Additional Sex Combs Like 1</i> |
| BCR | <i>Breakpoint Cluster Region</i> |
| CALGB | <i>Cancer and Leukemia Group B</i> |
| CBF | <i>Core Binding Factor</i> |
| MYH11 | <i>Myosin, Heavy Chain 11, Smooth Muscle</i> |
| CD | Classe de Différenciation (<i>Cluster of differentiation</i>) |
| CEBPA | <i>CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP), Alpha</i> |
| CHRU | Centre Hospitalier Régional et Universitaire |
| CIR | Incidence Cumulée de Rechute (<i>Cumulative Incidence of Relapse</i>) |
| CIVD | Coagulation Invasculaire Disséminée |
| CMF | Cytométrie En Flux |
| CSH | Cellule Souche Hématopoïétique |
| CSL | Cellule Souche Leucémique |
| DEK | <i>DEK Proto-Oncogene</i> |
| NUP214 | <i>Nucleoporin 214kDa</i> |
| DFS | Survie sans maladie (<i>Disease Free Survival</i>) |
| DNMT3A | <i>DNA (Cytosine-5-)-Methyltransferase 3 Alpha</i> |
| ECOG | <i>Eastern Cooperative Oncology Group</i> |
| EDTA | Éthylène Diamine Tétra-Acétique |
| EFS | Survie sans événement (<i>Event Free survival</i>) |
| ELL | <i>11-19 Lysine-Rich Leukemia</i> |
| ELN | <i>European LeukemiaNet</i> |
| ETV6 | <i>Ets Variant 6</i> |
| EZH2 | <i>Enhancer Of Zeste 2 Polycomb Repressive Complex 2 Subunit</i> |
| FAB | <i>French–American–British</i> |
| FISH | Hybridation <i>in situ</i> en fluorescence (<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>) |
| FLT3 | <i>Fms-Related Tyrosine Kinase 3</i> |
| FLT3-ITD | <i>FLT3 - Internal Tandem Duplications</i> |
| FLT3-TKD | <i>FLT3- Tyrosine Kinase Domain</i> |
| FS | <i>Forward Scatter</i> |
| GATA2 | <i>GATA Binding Protein 2</i> |
| G-CSF | <i>Granulocyte Colony-Stimulating Factor</i> |
| GTP | Guanosine triphosphate |
| HDAC | Histone Désacétylase |
| HLA | <i>Human Leukocyte Antigen</i> |
| HOX | <i>Homeobox</i> |
| HR | <i>Hazard Ratio</i> |
| IC95 | Intervalle de Confiance à 95% |
| IDH1/2 | Isocitrate Déshydrogenase 1/2 |
| NPM1 | Nucleophosmine |
| KIT | <i>V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral</i> |

| | |
|--------------|--|
| KMT2A | <i>Lysine (K)-Specific Methyltransferase 2A</i> |
| LAIP | Immunophénotype associé à la leucémie (<i>Leukemia Associated Immunophenotype</i>) |
| LAL | Leucémie Aiguë Lymphoïde |
| LAM | Leucémie Aiguë Myéloïde |
| LAM-CN | Leucémie Aiguë Myéloïde à Caryotype Normal |
| LAP | Leucémie Aiguë Promyélocytaire |
| LDH | Lactate déshydrogénase |
| MAC | <i>Myeloablative conditioning</i> |
| MAL | <i>Megakaryocytic Acute Leukemia</i> |
| MECOM | <i>MDS1 And EVII Complex Locus</i> |
| MKL1 | <i>Megakaryoblastic Leukemia (Translocation) 1</i> |
| MLL | <i>Mixed-Lineage Leukemia</i> |
| MLLT | <i>Mixed-Lineage Leukemia Translocated to Chromosom</i> |
| MLL-PTD | <i>MLL- Partial Tandem Duplication</i> |
| MO | Moelle osseuse |
| MPO | Myélopéroxydase |
| MRC | <i>Medical Research Council</i> |
| MRD | Maladie résiduelle (<i>Minimal Residual Disease</i>) |
| NASDA | Naphtol-ASD-Acetate |
| NGS | Séquençage de nouvelle generation (<i>Next Generation Sequencing</i>) |
| NIH | <i>National Institute of Health</i> |
| OMS | Organisation mondiale de la Santé |
| OS | Survie globale (<i>Overall Survival</i>) |
| OTT | <i>One Twenty-Two</i> |
| PAS | <i>Periodic Acid Schiff</i> |
| PBS1X | <i>Phosphate Buffered Saline</i> |
| PC | Post-Consolidation |
| pC | Pré-Consolidation |
| PCR | <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PHF6 | <i>PHD Finger Protein 6</i> |
| PI | Post-Induction |
| PML | <i>Promyelocytic Leukemia</i> |
| PRC2 | <i>Polycomb Repressive Complex 2</i> |
| PS | <i>Performans status</i> |
| PTPN11 | <i>Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 11</i> |
| RAR α | <i>Retinoic Acid Receptor, Alpha</i> |
| nRAS | <i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i> |
| kRAS | <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i> |
| RBM15 | <i>RNA Binding Motif Protein 15</i> |
| RC | Rémission Complète |
| RFS | Survie sans rechute (<i>Relapse Free Survival</i>) |
| RHD | <i>Runt Homology Domain</i> |
| RIC | <i>Reduced-intensity conditioning</i> |
| ROC | <i>Receiver Operating Characteristic</i> |
| RQ-PCR | PCR quantitative en temps reel (<i>Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>) |
| RR | Risque Relatif |
| RUNX1 | <i>Runt-Related Transcription Factor 1</i> |
| RUNX1T1 | <i>Runt-Related Transcription Factor 1; Translocated To, 1</i> |

| | |
|-------|--|
| SF3B1 | <i>Splicing Factor 3b, Subunit 1</i> |
| s-LAM | LAM secondaire à un syndrome myélodysplasique ou myéloprolifératif |
| SL-IC | <i>SCID-leukemia initiating cell</i> |
| SMC1A | <i>Structural Maintenance Of Chromosomes 1A</i> |
| SMC3 | <i>Structural Maintenance Of Chromosomes 3</i> |
| SPOC | <i>Spen Paralog and Ortholog C-terminal</i> |
| SRSF2 | <i>Serine/Arginine-Rich Splicing Factor 2</i> |
| SS | <i>Side Scatter</i> |
| STAG2 | <i>Stromal Antigen 2</i> |
| SWOG | <i>Southwest Oncology Group</i> |
| Tdt | Terminal Deoxynucleotidyl Transferase |
| TET2 | Tet methylcytosine dioxygenase 2 |
| t-LAM | LAM secondaire à une chimiothérapie |
| TP53 | <i>Tumor Protein p53</i> |
| U2AF1 | <i>U2 Small Nuclear RNA Auxiliary Factor 1</i> |
| WT1 | <i>Wilms Tumor Gene 1</i> |

Table des matières

| | |
|--|----|
| Résumé | 1 |
| Introduction | 3 |
| I. Leucémie Aiguë Myéloïde | 3 |
| 1. Définition..... | 3 |
| 2. Epidémiologie..... | 3 |
| 3. Biologie des leucémies aiguës myéloïdes | 4 |
| i. Cellule initiatrice de leucémie et son microenvironnement..... | 4 |
| ii. Evolution clonale des leucémies aiguës myéloïdes | 6 |
| 4. Diagnostic et Classifications | 10 |
| i. Présentation clinico-biologique..... | 10 |
| ii. Cytologie..... | 12 |
| iii. Phénotype..... | 14 |
| iv. Analyses cytogénétiques | 15 |
| v. Biologie Moléculaire..... | 18 |
| vi. Classification actuelle des leucémies aiguës myéloïdes et néoplasies associées selon l’OMS 2016 (tableau 3) | 24 |
| 5. Facteurs pronostiques | 26 |
| i. Facteurs liés aux patients | 26 |
| ii. Facteurs liés à la maladie | 27 |
| 6. Traitement..... | 33 |
| i. Thérapie d’induction | 33 |
| ii. Thérapies de consolidation..... | 35 |
| iii. Traitement de la rechute ou des patients réfractaires | 36 |
| iv. Particularités de la prise en charge des sujets âgés | 36 |
| v. Soins de support..... | 38 |

| | |
|---|----|
| II. Maladie Résiduelle | 38 |
| 1. Concept et Définition..... | 38 |
| 2. Méthodes de Suivi dans les LAM..... | 40 |
| i. Cytométrie en Flux..... | 40 |
| ii. Biologie moléculaire | 43 |
| Objectifs de l'étude | 48 |
| Matériels et Méthodes | 49 |
| I. Patients et prélèvements | 49 |
| 1. Patients..... | 49 |
| 2. Prélèvements..... | 50 |
| II. Mesure de la Maladie Résiduelle | 52 |
| 1. Cytométrie en Flux | 52 |
| i. Principe de la cytométrie en flux et application à la détection de la maladie résiduelle | 52 |
| ii. Préparation des cellules..... | 52 |
| iii. Cytomètres utilisés..... | 53 |
| iv. Exemple de panel d'anticorps | 53 |
| v. Stratégie d'analyse actuelle..... | 54 |
| vi. Définition des seuils de positivité : | 59 |
| 2. Biologie Moléculaire | 59 |
| i. Isolement cellulaire | 59 |
| ii. Extraction des ARN | 60 |
| iii. Rétrotranscription..... | 60 |
| iv. PCR quantitative en temps réel Taqman®..... | 60 |
| v. Seuils retenus pour analyse des données..... | 62 |
| III. Analyse des données de maladie résiduelle..... | 63 |
| IV. Analyses statistiques..... | 63 |

| | |
|---|----|
| Résultats | 65 |
| I. Descriptions des patients et prélèvements..... | 65 |
| 1. Description de la cohorte..... | 65 |
| 2. Description des prélèvements | 68 |
| 3. Données de survie de la cohorte : | 68 |
| II. Impact pronostique de l'évaluation précoce de la maladie résiduelle par cytométrie en flux et biologie moléculaire..... | 70 |
| 1. Analyse univariée | 70 |
| i. Impact de la MRD sur la RFS..... | 70 |
| ii. Impact de la MRD sur l'OS | 73 |
| 2. Analyse après ajustement | 76 |
| III. Etude de la concordance entre les résultats de cytométrie en flux et de biologie moléculaire | 77 |
| 1. Concordance des résultats de MRD par CMF et BM..... | 77 |
| 2. Etude des discordances entre cytométrie en flux et biologie moléculaire..... | 78 |
| i. Patients présentant une MRD positive par CMF et négative en BM | 78 |
| ii. Patients présentant une MRD négative par CMF et positive en BM | 82 |
| Discussion | 85 |
| Conclusions | 92 |
| Bibliographie..... | 93 |

Résumé

Contexte :

Environ 80% des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) obtiennent une rémission complète (RC) après cure d'induction intensive, mais les rechutes sont fréquentes. Un des objectifs de l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) est d'identifier les patients dont l'évolution sera péjorative. A ce jour, il n'existe pas de marqueur universel de suivi et la place de la cytométrie en flux (CMF) par rapport à la biologie moléculaire (BM) reste à définir.

Méthodes :

128 patients atteints de LAM (à l'exclusion des LAM promyélocytaire), âgés de 16 à 72 ans, ayant eu une évaluation de la MRD au cours de leur suivi et en RC après chimiothérapie d'induction ont été inclus dans cette étude rétrospective monocentrique. L'impact pronostique de la MRD précoce (post-induction ou pré-consolidation 1), évaluée en CMF par la quantification des LAIP (phénotypes aberrants associés à la leucémie) et/ou en BM par PCR quantitative en temps réel sur l'expression de *WT1* et *NPM1* muté, a été analysé sur la survie sans rechute (RFS) et la survie globale (OS), en censurant ou non les données de greffe.

Résultats :

111 patients ont bénéficié d'une évaluation précoce de la MRD, 84 en BM (84 sur *WT1*, 26 sur *NPM1* muté) et 75 en CMF. Une MRD négative (par CMF et/ou BM) est associée à une meilleure RFS ($p=0.0045$) et OS ($p=0.02$). La MRD-BM a un impact sur la RFS ($p=0.0005$) et l'OS ($p=0.0027$). Ces données restent significatives après censure à la greffe. La MRD-CMF n'a un impact sur la RFS qu'après censure des données à la greffe ($p=0.0494$). Après ajustement sur les autres facteurs pronostiques (âge, groupes pronostiques moléculaires, leucocytose, caractère secondaire de la LAM, et localisation extramédullaire au diagnostic), le statut de la MRD CMF et/ou BM et de la MRD-BM est significativement associé avec la RFS ($p=0.0026$ et $p=0.0013$ respectivement), avec ou sans censure des données à la greffe. D'autre part, la MRD-BM est un facteur pronostique indépendant de l'OS ($p=0.0483$). La MRD CMF et/ou BM a un impact pronostique indépendant sur l'OS après censure à la greffe ($p=0.0113$). La concordance des évaluations de MRD obtenues par BM et CMF est modérée ($\kappa=0.47$).

Conclusion :

L'utilisation de la CMF augmente le nombre de patients suivis sur la MRD. L'évaluation précoce d'une MRD par CMF et/ou BM permettrait d'identifier les patients à haut risque de rechute et d'adapter leur prise en charge en proposant notamment des protocoles d'intensification plus précocement.

Introduction

1. Leucémie Aiguë Myéloïde

1. Définition

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un groupe de maladies agressives hétérogènes, caractérisées par une prolifération clonale et non contrôlée de cellules hématopoïétiques immatures anormales, communément appelées blastes, qui ont perdu leur capacité de différenciation et s'accumulent dans la moelle osseuse et le sang (1).

2. Epidémiologie

Le diagnostic de LAM est rare dans la population générale. Aux Etats-Unis, les LAM représentent 1,3% des nouveaux cancers diagnostiqués (2). C'est la 5^{ème} hémopathie maligne la plus diagnostiquée en France, après les myélomes multiples/plasmocytomes, les leucémies lymphoïdes chroniques/lymphomes lymphocytiques, les lymphomes B diffus à grandes cellules et les syndromes myélodysplasiques (3). En France, l'âge médian au diagnostic est de 71 ans, indépendamment du sexe ; il est de 67 ans aux Etats-Unis (2, 3).

L'incidence des LAM en 2012, basée sur le registre de 14 départements français, est de 2 791 nouveaux cas de LAM, dont 49 % diagnostiqués chez l'homme. Le taux d'incidence standardisé sur la population européenne est de 3,5 pour 100 000 par an chez l'homme et de 3,0 pour 100 000 par an chez la femme soit un rapport hommes/femmes de 1,2 (3). Ces données sont comparables avec l'incidence européenne évaluée à 3,7 nouveaux cas pour 100 000 habitants par an (hommes : 4,0 versus femmes : 3.4) (4) et l'incidence américaine sur les données du NIH (*National Institute of Health*) de 4 pour 100 000 habitants par an (2). D'autre part, son incidence varie grandement avec l'âge (figure 1). En effet, elle est relativement basse chez les sujets de moins de 40 ans puis croit jusqu'à 60 ans avant d'augmenter significativement au-delà, notamment chez les hommes. En 2012, plus de 60% des nouveaux cas de LAM ont été diagnostiqués chez des patients de plus de 65 ans, et le taux des diagnostics chez les plus de 80 ans avoisinait les 30% (3).

L'estimation de la survie à 5 ans en Europe est d'environ 17% toutes LAM confondues (5) et 26.6% selon le registre américain NIH (2). Le chiffre augmente à 67% pour un sous type de LAM, les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) (5).

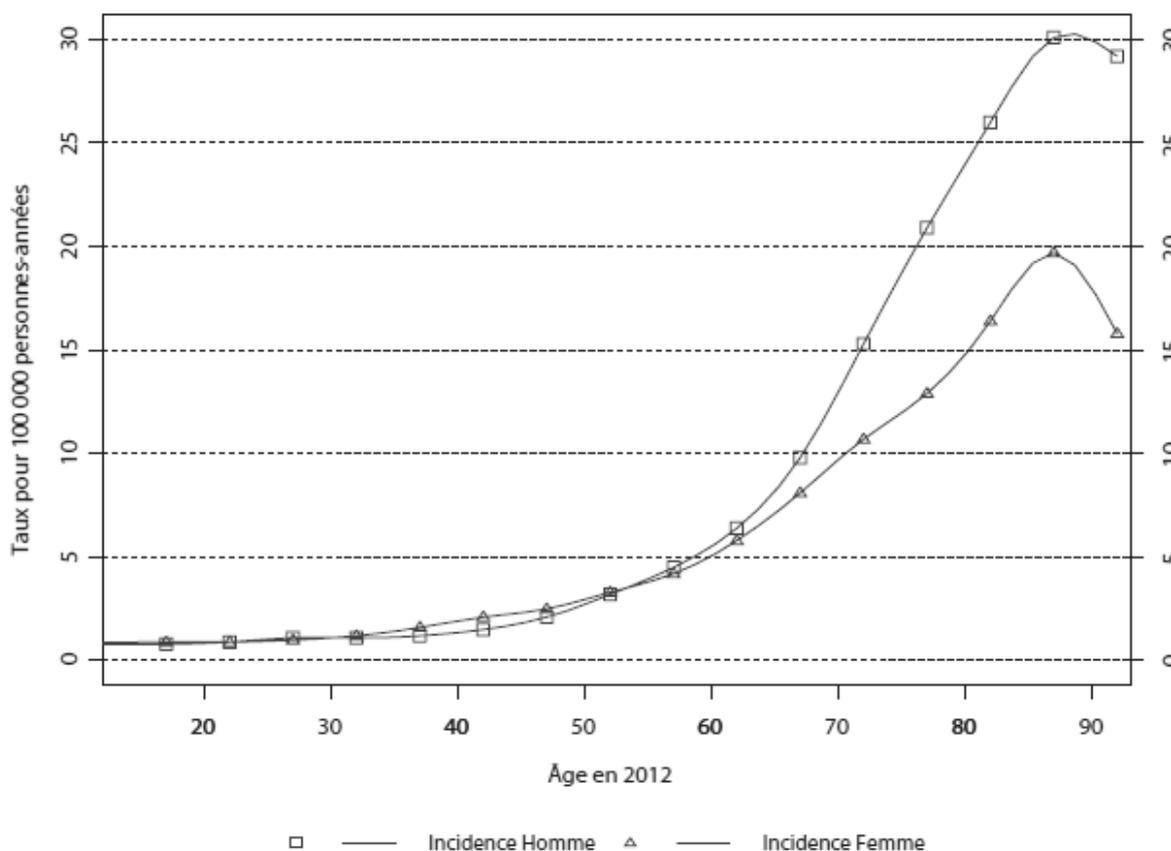


Figure 1 : Incidence par âge des leucémies aiguës myéloïdes en 2012, en France (3).

3. Biologie des leucémies aiguës myéloïdes

i. Cellule initiatrice de leucémie et son microenvironnement

Au moment du diagnostic de LAM, la population de cellules tumorales n'est pas homogène, elle est constituée de contingents d'abondance variable et aux propriétés de prolifération distinctes. Pour expliquer cette hétérogénéité, un modèle hiérarchique a été décrit par Dick *et al.* dans les années 1990 (6). Dans ce modèle, la leucémie reproduit le schéma de l'hématopoïèse normale, c'est à dire où une cellule initiatrice de leucémie, ou cellule souche leucémique (CSL), douée d'auto-renouvellement est capable d'entrer dans un processus de différenciation et de donner des progéniteurs leucémiques.

Dans ces travaux, il a en effet été montré l'existence d'une sous population plus ou moins rare de cellules leucémiques, appelées SL-IC (*SCID-leukemia initiating cell*) puis CSL, qui sont capables d'initier une leucémie en cas de xélogreffe chez des souris immunodéprimées. Ces CSL possèdent des capacités d'auto-renouvellement et sont également capables de donner des cellules leucémiques progénitrices plus différenciées, non clonogéniques qui peuvent elles mêmes se différencier en cellules leucémiques matures. Par la suite John Dick a montré que ces cellules peuvent être isolées dans toutes les LAM bien qu'en proportion variable et qu'elles présentent un phénotype proche des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSL à l'instar des CSH peuvent entrer en quiescence et présentent alors une résistance aux chimiothérapies classiques qui sont dépendantes du cycle cellulaire (6, 7).

Si le modèle hiérarchique proposé par Dick est aujourd'hui largement accepté, il persiste des débats sur l'origine des CSL. Initialement l'équipe de Dick a émis l'hypothèse que ces cellules dérivait d'une cellule souche hématopoïétique car elles en partagent les propriétés cellulaires et ont un immunophénotype proche. Toutefois, plusieurs auteurs ont depuis montré qu'une cellule progénitrice leucémique normalement dépourvue de capacité d'auto-renouvellement pouvait réacquérir des propriétés de cellule souche en cas d'activation de certaines voies oncogéniques (1, 8). Les CSL peuvent donc probablement dériver de plusieurs types de cellules hématopoïétiques (Figure 2).

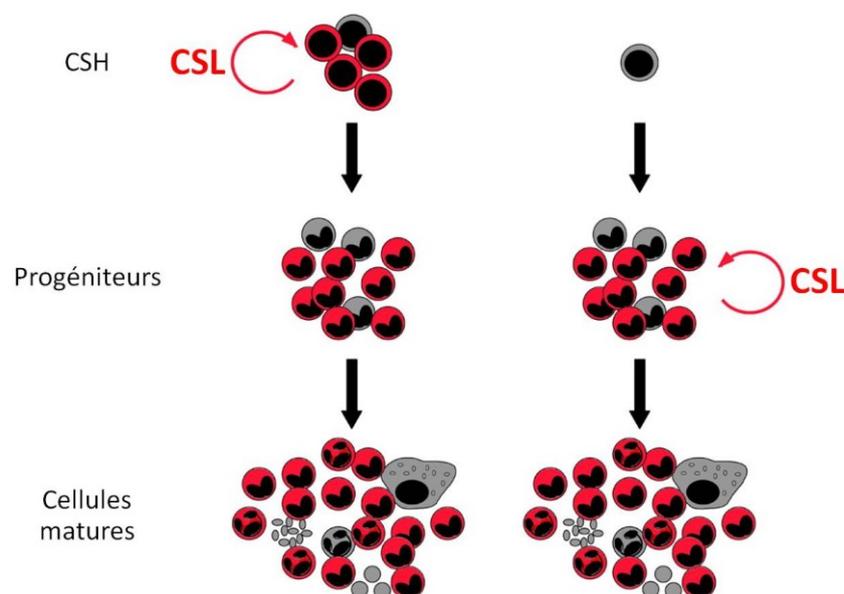


Figure 2 : Origine de la cellule souche leucémique (9). CSH : Cellule Souche Hématopoïétique, CSL : Cellule Souche Leucémique.

Récemment plusieurs auteurs se sont intéressés à l'environnement des CSL. Au cours de l'hématopoïèse non pathologique, les niches hématopoïétiques situées dans la moelle osseuse

sont vitales pour les CSH. C'est un microenvironnement spécialisé constitué de nombreux types cellulaires. Les interactions entre les cellules du microenvironnement et les cellules souches permettent de réguler la réponse en cas de stress ou d'infection. Dans les LAM, les CSL occupent des niches hématopoïétiques similaires à celles des CSH. Les CSL détournent les propriétés de soutien de ces niches hématopoïétiques à leur profit et s'entourent d'un microenvironnement et d'interactions cellulaires spécifiques. Récemment, il a été montré que si les CSL ont un impact sur leur environnement, la réciproque est également vraie. En effet, un certain nombre d'altérations moléculaires des cellules du microenvironnement jouent un rôle dans la leucémogénèse (10).

ii. Evolution clonale des leucémies aiguës myéloïdes

C'est au début des années 2000, que le concept d'une leucémogénèse en plusieurs étapes émerge. Cette théorie est issue de travaux murins. Dans ces travaux il a été montré que l'induction de l'expression de PML-RAR α (protéine spécifique associée aux LAP) chez la souris va être responsable du développement d'une leucémie chez une partie des souris transgéniques et seulement après une longue période de latence (11). Cette expérience suggère que pour survenir la leucémie requiert un deuxième événement oncogénique chez ces souris. Une évolution similaire est retrouvée chez l'homme, par exemple chez les patients qui présentent une mutation constitutionnelle de *RUNX1* et qui ne développent une LAM que tardivement au cours de leur vie (12).

D'après Gilliland *et al.* (13), au moins deux altérations géniques aux conséquences fonctionnelles distinctes sont nécessaires à l'apparition d'une LAM selon la théorie de « two-hit model » :

- une mutation de type I, aboutissant à un avantage de survie ou de prolifération suite à l'activation anormale d'une voie de transduction. Leur description par Gilliland *et al.* regroupe initialement les mutations de *FLT3*, de *RAS* ou *KIT*. Ces mutations sont observées dans 50% des leucémies et sont exclusives (14).
- une mutation de type II, aboutissant à un blocage de différenciation. Celles-ci sont des mutations de facteurs de transcription ou de co-activateurs. Les transcrits de fusion PML-RAR α , CBF β -MYH11, RUNX1-RUNX1T1 en sont des exemples au même titre que les mutations de *RUNX1*, ou *CEBPA* (14).

Dans ce modèle, les mutations de type II sont initiatrices de leucémie tandis que les mutations de type I surviendraient plus tard dans la leucémogénèse.

Avec l'apparition de nouvelles technologies moléculaires, le champ de détection des mutations des LAM s'est considérablement élargit. En 2013, le *Cancer Genome Atlas Research Network* a présenté les résultats d'une étude génomique portant sur 200 leucémies aiguës *de novo* et comprenant un séquençage du génome ou de l'exome, un séquençage des ARN et des microARN et l'analyse de la méthylation de l'ADN (15). Il en ressort que contrairement aux autres cancers et notamment aux cancers solides, les LAM présentent moins de mutations géniques (13 en moyenne). Celles-ci peuvent être répertoriées selon 9 classes distinctes pertinentes d'un point de vue physiopathologique. Ces dernières sont exposées dans la figure 3.

Parmi ces mutations, en moyenne 5 sont régulièrement retrouvées dans les LAM : les mutations touchant *RUNX1*, *DNMT3A*, *CEBPA*, *IDH1/2* et *NPM1* (15). Ces mutations sont exclusives des translocations aboutissant à un transcrit de fusion et il a donc été suggéré qu'elles soient de type II selon Gilliland c'est à dire initiatrices de leucémie.

L'étude du *Cancer Genome Atlas Research Network* a mis en évidence les limites du modèle proposé par Gilliland :

- Dans cette étude, seuls 59% des patients présentaient une mutation de type I selon Gilliland *et al.*.

- Certaines anomalies moléculaires ont des conséquences fonctionnelles parfois complexes et dans certains cas ont un effet synergique avec d'autres anomalies si bien qu'il est impossible de leur attribuer une catégorie spécifique (exemple de *NPM1* et *WT1*).

- Il est possible lors du diagnostic de LAM de retrouver plusieurs sous clones aux propriétés distinctes.

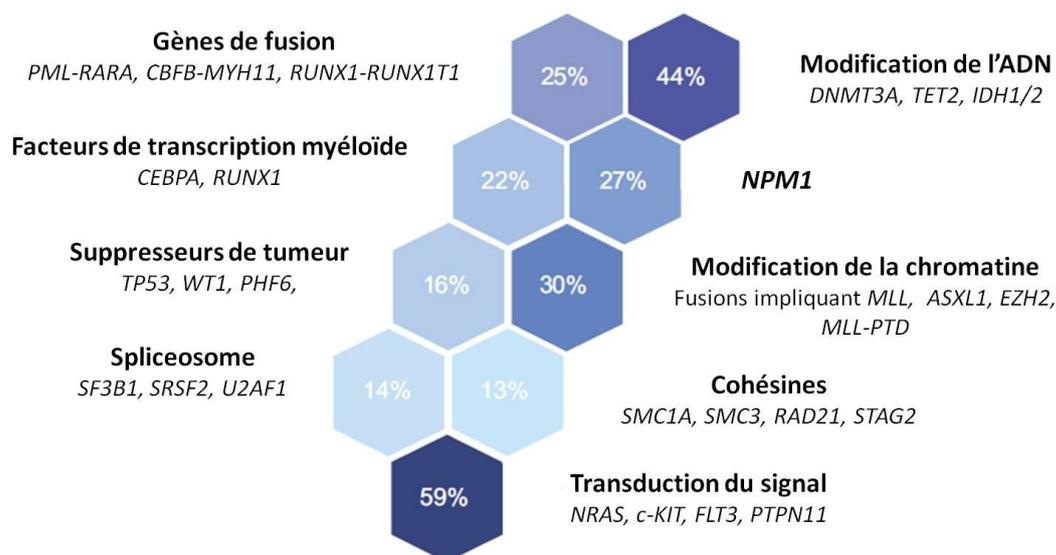


Figure 3 : Mutations récurrentes dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes *de novo*, basé sur les données du *Cancer Genome Atlas Research Network* (15), adapté de (1). Les gènes mutés de manière récurrente dans les LAM appartiennent à des groupes fonctionnels distincts. Les groupes les plus importants sont ici représentés associés à leur fréquence.

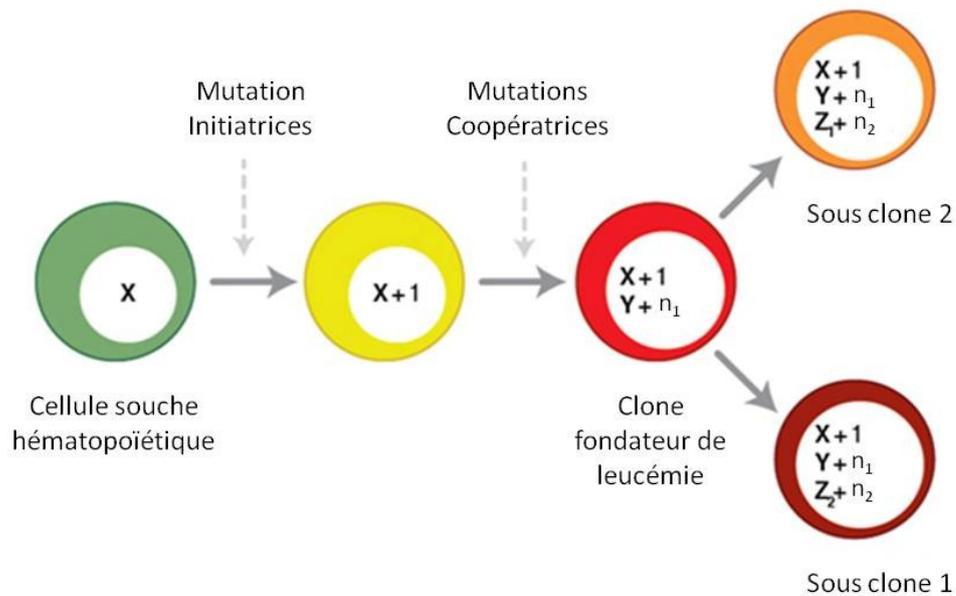
Afin de prendre en compte ces difficultés, Welch *et al.* (16), à partir de données sur les LAP et LAM 1, ont proposé un autre modèle d'évolution clonale en distinguant plusieurs types d'anomalies :

- des anomalies dites *initiatrices*. Elles sont présentes dans le clone initial et persistent au cours de l'évolution de la maladie. Elles apportent un avantage sélectif à la cellule.
- des anomalies dites *coopératrices* qui surviennent par la suite et confèrent d'autres avantages à la cellule.

Les anomalies *initiatrices* et *coopératrices* sont qualifiées de *driver*, et sont retrouvées de manière récurrentes dans les LAM.

- des anomalies dites *passenger* dépourvues d'avantage fonctionnel pour la cellule leucémique. Elles représentent néanmoins le bagage mutationnel que va acquérir la cellule au cours de son évolution. Celles-ci surviennent de manière linéaire avec l'âge et s'accumulent entre chaque anomalie *driver*.

Dans ce modèle, les cellules leucémiques ont en commun les mutations *initiatrices* puis elles évoluent en accumulant d'autres mutations *driver* et *passenger* pouvant aboutir à l'émergence de plusieurs sous clones qui vont eux même accumuler de nouvelles mutations d'où l'hétérogénéité parfois retrouvée au diagnostic (figure 4) (16).



X : mutations *passenger* dépendant de l'âge, préexistant au sein des CSH
 Y : mutations *passenger* acquises entre les mutations initiatrice et coopératrices
 Z : mutations *passenger* acquises durant la progression

Figure 4 : Modèle de leucémogénèse intégrant les mutations *driver* (initiatrices et coopératrices) et *passenger*, adapté de (16).

Ce modèle permet de mieux appréhender la complexité et la diversité des anomalies moléculaires retrouvées dans les LAM au diagnostic et à la rechute (17). Lorsqu'on y ajoute l'influence du traitement qui peut sélectionner un des sous clones voir favoriser l'émergence d'un autre clone non présent au diagnostic (*e.g.* LAM secondaire au traitement), on aboutit à un modèle avec de nombreuses possibilités sur la plan moléculaire (Figure 5).

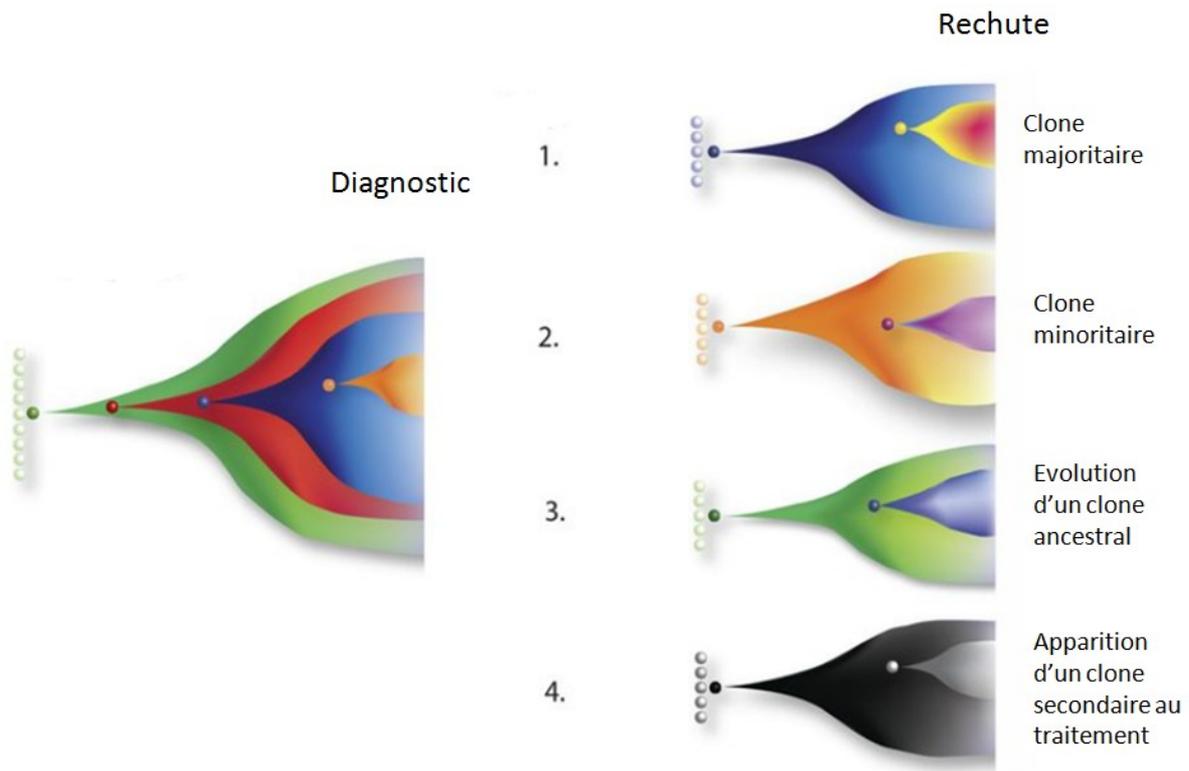


Figure 5 : Evolution et hétérogénéité clonales des leucémies aiguës myéloïdes, adapté de (18). Chaque couleur représente un clone avec son bagage mutationnel (association de mutations *driver* et *passenger*) qui lui est propre.

4. Diagnostic et Classifications

i. Présentation clinico-biologique

La présentation clinique d'une leucémie aiguë est très variable. Parfois asymptomatique et suspectée sur la seule biologie, elle peut au contraire entraîner des complications inaugurales bruyantes nécessitant une prise en charge urgente en milieu spécialisé.

Sur le plan clinique, deux syndromes témoins d'une prolifération tumorale sont classiquement retrouvés :

- L'insuffisance médullaire, manifestation la plus fréquente de la maladie, reflète l'infiltration médullaire blastique et est caractérisée par un syndrome anémique, un syndrome hémorragique et/ou un syndrome infectieux.
- Le syndrome tumoral, plus rare.

Le syndrome anémique est d'autant plus bruyant que l'anémie s'est installée de manière rapidement progressive. Ses symptômes sont en rapport avec une diminution de

l'hémoglobine et une diminution du transport de l'oxygène aux organes : pâleur cutanéomuqueuse, tachycardie, douleur thoracique, dyspnée et asthénie.

Les hémorragies, secondaires à la diminution du taux de plaquettes, sont essentiellement cutanéomuqueuses et peuvent être aggravées en cas d'association à une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

Les infections, secondaires à la neutropénie, sont volontiers de localisation ORL. Elles sont souvent associées à des signes de gravité hémodynamique plus précoces ou se présentent sous la forme d'une hyperthermie résistante aux antibiotiques.

Le syndrome tumoral peut se manifester sous plusieurs formes :

- atteinte des organes hématopoïétiques secondaires : hépatomégalie, splénomégalie et adénopathies,
- atteinte extramédullaire :
 - o les leucémies fréquemment associées aux LAM à composante monoblastique ou monocyttaire,
 - o l'hypertrophie gingivale surtout retrouvée dans les LAM à composante monocyttaire ou monoblastique,
 - o l'atteinte neuroméningée suspectée devant la présence d'une paralysie des nerfs crâniens le plus souvent mais aussi de céphalées
 - o les sarcomes granulocytaires (masses de cellules blastiques) pouvant atteindre toutes les localisations extramédullaires.

Les formes hyperleucocytaires des LAM peuvent être associées à une leucostase dans les capillaires dont les manifestations très variées sont principalement pulmonaires, neurologiques, oculaires.

Sur le plan biologique :

- L'hémogramme ou numération formule sanguine permet dans la majorité des cas d'évoquer le diagnostic. L'atteinte peut porter d'emblée sur les trois lignées avec une pancytopenie mais elle peut être dissociée et n'atteindre qu'une ou deux lignées. L'anémie est classiquement arégénérative, normo ou macrocytaire. La thrombopénie est profonde souvent inférieure à 20 G/L. Cette pancytopenie s'associe de manière inconstante à une blastose circulante. Dans certains cas, une hyperleucocytose majeure dépassant 100 G/L est retrouvée définissant les formes hyperleucocytaires (le plus souvent associées aux leucémies à composante monocyttaire ou monoblastique).

- L'analyse biochimique peut mettre en évidence un syndrome de lyse spontané associant une hyperuricémie, une hausse des lactates déshydrogénases (LDH), hyperphosphorémie, hypocalcémie et une hyperkaliémie. Ce syndrome de lyse se complique souvent d'une insuffisance rénale.
- Des troubles de la coagulation à type de CIVD peuvent être mis en évidence notamment dans les LAP et dans les formes hyperleucocytaires. Ils doivent être systématiquement recherchés car ils imposent une prise en charge urgente.

ii. Cytologie

Le diagnostic de leucémie aiguë repose sur l'analyse cytologique du médullogramme et/ou des frottis sanguins. Après coloration des frottis par la coloration de May-Grunwald-Giemsa, un compte cellulaire est réalisé. Selon les critères de qualité, le compte cellulaire doit être établi sur plus de 200 leucocytes pour l'étude du frottis sanguin et sur plus de 500 cellules nucléées pour l'étude des frottis médullaires (19). Une blastose médullaire ou sanguine supérieure à 20% permet de retenir le diagnostic de leucémie aiguë. Ce chiffre peut être revu à la baisse pour les leucémies présentant une translocation équilibrée t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16) (19).

Afin de déterminer le caractère myéloïde ou lymphoïde de la leucémie aiguë, des analyses cytochimiques permettent de compléter l'analyse cytologique. La réaction cytochimique de la myéloperoxydase est la plus souvent pratiquée et permet la mise en évidence de cette enzyme dans les granules cytoplasmiques des cellules myéloïdes (l'enzyme dégrade le perhydrol et oxyde la benzidine qui précipite sous forme de granulations colorées en brun-noir, on peut utiliser le chloronaphtol qui précipite en un produit rouge). Une positivité sur les blastes supérieure ou égale à 3% en en faveur d'une LAM. Sa négativité n'exclut cependant pas le diagnostic.

D'autres analyses cytochimiques peuvent présenter un intérêt dans certains cas particuliers. Ainsi les estérases non spécifiques (NASDA) sont par exemple très positives dans la majorité des monoblastes, promonocytes et monocytes et plus faiblement dans les myéloblastes et cette positivité est seulement inhibée dans la lignée monocyttaire par le fluorure de sodium.

Le groupe coopératif FAB (French American British) a proposé une classification en 1976 (20) révisée en 1985 (21) puis en 1991 (22) qui se base sur les caractéristiques cytologiques et cytochimiques du myélogramme et celles du frottis sanguin pour répartir les LAM en 8

groupes distincts (Tableau 1). A noter que les diagnostics de LAM0 et LAM7 ne peuvent pas être retenus sur de simples critères morphologiques mais nécessitent une analyse immunophénotypique (21, 22).

Le diagnostic cytologique présente un intérêt majeur dans le cadre des LAP (ou LAM3) qui sont associées presque exclusivement à une translocation (15;17). Dans ces leucémies, les complications initiales grèvent le pronostic et le diagnostic doit donc être posé rapidement afin d'initier un traitement dans les plus brefs délais, sans attendre de confirmation cytogénétique.

| Type FAB et fréquence | Caractéristiques Cytologiques sur le frottis médullaire | Caractéristiques Cytochimiques |
|--|--|--|
| M0 LA myéloblastique peu différenciée 2% | Blastes indifférenciés Aspect miroir à main Rapport nucléo-cytoplasmique parfois élevé (~lymphoblaste) Absence de granulations cytoplasmiques | MPO négative |
| M1 LA myéloblastique sans maturation 20% | Myéloblastes sans maturation Peu ou pas de granulations/corps d'Auer cytoplasmiques Nombreux blastes (≥ 90% des cellules non érythroïdes) | MPO positive |
| M2 LA myéloblastique avec maturation 30% | Myéloblastes avec maturation Nombreuses granulations azurophiles Corps d'Auer (souvent unique) Dysmyélopoïèse ≥ 10% cellules sont de la lignée neutrophile +/- éosinophiles, basophiles ou mastocytes sans anomalies | MPO positive |
| M3 LA Promyélocytaire 10% | Promyélocytes anormaux - M3 classique nombreux corps d'Auer "en fagots" nombreuses granulations azurophiles parfois coalescentes - M3 variant noyau bilobé blastes dépourvus de granulations rares cellules avec corps d'Auer "en fagots" | MPO fortement positive |
| M4 LA Myélomonocytaire 15% | Myéloblastes, Monoblastes ou Promonocytes Lignée neutrophile ≥ 20% des cellules nucléées Lignée monocytaire ≥ 20% des cellules nucléées -M4éo éosinophiles anormaux (larges granulations éosinophiles) | MPO positive dans les myéloblastes Lignée monocytaire : - MPO négative ou légèrement positive - NASDA positive inhibée par fluorure de sodium |
| M5 LA Monoblastique 15% | Lignée monocytaire ≥ 80% Lignée neutrophile < 20% Parfois hémophagocytose - M5a : sans différenciation présence de monoblastes (≥ 80% des cellules) - M5b : avec différenciation présence majoritairement de promonocytes et monocytes | NASDA positive inhibée par fluorure de sodium MPO négative ou légèrement positive |
| M6 LA Erythroblastique 5% | - Erythroleucémie population érythroblastique ≥ 50% des cellules nucléées myéloblastes ≥ 20% des cellules nucléées dysérythropoïèse (cellules multinucléées, vacuoles...) dysgranulopoïèse et dysmégacaryopoïèse fréquente - Leucémie érythroblastique pure population blastique indifférenciée ou proérythroblastique ≥ 80% | MPO positive dans les myéloblastes Erythroblastes : - MPO négative - NASDA positives - PAS positif dans vacuoles |
| M7 LA mégacaryoblastique 2% | Mégacaryoblastes ≥ 50% des blastes sont de la lignée mégacaryocytaire Dysmégacaryopoïèse Fibrose à la biopsie ostéo-médullaire | MPO négative NASDA parfois positive (ponctuée) PAS parfois positive |

Tableau 1 : Classification des LAM selon le groupe French American British, basée sur l'aspect cytologique et cytochimique des blastes (20-22).

iii. Phénotype

L'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) au diagnostic est fondamentale et doit faire partie intégrante des examens réalisés sur les prélèvements initiaux. Cette technique repose sur la détection de marqueurs antigéniques membranaires ou cytoplasmiques à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome.

Les panels de détection antigénique utilisés en pratique courante permettent :

- d'identifier la lignée d'une leucémie aiguë, même pauci cellulaire, par un panel d'orientation incluant des marqueurs myéloïdes, lymphoïdes B ou T et d'immaturité (23, 24). La positivité d'au moins 2 marqueurs appartenant à une même lignée est nécessaire (23). Un marqueur est généralement considéré comme positif lorsque son expression intéresse au moins 10-20% des blastes (19). En outre, la comparaison des marqueurs immunophénotypiques des blastes avec les marqueurs de différenciation des précurseurs hématopoïétiques permet de déterminer le niveau du blocage de maturation des cellules blastiques (24, 25).
- d'établir le diagnostic des LAM peu différenciées (LAM0), mégacaryoblastiques (LAM7) ou de leucémie aiguë avec ambiguïté de lignée dont le diagnostic ne peut être retenu sur les seuls arguments cytologiques (21, 22).
- de rechercher des marqueurs dont l'expression aberrante constituera la base d'un suivi de maladie résiduelle par CMF (26).
- D'utiliser des thérapies ciblées, notamment des anticorps monoclonaux (*e.g.* le Gemtuzumab Ozogamicin dans le cadre de la prise en charge des LAM CD33⁺)

Le tableau 2 ci-dessous présente les différents marqueurs de surface ou cytoplasmiques utilisés dans le cadre du diagnostic d'une leucémie aiguë myéloïde.

| | |
|---|--|
| Marqueurs associés aux stades précurseurs | CD34, CD38, CD117, CD133, HLA-DR |
| Marqueurs granulocytaires | CD13, CD15, CD16, CD33, CD65, cMPO |
| Marqueurs monocytaires | CD11c, CD14, CD64, lysozyme, CD4, CD11b, CD36, NG2 homologue |
| Marqueurs mégacaryocytaires | CD41, CD61, CD42 |
| Marqueurs érythroïdes | CD235a (glycophorine A) |

Tableau 2 : Antigènes exprimés par les cellules blastiques myéloïdes en fonction de leur stade de maturation et différenciation, d'après (19). CD : Classe de différenciation, MPO : Myéloperoxydase, HLA : Human-Leukocyte Antigen, NG2 : Neuron-Glial antigen 2.

iv. Analyses cytogénétiques

Les examens cytogénétiques doivent être réalisés lors de la prise en charge au diagnostic de chaque nouvelle leucémie aiguë. Ils apportent des données importantes dans le diagnostic, le pronostic et le suivi des leucémies. On distingue traditionnellement le caryotype conventionnel de la technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH, *Fluorescence In Situ Hybridization*).

Caryotype conventionnel

Cette technique repose sur l'observation des chromosomes permettant de déterminer des anomalies de nombre et/ou de structure. Elle peut être réalisée sur des prélèvements sanguins ou médullaires. Elle consiste à placer les cellules en culture pendant 24 à 48 heures dans un milieu contenant du G-CSF (*Granulocytes Colony-Stimulating Factor*). Les cellules sont ensuite traitées afin d'obtenir le plus grand nombre de cellules en métaphases qui seront ultérieurement éclatées afin d'analyser les chromosomes grâce à plusieurs méthodes de coloration (quinacrine, Giemsa). Pour une interprétation optimale, une analyse sur un minimum de 20 cellules en métaphase est recommandée (27).

Selon les études, un caryotype est interprétable pour environ 80% des patients atteints de LAM (28, 29). Chez les sujets jeunes, environ 40% des patients présentent un caryotype normal et 12-14% des patients présentent un caryotype complexe au diagnostic (28-30) (Figure 6). Un caryotype complexe est défini, selon les études (28-30), par la présence de 3 ou 4 anomalies au caryotype à l'exclusion des anomalies récurrentes.

Environ un tiers des patients atteint de LAM présentent une translocation équilibrée au diagnostic. Certaines de ces anomalies sont associées à des types particuliers de leucémies d'après la classification FAB:

- Les LAM avec t(15;17) sont exclusivement des LAP (ou LAM3) (31).
- Les LAM avec t(8;21) sont associées aux LAM2 (80%) et inversement 25% des LAM2 présentent une t(8;21) (32, 33).

A noter que la présence d'une translocation t(8;21) confère aux LAM2 un aspect cytologique et phénotypique particulier : les blastes présentent un cytoplasme basophile à l'intérieur duquel on retrouve un corps d'Auer unique, piqué dans le noyau. Un excès d'éosinophiles ou de mastocytes peut être retrouvé (34). Le phénotype est fréquemment CD33⁺ et CD13⁺, associé parfois à des marqueurs aberrants (CD19, Tdt, CD56) (23).

- Les LAM associées à une t(16 ;16) ou une inv(16) sont des LAM4 avec éosinophiles anormaux (LAM4Eo) (32, 35).

Ces translocations équilibrées aboutissent à la naissance de transcrits de fusions détectables par biologie moléculaire (BM) dont nous aborderons par la suite les caractéristiques.

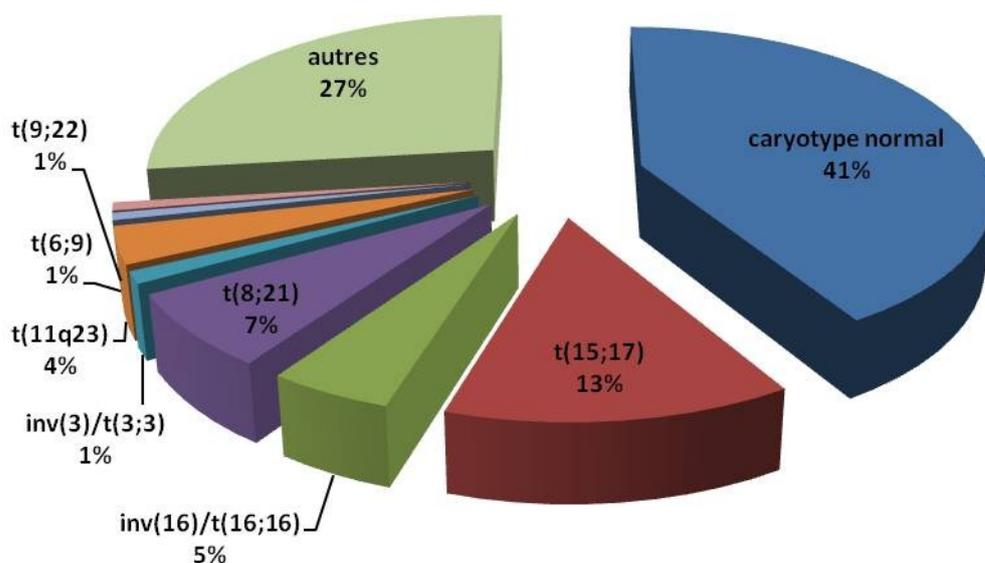


Figure 6 : Répartition des anomalies cytogénétiques au diagnostic de leucémie aiguë myéloïde sur une cohorte de 5876 patients âgés de 16 à 59 ans et traités selon un protocole intensif. Cette répartition inclut des patients présentant des LAM *de novo* mais aussi secondaires (30).

Analyse par FISH

La technique de FISH repose sur la détection de séquences d'acides nucléiques à l'aide de sondes d'hybridation constituées d'ADN complémentaire et couplées à un fluorochrome. Elle peut être réalisée sur des préparations cytogénétiques (noyaux en métaphase) ou cytologiques (noyaux en interphase). Il existe une grande variété de sondes : des sondes de fusion pour détecter des gènes de fusion et des sondes de réarrangement (*break-apart*) pour la détection des réarrangements géniques. C'est une technique intéressante car elle peut être réalisée sur des noyaux en interphase, les résultats sont donc en général obtenus plus rapidement. Cependant, cette technique d'étude est ciblée (dépendante des sondes utilisées) ce qui en limite l'utilisation.

Dans l'étude des LAM, la FISH est utilisée dans certains contextes :

- Détection d'anomalies cryptiques :
 - o Les réarrangements de *KMT2A* (*MLL*) (du fait des nombreux partenaires et des nombreux points de cassure existants) (19, 36) qui constituent son principal intérêt en pratique clinique.
 - o L'inv(16) ou la t(16;16)
- Caryotype conventionnel non réalisable (pas assez de métaphases, défaut de culture) : l'étude par FISH peut permettre de rechercher des anomalies génétiques pronostiques

v. *Biologie Moléculaire*

L'utilisation de la cytogénétique a constitué une avancée majeure dans la prise en charge des LAM, toutefois une proportion non négligeable des LAM (environ 40%) présentent un caryotype normal au diagnostic (28-30). Le développement récent des nouvelles méthodes de séquençage haut débit a permis de compléter nos connaissances sur les bases moléculaires des LAM. Ces nouvelles données sont particulièrement pertinentes dans le cas des LAM à caryotype normal (LAM-CN).

Malgré l'engouement actuel pour ces nouvelles technologies, les recommandations établies par l'*European Leukemia Net* (ELN) en 2010 limitent le recours à la BM :

- A la validation d'un diagnostic en cas d'échec des techniques de cytogénétique,
- A la recherche de mutation de *NPM1*, *FLT3*, *CEBPA* lorsque le caryotype est normal (19).

Au vu de la littérature récente, la quantification de ces anomalies est souhaitable, même en dehors du cadre des recommandations actuelles (uniquement recommandé pour les LAP (37)). En effet, les données quantitatives permettent de mieux apprécier la profondeur de la réponse au traitement et de suivre la maladie résiduelle (MRD).

Nous présentons ici les anomalies moléculaires les plus fréquemment retrouvées et/ou apparaissant dans la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2016. Ces anomalies sont regroupées ci-dessous en catégories fonctionnelles telles qu'elles sont décrites par le *Cancer Genome Atlas Research Network*.

Gènes de fusion

RUNX1-RUNX1T1 : Ce gène de fusion est issu de la t(8;21)(q22;q22) décrite pour la première fois par Rowley *et al.* en 1973 (38). Les LAM avec transcrite de fusion *RUNX1-RUNX1T1* représentent environ 5 à 10% des LAM de l'adulte. Le gène *RUNX1* est situé sur le chromosome 21 et code pour la sous-unité transcriptionnelle α du *Cord Binding Factor* (CBF) qui est essentielle dans la régulation de la croissance et de la différenciation granulocytaire. Elle possède un domaine RHD (*Runt Homology Domain*) de liaison à l'ADN. Le gène *RUNX1T1* est quant à lui situé sur le chromosome 8 et code une protéine interagissant avec des récepteurs nucléaires ayant une fonction de corépresseurs (par le recrutement d'histone désacétylase (HDAC) et de la protéine Sin3A. La protéine chimérique générée par la fusion de ces deux gènes est responsable d'une répression transcriptionnelle des gènes cibles de *RUNX1* (32). Cette anomalie moléculaire est associée dans environ 70%

des cas à des anomalies cytogénétiques additionnelles et environ 50% des cas à des anomalies géniques (32).

CBFB-MYH11 : La présence d'une t(16;16)(p13;q22) ou d'une inv(16), aboutit à la fusion du gène *CBFB* présent sur le chromosome 16q22 avec le gène *MYH11* en 16p13.1 (39). Le gène *CBFB* code pour la sous-unité β de l'hétérodimère CBF. Cette sous unité stabilise la liaison à l'ADN de la sous unité α et participe donc également à la régulation de l'hématopoïèse normale. Le gène *MYH11* code pour la chaîne lourde de la myosine muscle lisse. La protéine de fusion de ces deux gènes se lie à la sous unité α et la séquestre aboutissant à des anomalies transcriptionnelles des gènes cibles de RUNX1 (32). Plus d'une dizaine de formes du transcrit de fusion sont décrites dans la littérature parmi lesquelles les formes A, D ou E représentent 95 % des transcrits (40).

PML-RARA : La translocation équilibrée t(15;17)(q24;q21) associe le gène du récepteur nucléaire à l'acide rétinoïque situé sur le chromosome 17 au proto-oncogène (facteur nucléaire régulateur) *PML* situé sur le chromosome 15. Cette fusion aboutit à la répression transcriptionnelle de nombreux facteurs impliqués dans la différenciation, l'apoptose et la prolifération. Trois transcrits de fusion sont décrits en fonction de la part du gène *PML* impliqué dans le réarrangement. Cette translocation peut être associée dans environ 25-30% des cas environ à d'autres anomalies cytogénétiques (41, 42). De nouveaux transcrits de fusions plus rares ont été décrits plus récemment (43).

DEK-NUP214 : Ce gène de fusion est issu de la translocation (6;9)(p22;q34). Cette translocation rare est retrouvée dans moins de 2% des LAM (28). La fusion des deux gènes entraîne la formation d'une nucléoporine ayant une activité de facteur de transcription et qui altère le transport nucléaire en se fixant aux facteurs de transport solubles. Cette anomalie est souvent isolée sur le plan cytogénétique et associée aux mutations *FLT3-ITD* (44).

RBM15-MKLI (OTT-MAL) : Ce transcrit de fusion est habituellement retrouvé chez les plus jeunes et est associé au syndrome de Down. Il n'est pas décrit chez l'adulte. Au cours de cette translocation, le gène *MKLI (MAL)* impliqué dans l'organisation chromatinienne est fusionné avec le gène *RBM15 (OTT)* impliqué dans la reconnaissance de motifs ARN et qui code pour un domaine SPOC (*Spen paralog and ortholog C-terminal*) (44).

BCR-ABL : ce transcrit de fusion est plus rarement retrouvé dans les LAM *de novo* (1%) (45, 46) et est principalement connu pour son rôle dans les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL).

Toutefois il a récemment été ajouté à la classification OMS 2016 comme entité provisoire (47).

Facteurs de transcription myéloïdes

CEBPA : Ce gène, situé en 19q13, code pour un facteur de transcription impliqué dans la régulation de la prolifération et de la différenciation des progéniteurs myéloïdes. Deux principaux types de mutations ont été décrits. Des mutations non sens dans la région N-terminale et des mutations dans le cadre de lecture de la région C-terminale leucine zipper. Dans plus de 50% des cas, les deux allèles sont touchés. Ces mutations sont retrouvées dans environ 10% des LAM-CN(48).

RUNX1 : Les mutations de ce gène sont plus rares et concernent 5-15% des LAM-CN. Dans les populations plus âgées (>70ans), la mutation est retrouvée dans environ 15% des cas (49). La mutation peut être biallélique. Les mutations sont localisées à la partie C-terminale de la protéine et entraînent la synthèse d'une sous-unité α du CBF tronquée qui ne peut plus s'hétérodimériser avec CBF- β . Il en résulte une perte de stabilité de la liaison de CBF- α à l'ADN et des anomalies transcriptionnelles. Des mutations germinales de ce gène sont associées à des cas de thrombopénie familiale et à une prédisposition familiale aux LAM (12).

Surexpression de MECOM (EVII) : La surexpression de *MECOM*, une protéine à doigt de zinc qui stimule la prolifération cellulaire, est retrouvée dans les anomalies impliquant la région 3q26, par exemple la translocation (3;3) ou l'inversion du chromosome 3. La surexpression de *MECOM* est retrouvée dans 5 à 10% des LAM (50). Il a été mis en évidence que la t(3;3) ou l'inv(3) impliquaient un élément régulateur de *GATA2* ; cette anomalie aboutissant à une haploinsuffisance de *GATA2* et une surexpression de *MECOM* (51).

Transduction du signal

FLT3 : Ce gène, situé en 13q12, code pour un récepteur de tyrosine kinase jouant un rôle dans la prolifération et la survie des CSH. On retrouve deux types de mutations : le plus fréquent dénommé *FLT3-ITD* est associé à une duplication en tandem de la partie interne de FLT3 ce qui entraîne une activation constitutive du récepteur. *FLT3-ITD* est retrouvé dans 25-30% des LAM *de novo* de l'adulte (15), 35-40% des LAM-CN (48) et des LAP (52). Le second type de mutation appelé *FLT3-TKD* regroupe l'ensemble des mutations non sens localisées au niveau de la boucle d'activation du domaine tyrosine kinase. Il est retrouvé dans 10-15% des LAM (48).

KIT : Le gène *KIT*, situé en 4q12, code pour un récepteur tyrosine kinase. Plusieurs mutations ont été décrites et sont retrouvées dans environ 5% ou moins des LAM (53) et plus fréquemment dans les LAM du groupe CBF (54):

- Des mutations en position D816 qui touchent la boucle d'activation du domaine kinase et aboutissent à un récepteur constitutionnellement actif sont retrouvées dans 15 à 20% des LAM avec t(8;21) et dans 10 à 15% des LAM avec inv(16).
- Des mutations de l'exon 8 du gène, qui touchent la partie extracellulaire et empêchent l'hétérodimérisation du récepteur, sont retrouvées dans 5-10% des LAM t(8;21) et 15-20% des LAM avec inv(16).

RAS : La famille de gènes *RAS* code pour des protéines qui interviennent dans la transduction du signal de nombreux récepteurs cellulaires (petite protéine à activité GTPase). Elles sont notamment impliquées dans des voies de prolifération, survie, ou différenciation cellulaire. Les mutations rencontrées dans les LAM intéressent les gènes *NRAS* et *KRAS*. *NRAS* est muté dans 10-15% des LAM et *KRAS* dans seulement 5%. Leur fréquence est augmentée dans les LAM du groupe CBF (30-40% pour les LAM avec inv(16) et 10-20% pour les LAM avec t(8;21)) (54).

Modification de la chromatine

KMT2A (MLL) : Le gène *KMT2A*, situé en 11q23, code pour un facteur de transcription très important dans le développement et dans l'hématopoïèse. Elle participe notamment à la régulation des gènes *HOX* impliqués dans la prolifération ou la différenciation cellulaire. Le domaine SET de la protéine est responsable de sa fonction histone-lysine méthyltransférase qui va médier des transformations de la chromatine. Des mutations de type duplication partielle en tandem sont retrouvées dans 5% des LAM et 5-10% des LAM-CN (48, 53, 55, 56).

Réarrangements du gène *KMT2A (MLL)* : De très nombreux réarrangements du gène *KMT2A* ont été décrits à ce jour dans les LAM. Dans la classification OMS (47), seule la translocation t(9;11)(p22;q23) est mentionnée. Elle entraîne la fusion du gène *KMT2A* avec le gène *MLLT3 (AF9)*. Il s'agit de la translocation équilibrée la plus fréquente impliquant *KMT2A* (36).

D'autres partenaires impliqués dans des translocations équilibrées avec *KMT2A* et avec parfois synthèse d'une protéine de fusion ont été décrits dont les principaux sont *MLLT1*, *MLLT10*, *MLLT4*, *ELL* (36).

ASXL1 : Ce gène, localisé en 20q11, code pour la protéine ASXL1 qui joue un rôle dans la méthylation des résidus lysine des histones. On retrouve une mutation d'*ASXL1* dans environ 5% des LAM-CN. Les mutations d'*ASXL1* sont plus fréquentes dans la population âgée (environ 15% des LAM-CN) (57), les syndromes myélodysplasiques ou les LAM secondaires à ceux-ci (58, 59).

EZH2 : *EZH2* est un gène codant pour une enzyme catalytique du complexe PRC2. Elle est impliquée dans la méthylation des histones. Les mutations d'*EZH2* sont rarement retrouvées dans les LAM (<5%) (53). En revanche, sa fréquence est plus importante dans les LAM secondaires (60). Elle est souvent associée à un caryotype complexe ou à des atteintes des chromosomes 5 ou 7.

Modification de l'ADN

IDH : Il a été décrit deux gènes : *IDH1* et *2* situés respectivement en 2q32 et 15q26. Ils codent pour des enzymes intervenant dans la régulation du cycle de Krebs. La mutation R132H a été décrite pour *IDH1* et les mutations R172K et R140Q au niveau d'*IDH2*. Ces mutations sont retrouvées dans les gliomes et les LAM. Le plus souvent monoalléliques elles entraînent l'accumulation intracellulaire de l'onco-métabolite 2-hydroxy-glutarate (2HG). L'augmentation de 2HG est responsable d'une inhibition du gène *TET2* ce qui va entraîner des perturbations de la méthylation de l'ADN. De plus, l'accumulation de 2HG est un marqueur diagnostique et permet le suivi de la maladie résiduelle. Les mutations d'*IDH* sont exclusives des mutations de *TET2* et de *WT1*. A noter que la mutation R140 d'*IDH2* est associée aux mutations de *NPM1*. Elles sont retrouvées dans environ 15-20% des LAM et dans un tiers des LAM-CN (61).

TET2 : Le gène situé en 10q22 est un membre d'une famille de gènes impliqués dans la programmation épigénétique (méthylation de l'ADN) et le développement précoce. Il est muté dans de nombreuses hémopathies. Dans les leucémies, il est retrouvé muté dans 10-25 % des LAM ou LAM-CN (62), (63).

DNMT3A : Ce gène, situé en 2p23, code pour une ADN-méthyltransférase, une enzyme qui catalyse l'addition d'un groupement méthyl à un résidu cytosine des îlots CpG. Elle est décrite dans 15% à 25% dans les LAM (64, 65). Selon les études, une mutation *NPM1* est retrouvée entre 60-80% des patients présentant une mutation *DNMT3A* (64, 66).

Gènes suppresseurs de tumeurs

WT1 : Le gène de la tumeur de Wilms situé en 11p13 code pour un régulateur transcriptionnel jouant un rôle dans la croissance cellulaire et le développement embryonnaire. Les mutations de *WT1* sont associées à une dysfonction de *TET2* et entraînent donc des changements de méthylation de l'ADN qui vont altérer l'expression de certains gènes notamment de gènes suppresseurs de tumeurs. Dans les leucémies, on peut retrouver des mutations de ce gène dans environ 10% des LAM-CN (67) mais surtout une surexpression du gène touchant environ 70% des LAM (68) et permettant le suivi de la MRD.

TP53 : Le gène situé en 17p13 est un gène suppresseur de tumeur qui contrôle les mécanismes de réparation de l'ADN, le cycle cellulaire et l'apoptose. Il est retrouvé muté dans environ 5-15% des LAM et dans 60-70% des LAM à caryotype complexe (69, 70). Cette mutation est plus fréquemment retrouvée chez les patients plus âgés (70) et dans les cas de LAM secondaires (71).

NPM1

Ce gène constitue une catégorie à part entière dans la classification proposée par le *Cancer Genome Atlas Research Network* (15). Les premières mutations du gène codant la nucléophosmine ont été décrites en 2005 (72). Elles sont mutuellement exclusives des réarrangements géniques aboutissant à un transcrite de fusion. Le gène codant pour la nucléophosmine est localisé en 5q35. Il s'agit d'une phosphoprotéine ubiquitaire à expression préférentiellement nucléolaire. Elle régule le transport de particules pré-ribosomales à travers la membrane nucléaire et joue un rôle anti-tumoral en stabilisant la protéine p53 (voie ARF-p53). Elle est également impliquée dans la duplication des centromères (72). Une mutation du gène *NPM1* est retrouvée dans environ 30-35% des LAM *de novo* et plus de 50% dans les LAM-CN (48, 72). Plusieurs types de mutations ont été décrits touchant l'exon 12 du gène. La forme A, secondaire à une duplication TCTG, est la plus fréquente (70-80% des cas) (73). La mutation de *NPM1* entraîne une délocalisation cytoplasmique de la nucléophosmine et une surexpression des gènes *HOX*. Cette mutation est souvent associée à des mutations *FLT3-ITD* (40%), de *DNMT3A* (50% des cas), d'*IDH1/2* et de *RAS* (53).

De nombreuses études soulignent les liens entre ces anomalies moléculaires. Certaines sont fréquemment associées alors que d'autres semblent exclusives. Le schéma ci-dessous (non exhaustif) reprend une partie de ces associations/exclusions (Figure 7).

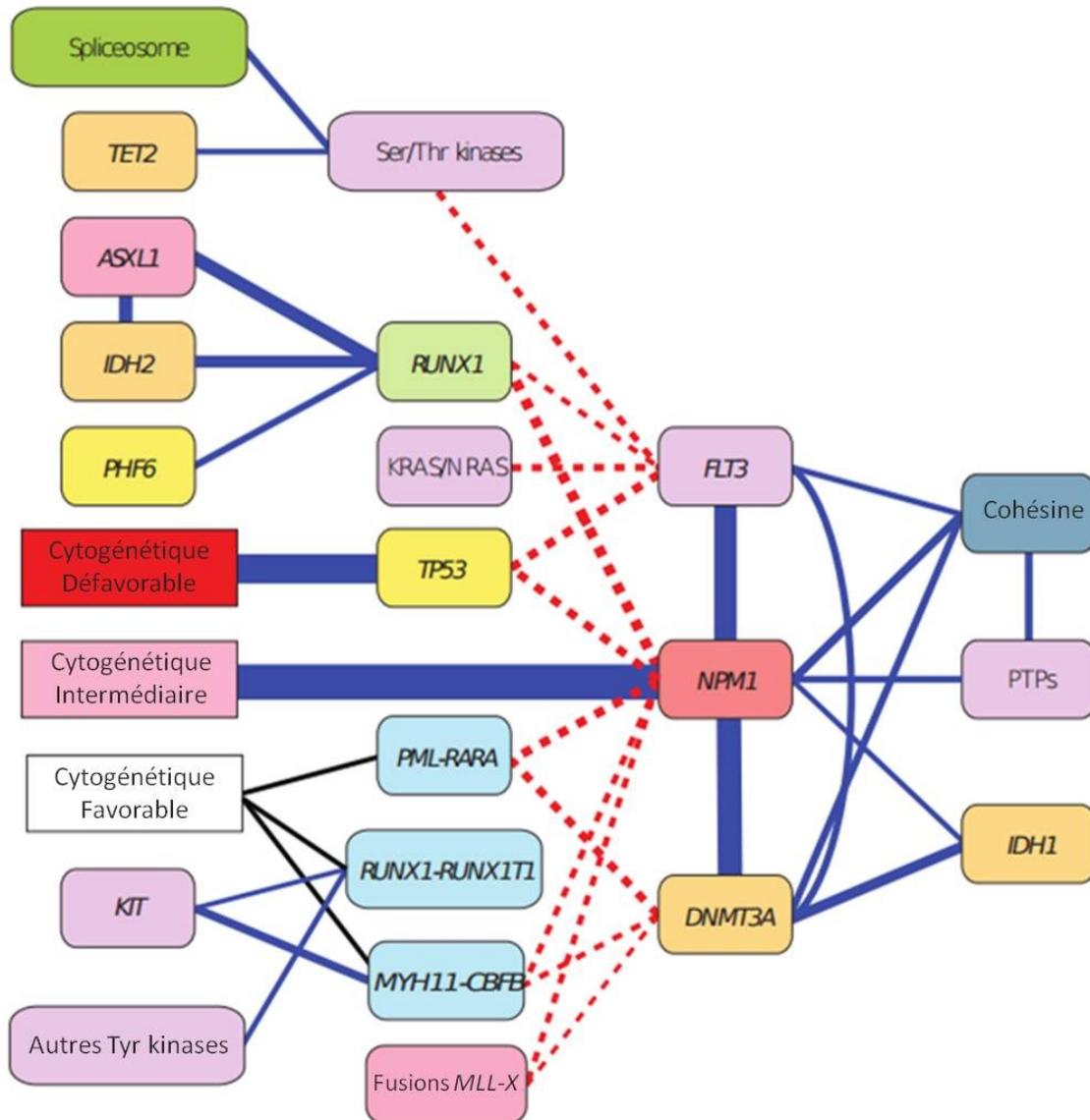


Figure 7 : Associations et exclusions mutuelles des anomalies moléculaires selon le *Cancer Genome Atlas Research Network* (15). Les exclusions mutuelles sont représentées par des pointillés rouges tandis que les associations sont en traits pleins bleus. L'épaisseur des traits est fonction de la force de l'association. En noir sont représentées les anomalies de pronostic favorable.

vi. *Classification actuelle des leucémies aiguës myéloïdes et néoplasies associées selon l'OMS 2016 (tableau 3)*

| LAM avec anomalies génétiques récurrentes | LAM avec t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(q13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> LAP avec <i>PML-RARA</i> * LAM avec t(9;11)(q22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> * LAM avec t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i> * LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i> LAM avec <i>BCR-ABL1</i> (entité provisoire*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|---|----------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------|---------------------|--|------------|----------------------|--|---------------|---------------------|--|--------------|------------------|--|----------|------------------|--|-----------------|-------------------|--|--------------|------------------|--|----------|------------------|--|--|-----------------|
| | LAM avec mutation de <i>NPM1</i> LAM avec mutation biallélique* de <i>CEBPA</i> LAM avec mutation de <i>RUNX1</i> (entité provisoire*) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies | LAM secondaire à un syndrome myélodysplasique | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Dysplasie multilignée LAM avec anomalies cytogénétiques associées aux syndromes myélodysplasiques <table border="1"> <thead> <tr> <th><i>Anomalies non-équilibrées</i></th> <th><i>Anomalies équilibrées</i></th> <th><i>Caryotypes Complexes</i></th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>-7/del(7q)</td> <td>t(11;16)(q23;p13.3)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>-5/del(5q)</td> <td>t(3;21)(q26.2;q22.1)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>1(17q)/t(17q)</td> <td>t(1;3)(p36.3;q21.1)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>-13/del(13q)</td> <td>t(2;11)(p21;q23)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>del(11q)</td> <td>t(5;12)(q33;p12)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>del(12p)/t(12p)</td> <td>t(5;7)(q33;q11.2)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>idic(X)(q13)</td> <td>t(5;17)(q33;p13)</td> <td></td> </tr> <tr> <td>del(9q)*</td> <td>t(5;10)(q33;q21)</td> <td></td> </tr> <tr> <td></td> <td>t(3;5)(q25;q34)</td> <td></td> </tr> </tbody> </table> | <i>Anomalies non-équilibrées</i> | <i>Anomalies équilibrées</i> | <i>Caryotypes Complexes</i> | -7/del(7q) | t(11;16)(q23;p13.3) | | -5/del(5q) | t(3;21)(q26.2;q22.1) | | 1(17q)/t(17q) | t(1;3)(p36.3;q21.1) | | -13/del(13q) | t(2;11)(p21;q23) | | del(11q) | t(5;12)(q33;p12) | | del(12p)/t(12p) | t(5;7)(q33;q11.2) | | idic(X)(q13) | t(5;17)(q33;p13) | | del(9q)* | t(5;10)(q33;q21) | | | t(3;5)(q25;q34) |
| <i>Anomalies non-équilibrées</i> | <i>Anomalies équilibrées</i> | <i>Caryotypes Complexes</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -7/del(7q) | t(11;16)(q23;p13.3) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -5/del(5q) | t(3;21)(q26.2;q22.1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 1(17q)/t(17q) | t(1;3)(p36.3;q21.1) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| -13/del(13q) | t(2;11)(p21;q23) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| del(11q) | t(5;12)(q33;p12) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| del(12p)/t(12p) | t(5;7)(q33;q11.2) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| idic(X)(q13) | t(5;17)(q33;p13) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| del(9q)* | t(5;10)(q33;q21) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | t(3;5)(q25;q34) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Néoplasies myéloïdes secondaires aux thérapies | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| LAM, sans spécificité | LAM avec avec différenciation minimale LAM sans maturation LAM avec maturation Leucémie aiguë myélomonocytaire Leucémie aiguë monoblastique et monocytaire Leucémie érythroïde pure* Leucémie aiguë mégacaryoblastique Leucémie aiguë à basophile Panmyélose aiguë avec myélofibrose | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Sarcome Myéloïde | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Proliférations myéloïdes associées au Syndrome de Down | Myélopoïèse anormale transitoire Leucémie Aiguë myéloïde associée au syndrome de Down | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leucémie Aiguë à Cellules Dendritiques Plasmocytoides° | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Leucémies Aiguës avec ambiguïté de lignée | Leucémies aiguës indifférenciées Leucémie aiguë biphénotypique avec t(9;22)(q34;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> Leucémie aiguë biphénotypique avec t(v;11q23); réarrangement de <i>KMT2A</i> * Leucémie aiguë biphénotypique, B/myéloïde, sans spécificité Leucémie aiguë biphénotypique, T/myéloïde, sans spécificité Leucémie aiguë biphénotypique, sans spécificité - types rares° Leucémie aiguë/Lymphome Lymphoblastique à cellules NK* | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale* | Néoplasies myéloïdes sans antécédents de dysfonction d'organe ou de désordre hématologique LAM avec mutation germinale de <i>CEBPA</i> Néoplasie myéloïde avec mutation germinale de <i>DDX41</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Néoplasies myéloïdes avec antécédents de désordre plaquettaire Néoplasie myéloïde avec mutation germinale de <i>RUNX1</i> Néoplasie myéloïde avec mutation germinale de <i>ANKRD26</i> Néoplasie myéloïde avec mutation germinale de <i>ETV6</i> | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| | Néoplasies myéloïdes avec autre dysfonction d'organe Néoplasie myéloïde avec mutation germinale de <i>GATA2</i> Néoplasie myéloïde associée aux syndromes d'insuffisance médullaire héréditaires Néoplasie myéloïde associée aux pathologies héréditaires des télomères Leucémie myélomonocytaire juvénile associée à la neurofibromatose, au syndrome de Noonan ou syndromes associés Néoplasie myéloïde associée au syndrome de Down | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

Tableau 3 : Classification des leucémies aiguës myéloïdes, des néoplasies apparentées, des leucémies aiguës avec ambiguïté de lignée et des néoplasies myéloïdes avec prédisposition germinale selon l'OMS 2008 (44), révisée en 2016 (47). * : modification dans la classification 2016, ° : disparition de la classification 2016.

5. Facteurs pronostiques

Les facteurs pronostiques des LAM sont classiquement divisés en deux groupes : facteurs liés aux patients et facteurs liés à la maladie.

i. Facteurs liés aux patients

Âge au diagnostic

Chez les personnes âgées de plus de 60 ans (définition consensuelle dans les différentes études), le pronostic des leucémies aiguës est plus péjoratif que chez les patients plus jeunes. Dans cette tranche d'âge, la survie sans maladie (DFS : *Disease Free Survival*) et la survie globale (OS : *Overall Survival*) sont plus courtes. Ceci s'explique entre autres par un taux moindre de rémission complète (RC) (74, 75), une mortalité iatrogène plus importante (76), des comorbidités plus importantes (77) et un état général plus souvent altéré (77). A ceci s'ajoutent des profils génétiques plus défavorables (notamment dans les leucémies *de novo*) (74, 78, 79), un plus grand taux de leucémies aiguës secondaires et un taux plus important de phénotype *multi drug resistance* (19).

Etat général et comorbidités

L'appréciation de l'état général du patient par un système d'évaluation simple comme le *performans status* (PS) impacte directement la survie des patients (29, 30) et l'obtention d'une RC (80). Dans de nombreuses études (74-76), une mortalité précoce importante est retrouvée chez les patients présentant un état général altéré. Ce risque accru de mortalité est retrouvé indépendamment des comorbidités et quel que soit l'âge du patient (80) bien qu'il soit plus important quand le sujet est âgé (74).

L'analyse des comorbidités dans le registre suédois des maladies hématologiques souligne que l'insuffisance rénale, les maladies vasculaires cérébrales, les maladies rhumatologiques, les maladies hépatiques et psychiatriques sont à l'origine d'une surmortalité spécifique et non spécifique aux LAM (75). Parmi celles-ci l'existence d'une insuffisance rénale est le facteur pronostique le plus important. L'impact des comorbidités est moins flagrant après ajustement sur les autres facteurs confondants tels que l'âge, de sexe, le taux de leucocytes, la présence de thérapies cytotoxiques, de maladies secondaires ou du caryotype (80). L'équipe d'Oran *et al.* a récemment confirmé que les comorbidités et l'âge des patients influencent le taux de décès précoces (77).

Plusieurs scores prenant en compte les différentes comorbidités des patients ont été proposés comme le score de Charlson (81) et de Sorrow (82). Des études ont montré une bonne concordance entre ces scores, la survie et la mortalité précoces (83).

ii. Facteurs liés à la maladie

Localisations extramédullaires

Les localisations extramédullaires sont classiquement associées à un pronostic plus péjoratif (84, 85) mais ces résultats ne sont pas retrouvés dans toutes les séries (86). Les localisations extramédullaires sont plus fréquemment associées au LAM du groupe CBF, et plus particulièrement aux LAM avec t(8;21) (87).

Hyperleucocytose

La définition de l'hyperleucocytose varie selon les études et selon les types de LAM. L'hyperleucocytose est généralement définie par une leucocytose supérieure à 100 Giga par litre pour les LAM non promyélocyaires (19). Dans certaines études, c'est un facteur de risque de mortalité indépendant (28, 30, 88). Elle est associée à une augmentation de la mortalité précoce en lien avec ses complications biologiques (CIVD, syndrome de lyse) ou cliniques (leucostase) (89).

Un taux élevé de LDH traduit un volume tumoral important et est donc également un facteur de mauvais pronostic.

Caractère secondaire

L'OMS distingue deux entités dans les LAM secondaires : les LAM apparaissant dans l'évolution d'une pathologie hématologique (syndrome myélodysplasique ou syndrome myéloprolifératif) (s-LAM) et les LAM secondaires à l'utilisation de traitements cytotoxiques (t-LAM) ou à la radiothérapie. Le terme « LAM secondaire » est donc imprécis et source de confusion car il renvoie à plusieurs entités distinctes (90).

Les t-LAM peuvent être secondaires à l'utilisation d'agents alkylants ou à une radiothérapie. Elles apparaissent alors après une période de latence de 5-7 ans vis à vis du début du traitement. Elles sont associées à une fréquence plus importante de caryotypes complexes, de monosomie 5 ou 7 (91, 92).

D'autre part, les t-LAM peuvent survenir secondairement à l'utilisation d'inhibiteurs des topoisomérases II. Dans ce cas, la période de latence vis-à-vis du début du traitement est plus courte (1-3 ans). Elles sont associées à des anomalies génétiques impliquant les loci 11q23 et 21q22 ou bien à des translocations équilibrées (91).

Les s-LAM ont une fréquence plus importante chez le sujet âgé. Elles sont plus souvent associées à un risque cytogénétique intermédiaire ou défavorable. De ce fait, elles présentent un taux de RC plus faible que les LAM *de novo* et un pronostic plus péjoratif (93).

Cytogénétique

C'est actuellement le facteur pronostique le plus utilisé dans la pratique courante. Il doit impérativement être pris en compte dans la démarche décisionnelle de toutes les LAM. En fonction des anomalies cytogénétiques mises en évidence au diagnostic, on peut définir des sous-groupes pronostiques prédictifs de la qualité de la réponse initiale au traitement, de la survie sans événement (EFS, *Event Free Survival*) ou de l'OS. Différentes classifications pronostiques ont ainsi vu le jour dans les différents grands groupes coopérateurs (MRC, SWOG/ECOG ou CALGB) et pour des patients traités de manière intensive. Bien qu'ils existent certaines différences entre ces classifications, elles ont le mérite de définir trois grands groupes pronostiques indépendants : favorable, intermédiaire ou défavorable, à partir des seuls résultats cytogénétiques (Tableau 4). Nous détaillerons, dans la suite de cette partie, la constitution de ces trois grands groupes.

Groupe favorable

- LAM avec t(15;17) ou LAP

Dans les LAM avec t(15;17), ou LAP, Grimwade *et al.* rapporte un taux de rémission complète supérieur à 90%, une OS de 81% à 10 ans et une incidence cumulée de rechute de 13% à 10 ans (30). Ces très bons résultats sont à mettre en rapport avec l'utilisation de l'acide tout-trans rétinoïque dans la pratique thérapeutique qui a révolutionné le pronostic de ces leucémies (94-96). Même en cas d'association à d'autres anomalies, la t(15;17) conserve un impact favorable sur le pronostic (30, 41, 97). A noter qu'aucune différence pronostique entre les LAP secondaires et *de novo* n'a été retrouvée (98).

- LAM du groupe CBF

Elles regroupent les LAM avec t(8;21) et les LAM avec inv(16). Grimwade *et al.* (30) rapporte un taux de RC supérieur à 90% après chimiothérapie intensive chez des patients

jeunes ainsi que des taux de survie à 61% pour les t(8;21) et 55 % en cas d'inv(16) à 10 ans. Le risque cumulé de rechute à 10 ans est de 27% pour les t(8;21) et 46 % en cas d'inv(16). Des études plus anciennes des groupes coopérateurs du SWOG/ECOG ou du CALGB retrouvent un taux de rémission légèrement inférieur (85% environ) et un taux d'incidence cumulé de rechute plus élevé autour de 50% à 5 ans (28, 29).

La présence d'anomalies cytogénétiques additionnelles en cas de LAM avec t(8;21) ou inv(16) ne semble pas avoir d'impact pronostique (30).

Groupe intermédiaire

Il s'agit d'un groupe d'exclusion. Il est de ce fait très hétérogène et nous ne détaillerons pas chacune des anomalies qui le constituent. Il comprend notamment les LAM-CN. Chez ces patients, le taux de RC est de 90% et la survie à 10 ans de 38% (30). L'incidence cumulée de rechute est de l'ordre de 50% selon l'étude de Grimwade (30). Des chiffres moins favorables ont été retrouvés dans les études princeps du SWOG/ECOC ou du CALGB dans lesquelles une RC est obtenue chez 68-76% des patients avec une survie à 5 ans entre 24 et 38% (28, 29).

Groupe défavorable

Même si l'on retrouve quelques différences entre les groupes coopérateurs, certaines anomalies cytogénétiques sont clairement associées à ce sous groupe pronostique dont l'OS à 5 ans est de l'ordre de 5-10% (28, 29). Y sont notamment incluses : les anomalies du 3 (en particulier l'inv(3) ou la t(3;3)), les délétions des chromosomes 5 ou 7, les caryotypes complexes et monosomaux.

- Les anomalies des chromosomes 5 ou 7 sont pour la plupart des monosomies ou des délétions du bras long. Leur pronostic est parmi les plus péjoratifs avec les taux d'obtention de RC les plus bas, autour de 40% dans certaines études (28, 29) et légèrement supérieurs, autour de 50%, dans d'autres (30). La survie de ces patients à 10 ans est de ce fait très faible, autour de 10%. De plus elles sont fréquemment associées à un caryotype complexe.
- La t(3;3) est associée à des taux de RC très faibles en général inférieurs à 50% et à une survie à 10 ans inférieure à 10%.
- L'existence d'un caryotype complexe défini par l'association de 3 ou 4 anomalies cytogénétiques, qui, lorsqu'il n'est pas associé à d'autres critères cytogénétiques de

bon pronostic, constitue également un facteur de mauvais pronostic en termes de RC et d'OS.

- Les caryotypes monosomaux sont définis par la présence de deux monosomies ou d'une monosomie associée à une autre anomalie cytogénétique (en dehors d'une translocation récurrente) (99). Ils comptent pour environ 45 % des patients classés dans le groupe défavorable dans l'étude de Grimwade *et al.*(30).

| | MRC | CALGB | ECOG/SWOG |
|---------------|---|---|---|
| Favorable | t(15;17)(q22;q21) t(8;21)(q22;q22) quelles que soient les anomalies associées inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(q13.1;q22) | t(8;21)(q22;q22) inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(q13.1;q22) del(9q) | t(15;17)(q22;q21) avec ou sans anomalies associées inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(q13.1;q22) ou del(16q) t(8;21)(q22;q22) sans del(9q) ou caryotype complexe associés |
| Intermédiaire | caryotype normal entités non classées dans les catégories favorables ou défavorables | caryotype normal -Y del(5q) del(7q) t(9;11)(q22;q23) +11 del(11q) anomalie du 12p +13 del(20q) +21 | caryotype normal +8 +6 -Y del(12p) |
| Défavorable | caryotype complexe (≥ 4 anomalies) anomalie en 3q [à l'exclusion des t(3;5)] inv(3)(q21q26) ou t(3;3)(q21;q26) add(5q)/del(5q)/-5 add(7q)/del(7q)/-7 (à l'exclusion des associations avec caryotype favorable) t(6;11)(q27;q23) t(10;11)(p11~13;q23) t(11q23) [à l'exclusion des t(9;11) et des t(11;19)] t(9;22)(q34,q11) -17/anomalie en 17p | caryotype complexe (≥ 3 anomalies) inv(3)(q21q26) ou t(3;3)(q21;q26) t(6;9) t(6;11)(q27;q23) -7 +8 (seul) +8 (associé à une autre anomalie*) t(11;19)(q23;p13) | caryotype complexe (≥ 3 anomalies) del(5q)/-5 del(7q)/-7 anomalies du 3q, 9q, 11q, 20q, 21q ou 17p t(6;9) t(9;22) |
| non connu | | | autres anomalies |

Tableau 4 : Groupes pronostiques cytogénétiques des groupes coopérateurs MRC (30), CALGB (28) et ECOG/SWOG (29).

Biologie moléculaire

Le nombre de mutations répertoriées au sein des LAM ne cesse de croître ces dernières années suite à l'apparition et la mise à disposition d'outils de plus en plus performants au sein des laboratoires.

En 2008, la classification de l'OMS introduisait certaines d'entre elles (*NPM1*, *CEBPA*) à titre provisoire parmi les LAM avec anomalie génétique récurrente. En 2010, la classification pronostique de l'ELN intégrait elle aussi les mutations de *CEBPA*, *FLT3* ou *NPM1* et distinguait 4 groupes pronostiques (Tableau 5).

| Groupes Pronostiques | Sous-types |
|-------------------------|---|
| Favorable | t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(q13.1;q22) ; <i>CBFβ-MYH11</i> <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) mutation biallélique de <i>CEBPA</i> (caryotype normal)* |
| Intermédiaire-I | <i>NPM1</i> muté avec <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) <i>NPM1</i> sauvage avec <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) <i>NPM1</i> sauvage sans <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) |
| Intermédiaire-II | LAM avec t(9;11)(q22;q23) ; <i>MLLT3-KMT2A</i> * anomalies cytogénétiques non classées ailleurs |
| Défavorable | LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; <i>GATA2, MECOM</i> * LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; <i>DEK-NUP214</i> LAM avec t(v;11)(v;q23) ; réarrangement de <i>KMT2A</i> * -5 ou del(5q) ; -7 ou del(7q) ; caryotype complexe |

Tableau 5 : Groupes pronostiques selon ELN (19), * secondairement modifiés, d'après (100).

Cette classification pronostique a été évaluée dans plusieurs cohortes de grande taille (78, 101, 102). Chez les patients de moins de 60 ans, elle remplit correctement son rôle en distinguant quatre groupes de pronostics distincts avec cependant, dans deux de ces cohortes, un meilleur pronostic dans le groupe intermédiaire 2 par rapport au groupe intermédiaire 1 (78, 102). Les survies à 3 ans dans l'étude de Mrozek *et al.* étaient respectivement pour chacun des sous-groupes de 66 mois, 28 mois, 45 mois et 12 mois (78). Dans la classe d'âge de plus de 60 ans, le groupe de pronostic favorable présente de meilleurs résultats en terme d'OS ou de survie sans rechute (RFS, *Relapse Free Survival*) mais les différences entre les groupes intermédiaires 1 et 2 (78, 101, 102) et parfois même entre les groupes intermédiaires et de mauvais pronostiques ne sont pas retrouvées (101).

Depuis la classification de l'ELN, des données sur l'impact pronostique de nouvelles mutations ont émergé aboutissant à de nouvelles définitions des groupes pronostiques. Ainsi, le groupe de Alpermann *et al.*(101) a par exemple proposé une redéfinition des groupes pronostiques avec la recherche des mutations suivantes : *NPM1*, *CEBPA* (biallélique), *MLL-PTD* (*KMT2A-PTD*), *RUNX1*, ou encore *FLT3-ITD* avec mesure du ratio muté / non muté (101). L'équipe de Patel *et al.* a elle aussi proposé une nouvelle définition des groupes de risque en prenant en compte les mutations de *KMT2A* (*MLL*), *FLT3*, *IDH*, *ASXL1*, *PHF6*, *TET2* (53).

Nous avons choisi d'exposer les données pronostiques actuelles des principaux gènes sous forme de tableau (tableau 6).

| Gène muté | Locus | Fréquence | | Caryotype | Impact Pronostique |
|----------------------------|----------------------------|----------------|--|----------------------|--|
| | | LAM | LAM-CN | | |
| <i>NPM1</i> | 5q35 | ~30-35% | ~45-60% | CN | controversé sur RC, RFS, EFS (103-105) pas d'impact sur OS (103, 105) <i>NPM1m</i> sans <i>FLT3-ITD</i> : RC, RFS, OS (48, 103, 105) > <i>NPM1-FLT3-ITD</i> et <i>FLT3-ITD</i> seul |
| <i>FLT3-ITD</i> | 13q12 | ~25-30% | ~35-40% | CN varié | péjoratif sur DFS, OS (106, 107) patients <60ans : péjoratif sur OS (53) |
| <i>CEBPA</i> | 19q13.1 | ~5-15% | ~10% | CN varié | biallélique: RC, RFS, OS (108, 109) > WT biallélique : DFS, OS (109, 110) > WT et mutation monoallélique (111) |
| <i>RUNX1</i> | 8q22 | ~5-15% | ~5-15% | varié | péjoratif sur RC, EFS, DFS, OS (49, 112, 113) |
| <i>KMT2A-PTD</i> | 11q23 | ~5% | ~5-10% | CN varié | controversé (55, 114-116) Pas d'impact sur RC, DFS, OS(114, 115) péjoratif sur OS (53) |
| <i>WT1</i> | 11p13 | ~5-15% | ~10% | CN | péjoratif sur RC, DFS, OS (67, 117, 118) |
| <i>TET2</i> | 4q24 | ~10-25% | ~10-25% | CN varié | pas d'impact sur RC, DFS, OS (62, 63, 119, 120) ELN Favorable : péjoratif sur CR, DFS, OS (63, 120) pas d'impact sur RC, DFS, OS (62) |
| <i>ASXL1</i> | 20q11 | ~5-15% | ~5% | CN varié | péjoratif sur RC, RFS, OS (57, 59) Péjoratif sur RC, RFS, OS (53, 121, 122) |
| <i>DNMT3A</i> | 2p23 | ~15-25% | ~30-40% | CN varié | controversé (123-125) péjoratif sur EFS, RFS, OS si <i>NPM1</i> muté, <i>CEBPA</i> biallelique, ELN Int1 (125, 126) (<60 ans) Pas d'impact sur RC, RFS, EFS, OS (126) (<60 ans) |
| <i>IDH1</i> <i>IDH2</i> | 2q33 15q26 | ~15-20% | IDH1 R132 10% IDH2 : - R140 8-10% - R172 5% | CN varié | IDH1 R132 : pas d'impact sur RC, DFS, OS (127, 128) IDH2 R172 : péjoratif sur RC, RR, OS (127, 128) IDH2 R140 : pas d'impact (128) IDH R140q : bon sur OS (53)(<60 ans) IDH1 ou IDH2 muté : pas d'impact (129) (<60 ans) |
| <i>TP53</i> | 17p13 | ~5-15% | | complexe | péjoratif sur RFS, OS (130, 131) |
| <i>KIT</i> | 4q12 | ~<5% | | t(8;21) inv(16) | péjoratif sur RFS,EFS, OS (54, 132, 133) D816, exon 17Pas d'impact sur OS, RFS, PFS (54, 133) exon 8 : péjoratif ?(134) |
| <i>RAS</i> | NRAS 1p13.2 KRAS12p12.1 | ~10-15% ~5% | | Inv (16) t(8 ;21) | pas d'impact (54) |

Tableau 6 : Fréquence et impact pronostique des mutations dans les LAM. *LAM* : leucémie aiguë myéloïde, *CN* : caryotype normal, *RC* : réponse complète, *EFS* : Survie sans événement, *DFS* : survie sans maladie, *RFS* : survie sans rechute, *OS* ; survie globale, *RR* : risque de rechute.

Réponse au traitement d'induction

L'obtention d'une RC est un facteur pronostique majeur avec un impact direct en termes d'OS pour le patient. Il a ainsi été montré que la survie à 5 ans des patients en rémission partielle ou résistants au traitement (respectivement de 44 et de 22%) était inférieure à celle des patients en RC (53%) (135).

6. Traitement

Depuis plus de trente ans, le traitement à visée curative des LAM repose sur l'association de chimiothérapies cytotoxiques administrées à haute dose et de façon successive. Ce schéma thérapeutique reste actuellement le standard malgré une meilleure compréhension des mécanismes de la leucémogénèse qui a permis le développement de nouvelles thérapies ciblées. Bien que la plupart des études ciblent le sujet jeune, il existe de plus en plus de données sur le traitement des patients âgés.

Au niveau thérapeutique, les LAP constituent une exception au schéma classique suscitée. En effet dans certaines conditions, l'utilisation d'un traitement associant le trioxyde d'arsenic à l'acide tout trans-rétinoïque sans chimiothérapie lourde a montré son efficacité (136). Nous n'aborderons pas ce cas particulier ici.

i. Thérapies d'induction

Le traitement d'induction est basé sur l'association de deux drogues cytotoxiques selon un schéma communément nommé « 3+7 » en référence à son mode d'administration. Il associe une anthracycline (inhibiteur de topoisomérase II) : la daunorubicine, administrée par voie intraveineuse pendant 3 jours à un antimétabolite, l'aracytine, délivré en continu à faible dose sur une période de sept jours (137, 138). Cette thérapie induit un taux de RC actuellement proche de 80%. Elle doit être débutée dans les cinq jours suivants le diagnostic (139). La sortie d'aplasie est en règle générale observée en 28 jours. Si ce schéma thérapeutique est maintenant bien ancré dans les pratiques, la nature des drogues et les doses employées font encore l'objet de nombreuses études cliniques actuelles.

Anthracyclines

Outre la daunorubicine, d'autres anthracyclines ont été utilisées dans des études cliniques randomisées notamment l'idarubicine, un analogue de la daunorubicine, et la mitoxantrone. Dans les années 1990, les études comparant l'utilisation de l'idarubicine à 12 mg/m² et de la daunorubicine 45 mg/m² ont abouti à des résultats discordants : une amélioration significative du taux de survie dans le groupe idarubicine par rapport au groupe daunorubicine dans certaines études (140) non retrouvée dans d'autres (141). Des études plus récentes (142) n'ont pas non plus permis de retrouver une différence significative de survie entre l'idarubicine à la dose de 12mg/m² (3 ou 4 jours) par rapport à la daunorubicine à la dose de 80 mg/m².

La dose utilisée d'anthracycline est aussi matière à débat dans la littérature. Plusieurs études ont montré un avantage de survie avec des doses importantes de daunorubicine allant jusqu'à 90 mg/m² par rapport au classique 45mg/m² avec des profils de tolérance similaires, chez les sujets jeunes (143) et chez les sujets plus âgés (144). Toutefois ce résultat n'était pas retrouvé dans l'étude du groupe coopérateur MRC où l'utilisation d'une dose de 90mg/m² de daunorubicine est associée à une augmentation du taux de décès précoces sans bénéfice sur la survie à long terme et le taux de réponse thérapeutique par rapport à une dose de 60 mg/m² (145). De ce fait, les recommandations de l'ELN préconisent encore l'utilisation de doses de daunorubicine comprises entre 45 à 60 mg/m² (19).

Des études sont actuellement en cours, notamment dans les centres français, pour continuer à préciser s'il existe un avantage à utiliser de l'idarubicine ou de la daunorubicine haute dose dans le traitement des LAM.

Aracytine

Différentes modalités d'administration de l'aracytine lors de l'induction ont été testées. L'administration de l'aracytine à forte dose (2000-3000 mg/m²/12h) a notamment été comparée à l'administration intraveineuse continue à faible dose (100-200 mg/m²) dans plusieurs études (146). Les résultats de ces études sont discordants en ce qui concerne le taux de mortalité précoce et de réponse au traitement. En revanche, à l'exception d'une étude italienne dans la tranche d'âge inférieure à 45 ans (147), il n'est pas retrouvé de différence significative en termes de survie, ce qui ne permet pas à ce jour de préconiser formellement l'une ou l'autre de ces méthodes. A ce jour, l'ELN recommande l'administration continue d'une dose d'aracytine de 100 à 200mg/m² pour une durée de 7 jours (19).

Traitements associés

L'utilisation du gemtuzumab ozogamicin à la dose de 3-6 mg/m² en association avec la chimiothérapie haute dose a aussi fait l'objet de plusieurs études. Il s'agit d'une immuno-chimiothérapie qui cible le CD33, un récepteur transmembranaire présent à la surface des cellules de lignée myéloïde. Les résultats sont contradictoires avec, dans certains de ces essais randomisés une amélioration de la survie (148, 149). Cependant son utilisation est associée à une mortalité précoce accrue et à des toxicités sévères (hépatique, thrombopénies profondes) si bien que son utilisation n'est pas recommandée de manière systématique.

L'utilisation du sorafénib (un inhibiteur de plusieurs récepteurs tyrosine kinase) semble intéressante en association avec la chimiothérapie dans les LAM du sujet jeune (< 45 ans)

avec une amélioration de l'EFS et de la RFS. Dans les LAM avec *FLT3-ITD*, l'utilisation du sorafenib est associée à une tendance à l'amélioration de l'OS sans différence en termes d'EFS (150). Un autre inhibiteur de tyrosine kinase, le midostaurin, a quant à lui récemment montré une amélioration de l'EFS et de l'OS dans les LAM avec *FLT3-ITD* (151).

ii. Thérapies de consolidation

L'objectif des thérapies de consolidation est de maintenir la rémission dans le temps. La nature du traitement de consolidation est fonction des facteurs pronostiques propres aux patients et propres à la maladie en particulier des résultats des analyses biologiques, moléculaires et cytogénétiques. Il repose sur l'utilisation de l'aracytine et/ou de l'allogreffe de moelle osseuse.

Aracytine

Dans un schéma thérapeutique reposant sur l'aracytine délivrée en 4 cycles, l'utilisation de fortes doses (3g/m²) a montré un bénéfice en terme de survie par rapport à l'utilisation de doses faibles (100mg/m²) ou intermédiaires (400mg/m²) (152). Dans une autre étude, on retrouvait un bénéfice sur la durée de rémission notamment pour les LAM du groupe CBF (153). L'étude AML201 du groupe coopérateur japonais a confirmé le bénéfice observé dans l'utilisation de fortes doses d'aracytine pour les LAM du groupe CBF (154).

Si le bénéfice de l'utilisation de fortes doses d'aracytine par rapport à des doses faibles est assez consensuel il subsiste des interrogations quand à son avantage par rapport à des doses intermédiaires administrées en bolus (155).

Actuellement le schéma thérapeutique des consolidations n'est donc pas encore bien défini concernant la dose et la durée d'administration. Il semble cependant exister un avantage à l'utilisation de forte ou de dose intermédiaire de cette drogue en consolidation. Le nombre de consolidation est aussi peu consensuel (156).

Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques est précédée d'un traitement à base de chimiothérapies appelé conditionnement. Elle est associée à un risque moindre de rechute après RC. Le principe d'une telle procédure repose sur l'effet du traitement de conditionnement auquel s'ajoute l'effet « greffon contre leucémie » secondaire à la greffe de cellules souches hématopoïétiques. C'est une procédure très lourde, il faut donc

systématiquement peser la balance bénéfice/risque d'une telle proposition thérapeutique et en particulier chez le sujet âgé. De même l'intensité du traitement de conditionnement dépendra beaucoup de l'âge et de l'état général du patient. Chez les sujets plus jeunes en bon état général, un conditionnement myéloablatif est préféré car il est associé à un moindre taux de rechute.

Dans le groupe dit à cytogénétique favorable selon l'ELN, l'allogreffe n'a pas montré de bénéfices (48, 157, 158) en première ligne thérapeutique. Elle est donc actuellement recommandée chez les patients de pronostic intermédiaire ou défavorable .

Toutefois, ces données mériteraient d'être validées à la lumière des nouvelles données pronostiques issues des analyses moléculaires, de l'évolutivité de la maladie (mesure de la maladie résiduelle), des nouveaux traitements de conditionnement dits « atténués » parce qu'ils présentent une toxicité moins importante et du plus grand choix de donneurs (génomique, phénoïdique, haploïdique)(158).

iii. Traitement de la rechute ou des patients réfractaires

Le traitement des patients en rechute n'est pas consensuel à ce jour. Il repose sur des traitements de rattrapage afin d'induire une RC autant que possible dans l'optique ^de la réalisation d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (159-161). Le pronostic à la rechute est dominé par la durée de la rémission obtenue à la suite du traitement de première ligne, la cytogénétique initiale du patient, son âge et la réalisation antérieure ou non d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (162). Les thérapies utilisées en rattrapage sont de plusieurs types : des chimiothérapies intensives, des thérapies ciblées (sorafenib, inhibiteur d'IDH) et des traitements déméthylants (azacytidine) notamment dans le cadre d'essais thérapeutiques (163).

iv. Particularités de la prise en charge des sujets âgés

L'âge est un facteur de mauvais pronostic dans les leucémies aiguës myéloïdes. Au-delà de 60 ans, le traitement des patients doit particulièrement prendre en compte les comorbidités, l'état général du patient et le groupe pronostique de la leucémie. Dans la plupart des études, les patients les plus altérés, et donc souvent les plus âgés, sont exclus. Il existe peu de données sur lesquelles les cliniciens peuvent s'appuyer pour adapter le traitement. Actuellement, toutes

les modalités de prise en charge (chimiothérapie intensive, allogreffe, traitement suspensif par chimiothérapie faible dose ou prise en charge symptomatique) sont envisageables et peuvent se discuter en fonction de l'appréciation des facteurs liés au patient et à sa maladie par le clinicien.

Un âge supérieur à 70 ans et un groupe cytogénétique défavorable sont les facteurs pronostiques essentiels chez les sujets plus âgés (survie à 3 ans de 3% chez les patients présentant ces deux facteurs malgré un traitement intensif contre 26 % chez les patients de 60 à 70 ans avec une cytogénétique non défavorable)(164). Une autre étude, basée sur les deux essais de l'ALFA réalisée chez les sujets âgés traités (de 50 à 70 ans ; 65 ans et plus) par une induction classique par daunorubicine ou idarubicine, retrouvait une survie à 5 ans de près de 50% pour les LAM de cytogénétique favorable, 36% chez les patients présentant un caryotype normal et de seulement 9% en cas de cytogénétique défavorable (165).

Pour les patients dont l'état général est conservé avec peu ou pas de comorbidités, un traitement d'induction standard sur la base du 3+7 comportant des chimiothérapies intensives doit être entrepris (166). Chez les patients dits « jeunes vieux » (60 à 65 ans), Lowenberg *et al.* ont même montré que l'augmentation de la dose de daunorubicine de 45 à 90mg/m² avait un impact sur la survie en plus de l'augmentation du taux de RC tout en conservant un profil de toxicité acceptable. A noter que bien que non significatif, les résultats de l'ALFA 9803 et 9801 retrouvaient une tendance à l'amélioration de l'OS avec l'utilisation de l'idarubicine plutôt que de daunorubicine chez les sujets âgés (165).

Concernant le traitement de consolidation, il a été observé que les fortes doses d'aracytine sont associées à un profil de toxicité défavorable chez les patients âgés : 1/3 des patients âgés de plus de 60 ans seulement arrivent à complétion du programme thérapeutique sans aucun bénéfice retrouvé sur la survie (152). Une des alternatives proposée est l'administration d'aracytine sous cutanée à la dose de 60 mg/m²/12 h associé aux anthracyclines (daunorubicine à la dose de 45 mg/m²) dans un schéma 1+5 (167) ou la réalisation de cures d'intensité intermédiaire (1,5g/m² pendant 5 jours) d'aracytine seule. Récemment, une étude de phase II a montré la possibilité de réaliser des cures d'azacytidine seule en post-rémission (168). Enfin, avec l'apparition des conditionnements atténués, l'allogreffe reste une possibilité dans les populations âgés, en particulier pour les « jeunes vieux » en bon état général (169, 170).

Pour les patients pour lesquels un traitement intensif n'est pas envisageable du fait d'un mauvais état général et/ou de lourdes comorbidités, il existe plusieurs possibilités de prise en charge :

- l'aracytine à faible dose, par voie sous-cutanée (171),
- les agents déméthylants (172-176),
- les soins de confort.

v. Soins de support

L'ensemble des soins de support (traitements anti-infectieux et prophylaxies, support transfusionnel) est essentiel en accompagnement des traitements de chimiothérapies. Ils sont à l'origine d'une diminution nette de la morbi/mortalité précoce des patients.

II. Maladie Résiduelle

1. Concept et Définition

La définition actuelle de la RC se base sur des critères cytologiques. Et notamment sur le compte cellulaire. Malgré les avancées sur le plan moléculaire, la définition de la RC est restée la même au cours du temps. Elle est définie, selon les critères ELN (19), par :

- la présence de moins de 5% de blastes médullaires,
- l'absence de blastes contenant des corps d'Auer,
- l'absence de localisation extramédullaire,
- une indépendance transfusionnelle
- la sortie d'aplasie (caractérisée par la présence de polynucléaires neutrophiles à plus de 1 G/L et d'un taux plaquettaire supérieur à 100 G/L).

La rémission cytologique est le reflet d'une diminution de la charge leucémique et correspond au passage de 10^{12} ou plus de cellules au diagnostic à 10^{10} ou moins en post induction (177). Cette définition ne permet donc pas d'apprécier la profondeur de la réponse et de distinguer différents groupes de patients en fonction de la qualité de leur réponse. La RC est obtenue chez près de 80% des patients atteints de LAM. L'obtention d'une RC est un facteur de bon pronostic mais ne signifie pas que le patient est guéri. En effet, la plupart des patients va

rechuter au cours du suivi. La MRD est définie comme la persistance, après obtention d'une RC, d'une maladie détectable par d'autres techniques que la cytologie. Le seuil à partir duquel on affirmera la présence d'une MRD est dépendant du type de technique considérée (cytogénétique, FISH, cytométrie en flux, biologie moléculaire) (Figure 8).

Le suivi de la MRD est actuellement intégré à la prise en charge des patients atteints de LMC (178), LAP (37) et LAL (179). La littérature récente est vaste sur l'intérêt pronostique de la MRD concernant les LAM du groupe CBF et validée par des études prospectives (180-182). Pour ces LAM, il n'existe cependant pas d'étude l'incluant dans la prise en charge thérapeutique. Le suivi de la MRD est donc un domaine de recherche très dynamique en particulier pour les LAM dépourvues de marqueurs propres de suivi.

Au cours des LAM, le suivi de la MRD est particulièrement utile dans plusieurs cas de figure :

- Pour apprécier la profondeur de la réponse au traitement
- Pour réajuster le traitement du patient de façon évolutive (consolidation ou intensification)
- Pour prévenir la rechute clinique en proposant un traitement dès la rechute moléculaire

A l'avenir, son utilisation sera donc probablement de plus en plus recommandée afin d'offrir une prise en charge personnalisée aux patients atteints de LAM.

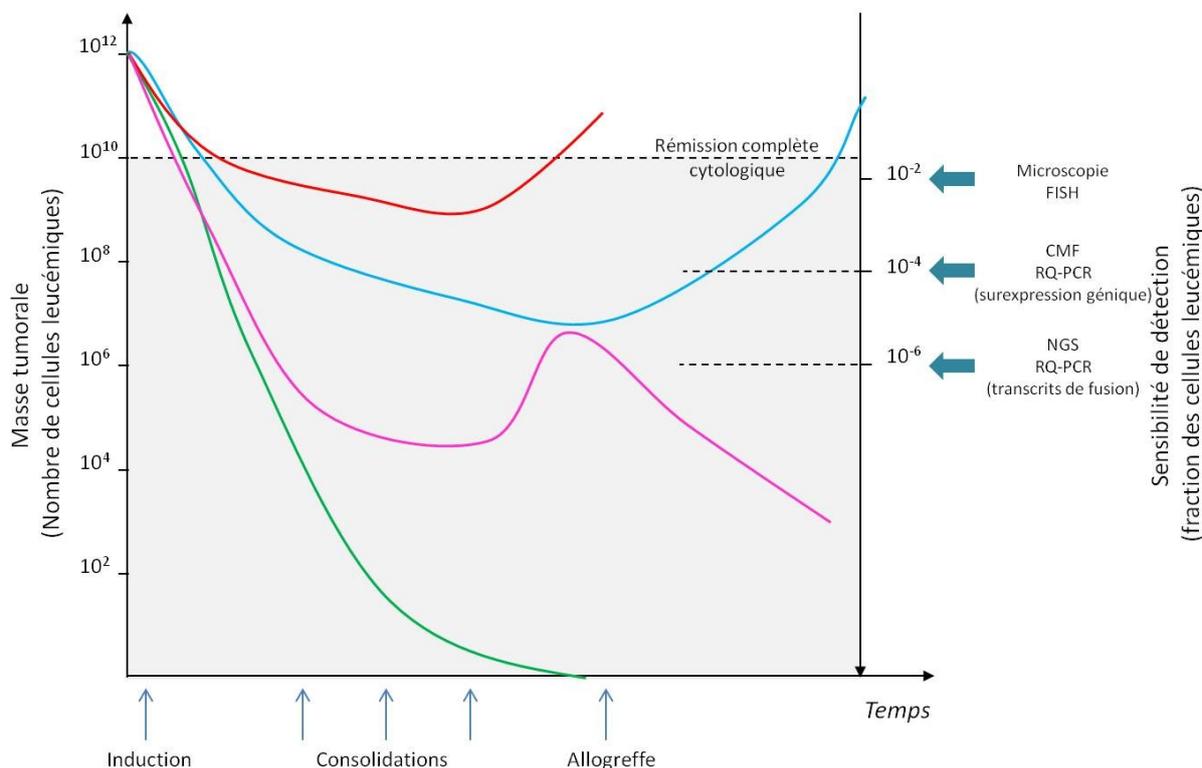


Figure 8 : Principe de la maladie résiduelle et seuils de détection des techniques utilisées pour l'évaluer dans les leucémies aiguës myéloïdes. Différents profils d'évolution de la maladie résiduelle en état de rémission complète cytologique sont présentés, d'après (183) *FISH* : hybridation in situ en fluorescence, *CMF* : Cytométrie en flux, *RQ-PCR* : Real-time quantitative PCR, *NGS* : Next Generation sequencin.

2. Méthodes de Suivi dans les LAM

i. Cytométrie en Flux

La CMF est un outil essentiel non seulement lors du diagnostic de LAM mais aussi pour le suivi de la MRD (184). Chez les adultes, on estime ainsi qu'environ 75-95% des patients (184-188) présentent un ou plusieurs immunophénotype(s) aberrants associé(s) à la leucémie (LAIP) au diagnostic. Il est donc possible de suivre la MRD par CMF à différents temps du traitement chez une majorité de patients avec LAM. Les avantages de cette technique sont une bonne disponibilité du matériel dans les centres hospitaliers, un rendu rapide des résultats et un coût inférieur comparé aux techniques de biologie moléculaire. Toutefois, l'analyse des données nécessite une expertise importante, l'évaluation est dépendante du manipulateur (189) et des variations phénotypiques peuvent être présentes à la rechute, ce qui peut en limiter l'utilisation (184, 190).

L'évaluation de la MRD par CMF se fait au travers de l'analyse des LAIP, plus récemment décrite comme une analyse des « différences par rapport à la normale ». Ces LAIP peuvent être regroupés en 4 classes :

- Marqueurs d'infidélité de lignée
- Marqueurs d'asynchronisme de maturation
- Marqueurs non exprimés ou sous-exprimés
- Marqueurs surexprimés.

La sensibilité de ces marqueurs dépend de leur expression initiale sur les cellules leucémiques (dans l'étude de Feller *et al.* ils sont considérés comme sensibles au delà de 50%, peu sensibles entre 10 et 20% d'expression et enfin non considérés comme marqueur de suivi en dessous de 10%) et leur spécificité de leur expression sur moelles normales (189).

La détection de ces marqueurs est fonction du panel d'anticorps utilisé au diagnostic. Initialement réalisée à l'aide de cytomètres 2 ou 3 couleurs, l'utilisation plus récente de cytomètres 6-8 couleurs a permis un confort d'utilisation, un gain de temps technique et une augmentation du seuil de détection.

Actuellement le suivi de la MRD est réalisé sur moelle osseuse compte tenu du manque de sensibilité du phénotypage sur sang (190). L'évaluation de la MRD par CMF a montré un intérêt pronostique à différents temps du traitement à la fois dans des études rétrospectives et prospectives (tableau 7) :

- lors de l'aplasie post-induction (191),
- au terme d'une cure d'induction (184-186, 190-194),
- au terme des cures de consolidation (186, 187, 192).

Toutefois, la portée de ces résultats est limitée car ces études sont majoritairement rétrospectives et incluent une population restreinte. De plus, seule l'étude prospective AML02 sur une population pédiatrique, a intégré le suivi de la MRD par CMF dans l'adaptation du traitement et la prise en charge des patients (194). D'autres données prospectives sur l'intérêt ou non de fonder en partie la décision thérapeutique sur les résultats de la MRD en CMF sont donc nécessaires. Enfin, l'analyse de la MRD par CMF manque actuellement de standardisation et il existe une grande hétérogénéité des seuils de positivité retenus dans chaque étude (tableau 7).

| Référence | Nombre de couleurs | N suivis | Valeur du seuil retenu | Echantillon | Point de suivi | impact pronostique |
|--|--------------------|-------------------|--|-------------|----------------------|--|
| San Miguel et al., 2001 (185) | 3 | 126 | $> 10^{-2}$ $10^{-2} - 10^{-3}$ $< 10^{-3}$ | MO | PI | CIR, RFS, OS (3 groupes pronostiques distincts) LAP exclues : CIR (3 groupes distincts) facteur indépendant |
| Kern et al., 2004 (192) | 3 | 58 (PI) 62(PC) | réduction log (variable continue) | MO | PI PC | RFS (PI, PC) et OS (PC) facteur indépendant groupes cytogénétiques intermédiaire ou défavorable : RFS(PI, PC), OS (PC) |
| Al Mawali et al., 2009 (184) | 5 | 25 | $> 0,15\%$ | MO | PI PC | RFS (PI, PC), OS (PI) facteur indépendant (PI) |
| Buccisano et al., 2010 (187) | 9 ? | 143 | $> 3,5.10^{-4}$ | MO | PC | RFS, OS facteur indépendant |
| Rossi et al., 2012 (195) | 6 | 23 | $> 0,1\%$ | MO | PI | DFS (PI) |
| Freeman et al., 2013 (188) | 4 6 | 427 | $>$ seuil de détection infidélité : 0,02-0,1% asynchronisme 0,1% autre : 0,2% | MO | C1 C2 | CIR (C1, C2) |
| Terwijn et al., 2013 (186) | 4 | 241 | $> 0,1\%$ | MO | C1 C2 | RR, RFS, OS (C1, C2, FT) facteur indépendant (C2) |
| Marani et al., 2013 (196) | 4 | 34 | $> 2,5.10^{-4}$ | MO | PI | DFS |
| Rossi et al., 2014 (197) | 6 | 45 | $> 0,2\%$ réduction $> 2,64\log$ | MO | PC | OS (seuil $> 0,2\%$), DFS (tous les seuils) facteur indépendant pour DFS |
| Köhnke et al., 2015 (191) | 3 | 344 | $> 0,15\%$ (A) $> 0,3\%$ (PI) | MO | A PI | RFS (A, PI), OS (A) facteur indépendant (RFS (A)) groupes cytogénétique intermédiaire (RFS) |
| Malagola et al., 2016 (198) | 8 | 80 | $> 0,2\%$ | MO | PI PC1 Pint | CIR (PC1), RFS (Pint et PC1) facteur indépendant (PC1) groupes cytogénétique int2 (PC1) |
| Rubnitz et al., 2012 (194) | 4 | 216 | $> 0,1\%$ (PI1 et PI2) $> 1\%$ (PI1, PI2) | MO | PI1 PI2 | seuils 0,1% : CIR, EFS (PI1, PI2) groupes pronostiques défavorables CIR (PI1) facteur indépendant : (seuil 1%) EFS, OS (PI1) |
| Van der Velden et al., 2010 (190) | 4 | 67 | $> 0,1\%$ $> 0,5\%$ | MO | C1 C2 C3 FT | RFS, OS (C1 au seuil de 0,1 et 0,5%) RFS, OS (C2 au seuil de 0,5%) persiste après exclusion des CBF facteur indépendant au seuil de 0,5% (C1, C2) |
| Loken et al., 2012 (193) | 4 | 188 | $>$ seuil détection | MO | PI1 PI2 FT | RR, RFS (PI1, PI2, FT) OS(PI1) facteur indépendant (RFS, PI1) |

Tableau 7 : Impact pronostique de l'évaluation de la maladie résiduelle par Cytométrie en Flux. C1/2 : chimiothérapie n°1/2, PI (1/2) : post-induction (1/2), PC(1) : post-consolidation (n°1), Pint : post-intensification, A : pendant l'aplasie, FT : fin de traitement, MO : moelle osseuse, S : sang périphérique, CIR : incidence cumulée de rechute, RFS : survie sans rechute, EFS : survie sans événement, DFS : survie sans maladie, OS : survie globale, RR : risque de rechute

ii. Biologie moléculaire

Il n'existe pas de marqueur de BM associé à l'ensemble des LAM. Dans un certain nombre de cas, il est possible de suivre de manière quantitative l'évolution d'un transcrite de fusion associé spécifiquement à un type de leucémie (non détaillé dans la suite de travail). Lorsqu'il s'agit d'une leucémie aigue dépourvue de transcrite spécifique, le suivi moléculaire repose alors sur la détection des mutations du gène *NPM1* et sur la surexpression du gène *WT1*.

NPM1

Le gène de la nucléophosmine est muté dans environ 30% des LAM et dans plus de la moitié des LAM-CN. Cette mutation est stable au cours du temps ce qui en fait un marqueur de suivi intéressant pour détecter la rechute. Ainsi, chez des patients présentant une mutation *NPM1* au diagnostic, la mutation est également présente à la rechute dans la majorité des cas (200-204). La mutation de *NPM1* peut être recherchée et quantifiée sur moelle osseuse ou sur sang périphérique. Bien que la technique soit moins sensible sur sang périphérique d'environ 10^3 par rapport aux résultats obtenus sur moelle (201, 205), il existe une bonne corrélation des résultats (88% selon Krönke *et al.*(206)). La quantification de la mutation de *NPM1* dans le cadre de l'évaluation de la MRD repose sur l'utilisation de la PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR) réalisée à partir d'ARN/ADNc le plus souvent. L'évaluation sur ADN semble moins sensible (204). L'expression de la mutation *NPM1* est rapportée à l'activité du gène de référence *ABL1* dans la plupart des cas.

Dans les différentes études évaluant l'impact de la MRD basée sur *NPM1* (tableau 8), la MRD a été évaluée à plusieurs temps : en post-induction, en post-consolidation ou encore en fin de traitement. Il a été mis en évidence un impact pronostique du suivi de la MRD à des temps précoces (post induction voire au cours de l'aplasie) ou plus tardifs (post consolidation ou en fin de traitement), aussi bien sur le risque de rechute que sur la survie. L'équipe de Ivey *et al.* a par exemple montré, sur une cohorte de 346 patients présentant une LAM avec mutation de *NPM1*, l'impact pronostique de l'évaluation de la MRD après 2 cycles de chimiothérapie intensive. Les patients inclus étaient âgés de 6 à 68 ans (médiane à 50 ans). Les premières données rétrospectives retrouvaient qu'une MRD détectable sur sang après le 2^{ème} cycle de chimiothérapie intensive était associée à un taux de rechute significativement plus important à 3 ans (82% versus 30%) ainsi qu'à une diminution de la survie à 3 ans (24% versus 75%). Ce résultat était indépendant du statut mutationnel de *DNMT3A* ou *FLT3-ITD* ou du groupe pronostique cytogénétique. Ces données rétrospectives sur une cohorte de

patients traités entre 2009 à 2012 ont été validées sur une cohorte prospective de 2012 à 2014 (201).

Toutefois, les seuils évalués pour définir une maladie résiduelle négative ou positive varient selon les études et aucune étude publiée n'a intégré la MRD basée sur *NPM1* dans la prise en charge thérapeutique des patients.

WT1

Le gène *WT1* est exprimé chez les sujets sains et sa surexpression est retrouvée dans la majorité des LAM (70-90% des cas)(68, 207). Le niveau de surexpression varie entre les différents types de leucémies. Ainsi, une surexpression marquée de *WT1* est notamment détectée chez les patients atteints de LAM du groupe CBF ou ayant une mutation de *NPM1* alors que les LAM 5 selon la classification FAB semblent présenter des taux inférieurs d'expression de *WT1* (208).

C'est un marqueur stable. Ainsi, chez la plupart des patients ayant au diagnostic une surexpression de *WT1*, celle-ci sera retrouvée à la rechute (68, 208). C'est également un bon marqueur pour suivre la profondeur de la réponse au traitement puisque ses variations quantitatives sont corrélées au statut de la maladie. L'expression physiologique de *WT1* chez les sujets sains est moins importante dans le sang périphérique (quasiment indétectable) que dans la moelle osseuse. Le seuil de détection a donc été abaissé dans le sang par rapport à la moelle osseuse. Les taux de *WT1* retrouvés au diagnostic ne varient pas significativement entre ces deux types d'échantillons (207).

Ce n'est que depuis 2009 que des recommandations officielles sur la quantification du gène *WT1* ont été publiées par l'ELN. Sur la base de l'expression du gène chez les sujets sains, les seuils de positivité de 0,5 copies pour 100 copies d'*ABL1* dans le sang et 2.5 copies pour 100 copies d'*ABL1* dans la moelle osseuse ont été fixés. Avant cette étude, le seuil de positivité n'était pas consensuel et variait d'une publication à une autre. De même les recommandations de l'ELN ont précisé les conditions techniques de la quantification de la surexpression de *WT1* pour limiter l'hétérogénéité entre les différents centres (207).

Le tableau 9 présente les principales publications ayant étudié l'impact pronostique du suivi de la MRD-WT1. Dans ces études, la MRD-WT1 mesurée est associée à un impact sur la rechute et/ou la survie. Toutefois, ces études sont pour la plupart rétrospectives et n'incluent pas de cohortes de validation. De plus, malgré le fait que la majorité d'entre elles aient été

réalisées après les recommandations de standardisation des méthodes, il persiste une hétérogénéité des techniques et des seuils considérés rendant l'interprétation parfois difficile.

| Référence | Marqueur | Références utilisées | N suivis | Valeur du seuil retenu | Echantillon | Point de suivi | Impact Pronostique |
|--------------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|----------|---|-------------|---|--|
| Gorello et al., 2006 (204) | <i>NPM1</i> , A | <i>ABL1</i> , plasmide | 13 | | MO/S | PI | corrélation avec statut clinique |
| Schnittger et al., 2009 (200) | <i>NPM1</i> | <i>ABL1</i> | 252 | > 0,01% ou 0,1% <i>NPM1m/ABL1</i> (1ère ligne) > 0,1% <i>NPM1m/ABL1</i> (2ème ligne ou P-Int) | | J18-J60 J60-J120 J121-J365 > J365 | 1ère ligne : EFS (tous stades) 2ème ligne : EFS (>J121) P-Int : EFS (>J121) |
| Krönke et al., 2011 (206) | <i>NPM1</i> A, B, D, autres | <i>ABL1</i> | 245 | > seuil de détection | MO/S | J15-J20 PI (simple) PI (double) PC1, PC2, FT | RR, OS (PI simple ou double, PC1, PC2, FT) <i>nb : pendant suivi > 200 copies/10⁴ copies d'ABL1 prédit la rechute</i> |
| Miglino et al., 2012 (209) | <i>NPM1</i> mut A | <i>ABL1</i> | 26 | réduction $\geq 4\log$ (PI) > seuil de détection = <i>NPM-RC</i> (PI,PC) | MO | PI PC | RR (PI, PC), DFS (PI, PC), OS (PI) facteur indépendant (<i>NPM-RC</i>) |
| Shayegi et al., 2013 (205) | <i>NPM1</i> mut A, B, D | <i>ABL1</i> | 155 | > 1% <i>NPM1m/ABL1</i> (PI, FT) > 10% <i>NPM1m/ABL1</i> (PInt) | MO/S | PI (MO/S) FT (MO) PInt (MO/S) | CIR, DFS, OS (PI, FT, PInt) facteur indépendant (PI) |
| Hubmann et al., 2014 (203) | <i>NPM1</i> mut A, B, D | <i>ABL1</i> lignée OCI/AML3 | 158 | (<i>NPM1m/ABL1</i>)/ratio lignée >10 (J16-J18) réduction $\geq 1\log$ (J16-J18) (<i>NPM1m/ABL1</i>)/ratio lignée > 0,01 (PI, PC) réduction $\geq 3\log$ (PI, PC) | MO | J16-J18 PI PC | CIR (aplasie, PI, PC) OS (PI (réduction log) PC) facteur indépendant (CIR) |
| Lambert et al., 2014 (210) | <i>NPM1</i> , A, B, D | <i>ABL1</i> , plasmide | 61 | > seuil de détection (0,1% <i>NPM1m/ABL1</i>) | MO | PI, FT | RR (PI, FT) |
| Ivey et al., 2016 (201) | <i>NPM1</i> | <i>ABL1</i> , plasmide | 346 | > seuil de détection | S | PC1 | RR, OS (facteur indépendant) |

Tableau 8 : Impact pronostique de l'évaluation de la maladie résiduelle par RQ-PCR sur les mutations de *NPM1*. *NPM1m* : *NPM1* muté, *mut* : mutation, *C1/2* : chimiothérapie *n*^o1/2, *PI* : post-induction, *PC(1/2)* : post-consolidation (*n*^o1/2), *PInt* : post-intensification, *FT* : fin de traitement, *MO* : moelle osseuse, *S* : sang périphérique, *CIR* : incidence cumulée de rechute, *RFS* : survie sans rechute, *EFS* : survie sans événement, *DFS* : survie sans maladie, *OS* : survie globale, *RR* : risque de rechute, *J* : jour après début de traitement, *N* : nombre de patients.

| Référence | technique ELN | Références utilisées | N suivis | Valeur du seuil retenu | Echantillon | Point de suivi | Impact Pronostique |
|--------------------------------|---------------|---------------------------------|----------|---|-------------|----------------------------------|--|
| Weisser et al., 2005 (208) | non | <i>ABL1</i> plasmide | 105 | réduction $\geq 2\log$ ≥ 40 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> | MO | J16-J60 J61-J120 J121-J180 | EFS (J61-J120 et J121-180) pour réduction log EFS, OS (J61-J120 et J121-180) pour seuil |
| Lapillonne et al., 2006 (68) | non | <i>TBP</i> , lignée K562/REH | 36 | > normale : 50 copies/ 10^3 copies de <i>TBP</i> | MO | PI (J35-J50) | RR, EFS, OS (facteur indépendant) |
| Ommen et al., 2008 (211) | non | <i>ABL1</i> , <i>B2M</i> | 89 | > normale : 68 et 14 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> sur MO et S | MO/S | PI | DFS, OS (facteur indépendant) |
| Cilloni et al., 2009 (207) | oui | <i>ABL1</i> plasmide | 129 | réduction $\geq 2\log$ (PI) > normale : 250 et 50 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> sur MO et S (PC) | MO/S | PI PC | RR (PI) (facteur indépendant) RR (PC) |
| Nowakowska et al., 2009 (212) | non | <i>ABL1</i> plasmide | 30 | > 20 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> | S | PI PC | OS (PI et PC) |
| Gianfaldoni et al., 2010 (213) | non | <i>ABL1</i> plasmide | 57 | ratio J1/J5 > 5,82 | S | J5 PI | RC, OS (facteur indépendant) patients en RC : DFS |
| Rossi et al., 2012 (195) | non | <i>ABL1</i> , plasmide | 23 | \geq normale 90 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> | MO | PI | DFS (non indépendant) |
| Marani et al., 2013 (196) | oui | <i>ABL1</i> , plasmide | 42 | réduction $\geq 1,5\log$ | MO | PI | RR, DFS |
| Rossi et al., 2014 (197) | oui | <i>ABL1</i> plasmide | 45 | ≥ 77 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> réduction $\geq 1,96\log$ | MO | PI | DFS (PI par les deux définitions) |
| Lambert et al., 2014 (210) | oui | <i>ABL1</i> plasmide | 104 | > normale : 50 et 200 copies/ 10^4 copies d' <i>ABL1</i> | MO/S | PI FT | RR, OS (PI et FT) facteur indépendant RR (PI) et OS (PI et FT) |
| Shibasaki et al., 2015 (214) | non | <i>GAPDH</i> | 32 | réduction $\geq 2\log$ | MO | PI, PC | DFS, OS (PI et PC) (facteur indépendant) |
| Malagola et al., 2016 (198) | oui | <i>ABL1</i> plasmide | 42 | MO $\geq 295-121-150/10^4$ copies d' <i>ABL1</i> (PI-PC1-PInt) PB $\geq 18-16 /10^4$ copies d' <i>ABL1</i> (PC1-PInt) | MO/S | PI PC1 Pint | MO : RFS (PI, PC1 et Pint) (facteur indépendant) S : RFS (PC1, et Pint) |

Tableau 9 : Impact pronostique de l'évaluation de la maladie résiduelle par RQ-PCR sur l'expression de *WT1*. *CI/2* : chimiothérapie n°1/2, *PI* : post-induction, *PC(1/2)* : post-consolidation (n°1/2), *PInt* : post-intensification, *FT* : fin de traitement, *MO* : moelle osseuse, *S* : sang périphérique, *CIR* : incidence cumulée de rechute, *RFS* : survie sans rechute, *EFS* : survie sans événement, *DFS* : survie sans maladie, *OS* : survie globale, *RR* : risque de rechute, *J* : jour après début de traitement, *N* : nombre de patients.

Objectifs de l'étude

Les objectifs de ce travail sont :

- D'étudier la valeur pronostique d'une évaluation précoce de la MRD, c'est-à-dire réalisée entre la sortie d'aplasie post-induction et la 1^{ère} cure de consolidation, en utilisant une quantification par CMF et/ou par BM (RQ-PCR sur *WT1* et/ou *NPM1* muté) sur la survie et la rechute.
- D'établir la concordance entre des résultats obtenus par CMF et RQ-PCR lors de l'évaluation précoce de la MRD.
- Etablir l'intérêt de l'évaluation précoce de la MRD par l'une ou l'autre technique.

Matériels et Méthodes

I. Patients et prélèvements

1. Patients

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée à partir d'une base de données comportant 182 patients ayant bénéficié d'au moins une évaluation de la MRD au cours de leur suivi :

- par biologie moléculaire (**MRD-BM**) sur l'expression du gène *WT1* (**MRD-WT1**) ou du gène *NPM1* muté (**MRD-NPM1**) et/ou
- par cytométrie en flux (**MRD-CMF**).

Les patients atteints de LAM et diagnostiqués entre 2005 et 2013 ont été sélectionnés. Parmi ceux-ci, seuls les patients présentant les critères de RC définis selon l'ELN (19) au terme d'une ou deux cure(s) de chimiothérapie intensive d'induction ont été considérés. Au total, après exclusion des patients atteints de LAP, 128 patients ayant bénéficié d'un suivi initial dans le Service des Maladies du Sang Adulte du Centre Hospitalier Régional et Universitaire (CHRU) de Lille ont été inclus dans l'étude. Les données initiales et de suivi des patients ont été recueillies à partir des dossiers cliniques. Les données cliniques étudiées concernaient l'âge au diagnostic, le sexe, le caractère *de novo* de la LAM, la présence de localisations extramédullaires. Les données biologiques recueillies ont été : les taux sanguins initiaux de leucocytes, blastes circulants, hémoglobine, plaquettes et la classification FAB (20-22). A partir des données de cytogénétique (sur moelle ou plus rarement sur sang périphérique) et des données de BM (statut mutationnel de *NPM1*, *FLT3-ITD* et *CEBPA*) disponibles, les groupes pronostiques ELN (19) ont été constitués. A partir des données recueillies, les LAM ont été classées selon l'OMS 2008 (44). La présence d'une expression de *WT1* supérieure à la normale (207) ainsi que la présence de LAIP au diagnostic ont été relevées.

2. Prélèvements

Les prélèvements médullaires ou sanguins ont été acheminés en tube EDTA au Centre de Biologie Pathologie du CHRU de Lille pour analyse, à la discrétion du clinicien, lors de la prise en charge des patients. Le consentement des patients était requis pour la conservation des échantillons.

Pour chaque patient inclus, les données de MRD ont été recueillies à partir du logiciel MOLIS[®].

A partir du recueil de données cliniques et de l'extraction des données de MRD, un point de suivi a ensuite été attribué à chaque prélèvement. Les différents points d'évaluation de la MRD retenus pour cette étude ont été :

- **Post-induction n°1** : prélèvement réalisé en sortie d'aplasie suivant la réalisation d'une chimiothérapie d'induction,
- **Post-induction n°2** : prélèvement réalisé en sortie d'aplasie suivant la réalisation d'une seconde chimiothérapie d'induction,
- **Pré-consolidation n°1** : prélèvement réalisé avant chimiothérapie de consolidation n°1.

Afin d'étudier une large cohorte de patients présentant une MRD-CMF, nous avons regroupé les prélèvements réalisés pour ces 3 points. Dans l'étude, seule une valeur de MRD par méthode de suivi était considérée par patient. Ainsi, si des données de MRD étaient disponibles à plusieurs temps de suivi pour un même patient, seul le prélèvement le plus tardif était retenu pour chaque méthode de suivi (MRD-CMF, MRD-WT1, MRD-NPM1).

La **MRD précoce** était définie par une MRD évaluée lors d'au moins un de ces points de suivi.

La figure 9 présente la sélection des patients ainsi que les prélèvements disponibles.

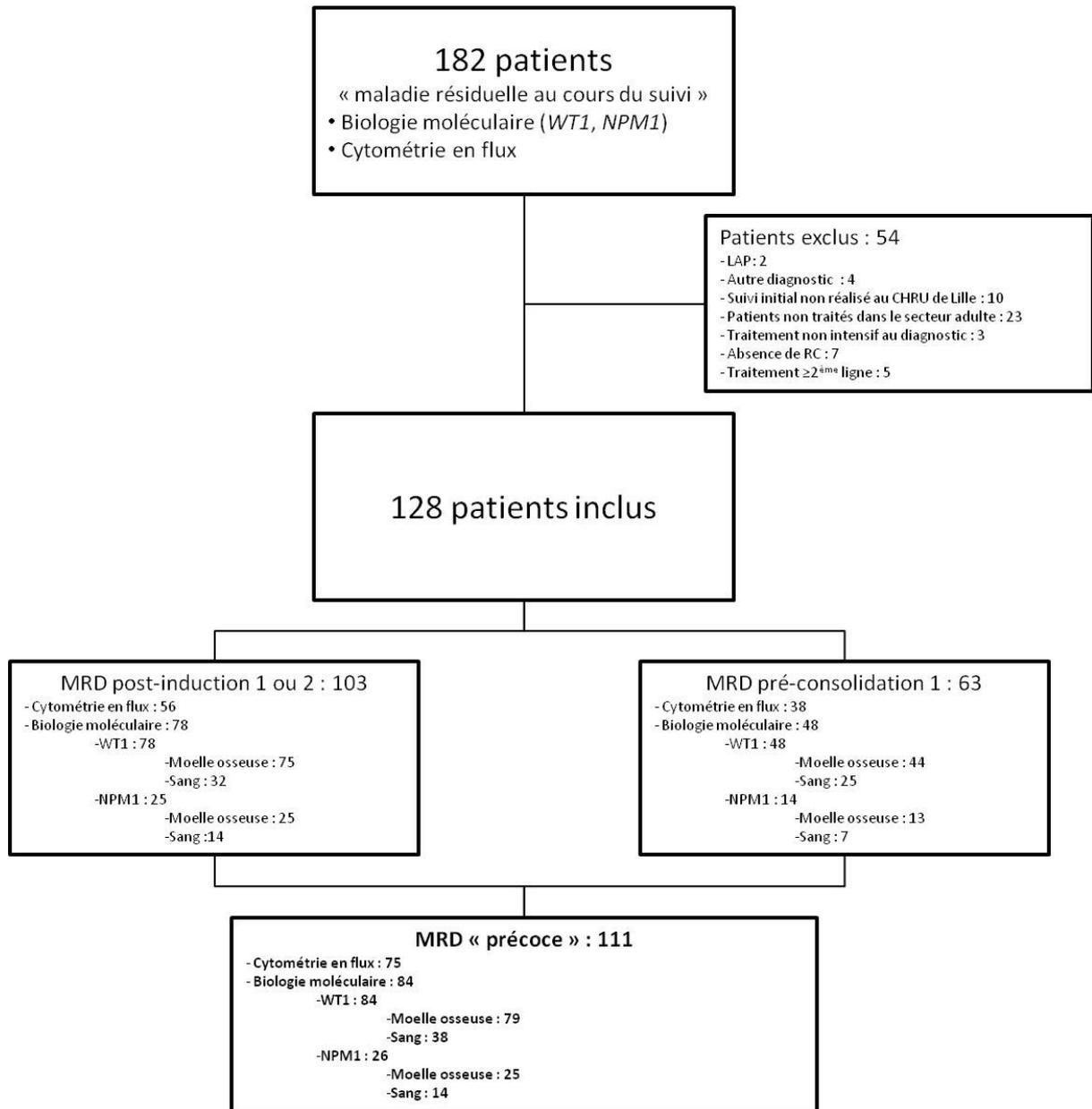


Figure 9 : Diagramme présentant la sélection des patients et des prélèvements disponibles pour une évaluation précoce de la MRD. LAP : leucémie aiguë promyélocytaire, RC : réponse complète.

II. Mesure de la Maladie Résiduelle

1. Cytométrie en Flux

i. Principe de la cytométrie en flux et application à la détection de la maladie résiduelle

Brièvement, la CMF est une technique permettant l'analyse de cellules en suspension. Les cellules sont injectées à grande vitesse au sein d'un flux liquide. Elles adoptent alors une configuration en fil indienne puis traversent différents lasers couplés à une série de détecteurs ce qui permet d'analyser individuellement un grand nombre de cellules en peu de temps. L'étude de la lumière réémise par diffusion ou fluorescence lors du passage d'une cellule permet d'obtenir des informations sur sa taille, sa granulosité ou la présence d'un éventuel fluorochrome qui lui serait adjoint. On peut ainsi quantifier au sein d'un échantillon des sous-types cellulaires en fonction de leurs propriétés physiques et des marqueurs d'intérêt.

Au moment du diagnostic de LAM, les blastes isolés à partir des prélèvements du patient sont étudiés en CMF avec des panels d'anticorps. Ainsi, il est parfois possible de déterminer un ou plusieurs LAIP. Au cours du suivi, les prélèvements ultérieurs sont techniqués de manière identique afin de quantifier le nombre de cellules présentant le ou les LAIP, c'est à dire la MRD du patient.

ii. Préparation des cellules

Les prélèvements médullaires ont été préparés pour marquage. Pour chaque tube de marquage, environ 1 million de cellules étaient d'abord lavées au PBS1X puis incubées en présence d'immunoglobulines humaines afin de saturer les sites de fixation antigénique. Les marquages par anticorps couplés aux fluorochromes ont ensuite été réalisés pendant 15 à 20 minutes. Après lyse érythrocytaire par solution de NH_4Cl , et lavage au PBS1X supplémenté en sérum albumine (1%), les échantillons ont été repris dans 500 μL de PBS1X pour passage immédiat au cytomètre.

iii. Cytomètres utilisés

Plusieurs types de cytomètres de flux ont été utilisés pour l'acquisition des données selon la période d'analyse :

- 2005-2007 : EPICS[®] XL[™] (Beckman Coulter)
- 2007-2011 : Cytomics FC500 (Beckman Coulter)
- depuis 2011 : Navios (Beckman Coulter).

L'évolution de la cytométrie et des appareils utilisés a entraîné des différences dans l'acquisition des données de MRD. Ainsi, si l'analyse a été initialement réalisée sur des cytomètres utilisant une configuration en 4 à 5 couleurs, depuis 2013 elle est faite sur un cytomètre de flux mutiparamétrique en configuration 10 couleurs.

La calibration des cytomètres a été réalisée quotidiennement à l'aide de fluorosphères Flow-Check[™] et Flow-Set[™] (Beckman Coulter) permettant la vérification de l'alignement optique et des circuits fluidiques ainsi que la stabilité d'émission du laser et de détection des photomultiplicateurs.

Afin d'obtenir la meilleure sensibilité de détection, l'acquisition n'était pas interrompu avant que l'intégralité de la suspension cellulaire n'ait été analysée, l'objectif étant d'obtenir au moins 500 000 événements.

Enfin, afin d'éviter toute contamination liée au passage de prélèvements successifs, des tubes contenant de l'eau ont été passés avant chaque nouvelle utilisation du cytomètre.

iv. Exemple de panel d'anticorps

La détection des LAIP est fonction des panels d'anticorps utilisés au diagnostic. Les panels utilisés dans notre étude pour le diagnostic de leucémie aiguë ont été sélectionnés d'après les recommandations (19). Après mise en évidence des LAIP au diagnostic, les mesures ultérieures lors des autres points de suivi ont été réalisées en utilisant les mêmes panels d'anticorps couplés aux mêmes fluorochromes. Le tableau 10 est un exemple des panels d'anticorps utilisés au diagnostic et lors du point de suivi pour évaluer la MRD.

| | | Fluorochromes | | | | | | | | | |
|---------------------|---------------|---------------|-------------|-----|-------------|-------------|--------------|------------|------------|----|-------------|
| | | FITC | PE | ECD | PC5.5 | PC7 | APC | AA700 | AA750 | PB | KO |
| Antigènes ciblés | Tube 1 | CD2 | | | | | | | | | CD45 |
| | Tube 2 | CD38 | HLA-DR | | CD19 | CD43 | CD22 | CD10 | | | CD45 |
| | Tube 3 | CD64 | CD4 | | CD33 | CD34 | CD56 | | CD14 | | CD45 |
| | Tube 4 | CD65 | CD13 | | CD33 | CD34 | CD117 | CD7 | CD3 | | CD45 |

Tableau 10 : Panel d'anticorps utilisé au diagnostic en 2013 du patient n°76. Le cytomètre de flux utilisé permettait alors une analyse en 8 couleurs. L'ensemble de ces tubes permet d'aboutir au diagnostic de LAM. Le Tube 1 permet d'éliminer les leucémies aigües de phénotype T. Le tube 2 contient des marqueurs lymphoïdes B et des marqueurs d'immaturation. Le tube 3 permet de mettre en évidence une maturation myéloïde des cellules avec des marqueurs monocytaires. Le tube 4 permet de mettre en évidence une maturation myéloïde ou lymphoïde T. Ces différents panels permettent de mettre en évidence des LAIP présentés par les cellules blastiques. Le tube 4 a été utilisé pour l'évaluation de la MRD chez cette patiente.

v. Stratégie d'analyse actuelle

La stratégie d'analyse actuelle est basée sur le fenêtrage des blastes puis la recherche d'un LAIP.

Définition de la fenêtre « blastes » au diagnostic et lors du suivi (figure 10 et 11)

Diagrammes « TIME », « FS/FSpeak » et « FS/SS »

Un premier diagramme « TIME » permet de visualiser le nombre d'événements acquis en fonction du temps. Il reflète ainsi la stabilité de l'acquisition sur le cytomètre au cours du temps. Les diagrammes « FSint/FSpeak » et « FSint/SSint » permettent respectivement d'éliminer les doublets puis les éléments de petite taille (débris) ou de taille et/ou structure trop importante. Un premier fenêtrage « cellules » définit la population d'intérêt pour la suite de l'analyse.

Diagramme CD45/SSint

Ce diagramme permet de distinguer les éléments CD45⁺ (sous-populations leucocytaires) des populations CD45⁻ (débris). La fenêtre « leucocytes » totalise le nombre d'événements leucocytaires acquis et servira de dénominateur pour la quantification de la MRD.

On délimite ensuite *a priori* les différentes fenêtres contenant les populations granuleuses, les monocytes, les lymphocytes et les blastes selon l'expression du CD45 et l'hétérogénéité de structure. La fenêtre « blastes » est délimitée *a priori* puis validée par un fenêtrage rétrograde à partir des éléments CD45^{faible}/CD34⁺ (cf. Diagramme CD45/CD34).

Diagramme « CD45/CD34 »

L'analyse des leucocytes sur le diagramme CD45/CD34 permet de réaliser plusieurs contrôles. Le fenêtrage des événements CD45^{faible}/CD34⁺ est appelé « CD34⁺ ».

Celui-ci permet de vérifier le fenêtrage « blastes » réalisé *a priori* sur l'intensité du CD45 et la structure. Eventuellement, cette fenêtre est alors redessinée si le nuage de point « CD34⁺ » n'est pas entièrement inclus dans la fenêtre blastes.

D'autre part, en rapportant le nombre d'événements CD34⁺ sur le nombre d'événements CD45⁺, on obtient un pourcentage de blastes médullaires nous permettant de juger de l'hémodilution du prélèvement. Un prélèvement non hémodilué contient environ 3 à 4% de blastes lors des évaluations de MRD. Il est ainsi possible d'évaluer le seuil technique qui permettrait de mettre en évidence une MRD (définie par un nuage composé de 50 événements dans un prélèvement non dilué ayant le même nombre de blastes).

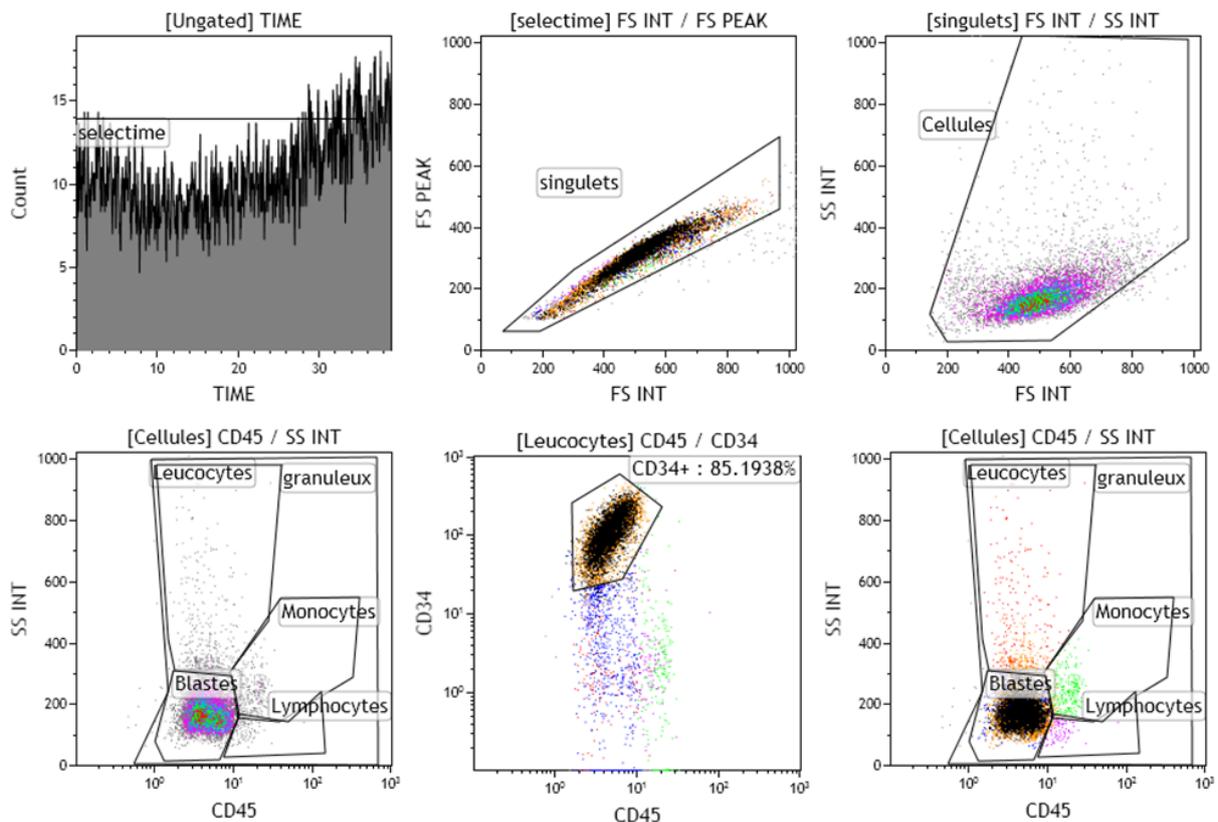


Figure 10 : Définition de la fenêtre « Blastes » au diagnostic chez le patient n°76. Les granuleux apparaissent en rouge. Les monocytes sont colorés en vert et les lymphocytes en rose. Les blastes sont initialement fenêtrés *a priori* sur le diagramme CD45/SS et apparaissent en bleu. Ils représentent la majorité des cellules dans ce prélèvement. La population CD34⁺ est sélectionnée sur le diagramme CD45/CD34 et apparaît en orange. Par rétrocontrôle, on observe que la population CD34⁺ de couleur orange est bien contenue dans la sélection blastes. Les blastes de couleur noir représentent les blastes présentant le LAIP étudié (cf. figure 12).

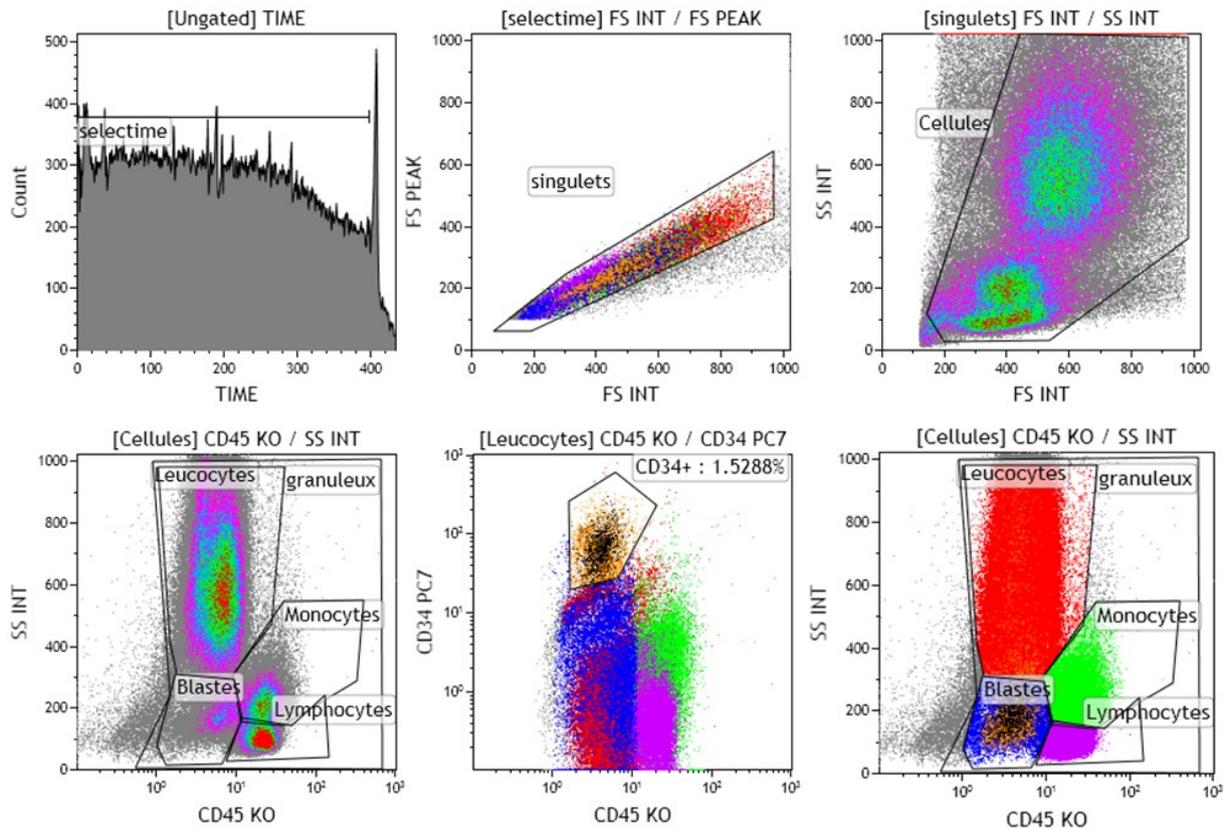


Figure 11 : Définition de la fenêtre « Blastés » en post-induction chez le patient n°76. Les granuleux apparaissent en rouge. Les monocytes sont colorés en vert et les lymphocytes en rose. Les blastés sont initialement fenêtrés *a priori* sur le diagramme CD45/SS et apparaissent en bleu. Les blastés ne représentent alors qu'une fraction des leucocytes. La population CD34⁺ est sélectionnée sur le diagramme CD45/CD34 et apparaît en orange. Par rétrocontrôle, on observe que la population CD34⁺ de couleur orange est bien contenue dans la sélection blastés. Les blastés de couleur noire représentent les blastés présentant le LAIP étudié (cf. figure 13).

Recherche et mesure des LAIP (figures 12 et 13)

La recherche et la quantification de la MRD sur un LAIP sont réalisées en visualisant les blastés dans divers diagrammes permettant de caractériser leurs profils d'expression pour les antigènes marqués. Au diagnostic, pour chaque diagramme, la population blastique est fenêtrée. En combinant les événements contenus dans ces fenêtrés, on obtient le nombre de blastés présentant le phénotype aberrant. En rapportant celui-ci au nombre de leucocytes, on obtient le pourcentage de blastés présentant le phénotype aberrant. Un rétrocontrôle de la population blastique fenêtrée est enfin réalisé sur un diagramme CD45/SS (figure 12).

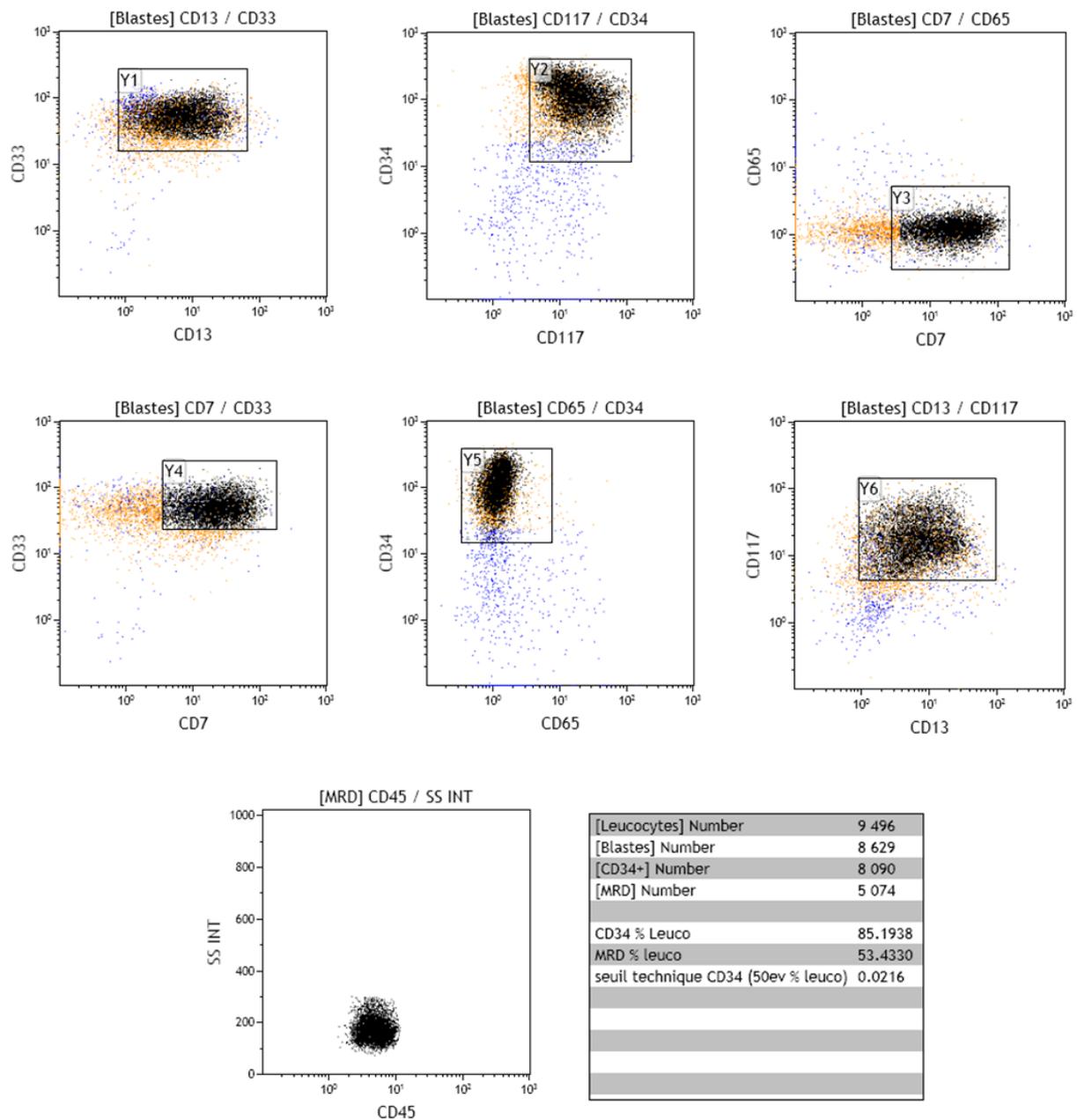


Figure 12 : LAIP au diagnostic « CD34⁺CD117⁺CD33⁺CD13⁺CD7⁺ » chez le patient n°72. Le profil phénotypique des blastes est visualisé dans plusieurs diagrammes. Le fenêtrage permet de définir la population exprimant le LAIP (« MRD ») par une fenêtre combinant les événements « Blastes+Y1+Y2+Y3+Y4+Y5+Y6 ». Celle-ci est colorée en noir. Enfin, la quantification des blastes exprimant le LAIP est exprimée en pourcentage du nombre de leucocytes total (ici 53%).

Pour évaluer la MRD à un point de suivi ultérieur, le masque des fenêtrages déterminés lors du diagnostic est appliqué sur les cellules étudiées. Un rétrocontrôle de la position de ces blastes sur un diagramme CD45/SS est de nouveau effectué permettant d'en apprécier la position, la dispersion et d'éviter un biais de sélection (figure 13).

Pour une LAM, plusieurs types de LAIP peuvent ainsi être suivis.

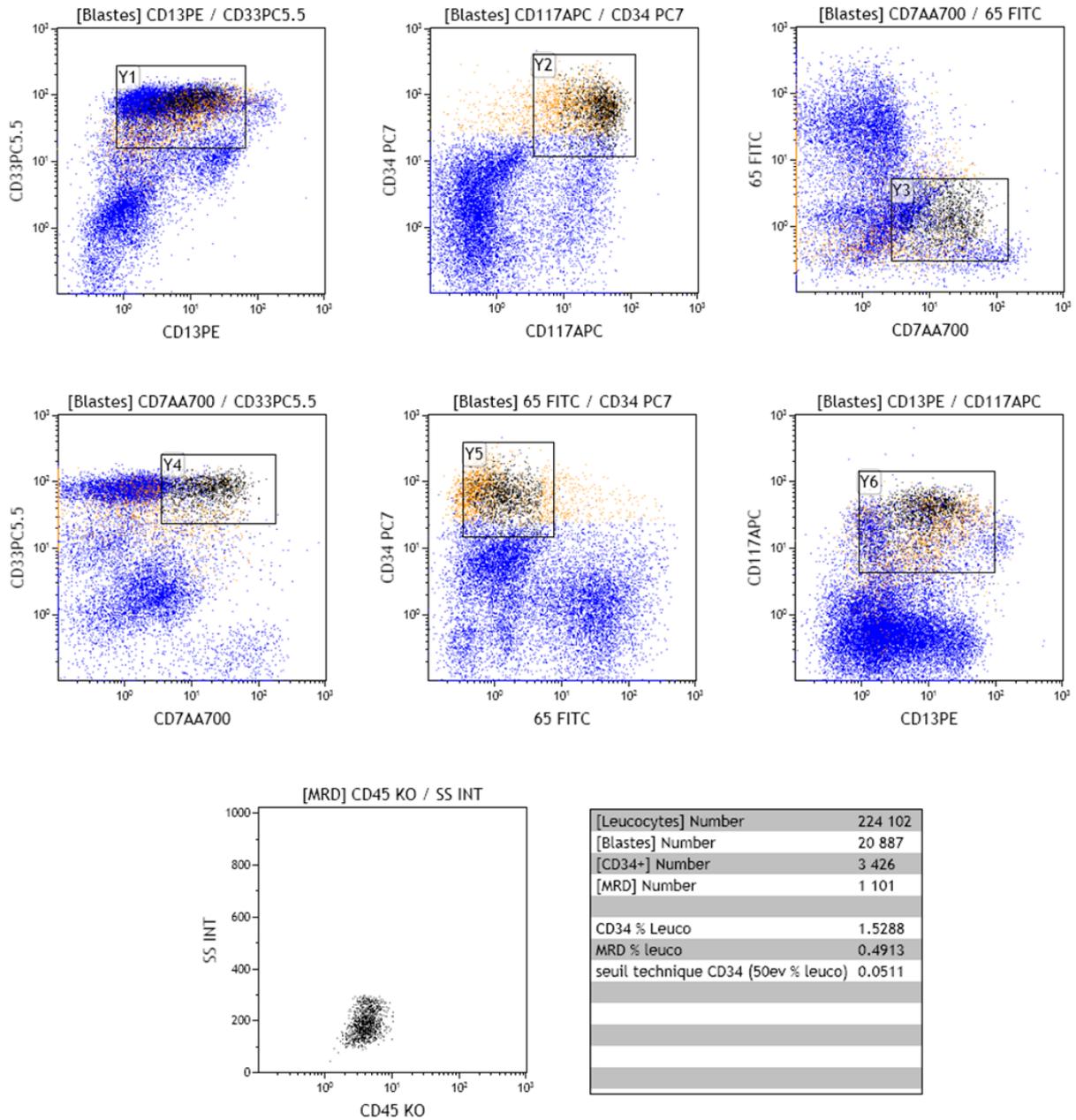


Figure 13 : LAIP « CD34⁺CD117⁺CD33⁺CD13⁺CD7⁺ » lors du suivi chez le patient n°72. Le profil phénotypique des blastes est visualisé sur les mêmes diagrammes qu'au diagnostic. Le masque de fenêtrage réalisé au diagnostic est appliqué sur les cellules étudiées. Les nombre de blastes exprimant le LAIP (« MRD ») est obtenu en combinant les événements « Blastes+Y1+Y2+Y3+Y4+Y5+Y6 » qui sont colorés en noir. Enfin, la quantification des blastes exprimant le LAIP est exprimée en pourcentage du nombre de leucocytes total (ici 0.49%).

vi. Définition des seuils de positivité :

L'évaluation de la MRD passe par le calcul du pourcentage d'événements présentant un phénotype inhabituel parmi les leucocytes totaux.

Les premières études réalisées au sein du laboratoire ont permis de mettre au point des seuils de positivité définis par l'analyse de courbes ROC pour chacun des types de combinaisons antigéniques :

- Infidélité de lignée : seuil de 0.05%
- Asynchronisme : seuil de 0.3%
- Autre : seuil de 0.1%

Depuis 2010-2011, l'analyse est basée sur la comparaison des résultats par rapport à un pool de moelles de « référence ». On utilise pour chaque combinaison antigénique 5 à 9 moelles témoins qui ont été marquées avec le même panel d'anticorps que le prélèvement d'intérêt. Le nombre d'événements obtenus sur les moelles de référence permet de déterminer l'expression normale ou physiologique d'un LAIP donné et de calculer la valeur du seuil de positivité. Le seuil de positivité est alors égal à la moyenne plus 2 écart-types du pourcentage de leucocytes exprimant le LAIP observé dans les moelles de référence.

Pour chacun des prélèvements de l'étude, la MRD-CMF a été considérée comme positive si la quantification d'un des LAIP étudiés était supérieure au seuil de positivité.

2. Biologie moléculaire

i. Isolement cellulaire

A partir des échantillons de sang périphérique et de moelle osseuse prélevés sur tube EDTA, les leucocytes totaux ont été isolés après lyse des hématies par une solution de NH_4Cl . Après numération sur automate, ceux-ci ont été aliquotés de manière à obtenir 10 millions de cellules par tube. Enfin, le culot cellulaire a été conservé à -80°C , en *TRIzol®Reagent* (Invitrogen®, Cergy Pontoise, France).

ii. Extraction des ARN

L'extraction des ARN a été réalisée à partir des échantillons conservés en *TRIzol® Reagent* selon les recommandations du fournisseur. Le dosage des ARN totaux extraits a ensuite été contrôlé sur le spectrophotomètre Nanodrop 2000 (Thermoscientific) et à l'aide du logiciel Nanodrop software (Thermoscientific). Les ARN ont été conservés dans une solution composée d'eau stérile et de *RNAase inhibitor* à -80°C.

iii. Rétrotranscription

La rétrotranscription (RT) a été réalisée à partir d'1µg d'ARN total à l'aide du kit *High Capacity cDNA Archive Kit®* (Applied Biosystems, Foster City, CA) et selon les recommandations du fournisseur. La RT *High Capacity®* emploie une *reverse transcriptase*, la *Multiscribe®* (Applied Biosystems), de grande affinité, qui permet d'améliorer le rendement pour des échantillons d'ARN de faible quantité. Les ADN complémentaires obtenus ont été dilués en eau et conservés à -20°C jusqu'à utilisation. La quantité et la qualité des ADNc obtenus sont évaluées par amplification du gène de référence *ABL1* par RQ-PCR Taqman®.

iv. PCR quantitative en temps réel Taqman®

Principes

La RQ-PCR permet de réaliser une quantification précise des produits de PCR pendant la phase exponentielle du processus d'amplification de PCR, à la différence de la PCR classique en point final.

La RQ-PCR Taqman® utilise une sonde oligonucléotidique doublement marquée avec un fluorochrome en 5'rapporteur (*reporter*) et un fluorochrome en 3'extincteur (*quencher*). La proximité de ces deux fluorochromes sur la sonde empêche l'émission de fluorescence par le rapporteur car celle-ci est atténuée par l'extincteur (principe du FRET).

La sonde oligonucléotidique se lie au produit d'amplification à chaque phase d'appariement de la PCR. Lors de la phase d'extension, la sonde est hydrolysée par la Taq (*Thermus aquaticus*) polymérase qui a une activité 5'exonucléasique, dissociant ainsi les fluorochromes rapporteur et extincteur. Il en résulte une augmentation de la fluorescence du rapporteur proportionnelle au nombre de copies synthétisées lors de chaque cycle de PCR (figure 14 A).

La fluorescence émise à la suite des étapes de dénaturation, hybridation et polymérisation est mesurée à chaque nouveau cycle jusqu'à atteindre un plateau d'intensité de fluorescence.

Afin de permettre une quantification des produits d'amplification, on mesure le *Cycle Threshold* (Ct) qui correspond au nombre de cycles nécessaires pour permettre de différencier le signal de fluorescence du rapporteur du bruit de fond. L'intensité du bruit de fond est représentée par la ligne de base, établie par le logiciel *Sequence Detection System 2.3* (Applied Biosystems) au cours des 15 premiers cycles d'amplification. La ligne seuil est établie automatiquement par le logiciel. Le Ct est défini par le point d'intersection de la courbe cinétique de PCR avec la ligne seuil. Il est directement lié à la quantité de cible initialement présente dans l'échantillon (figure 14B).

Stratégie de quantification

Une gamme standard constituée de dilutions de plasmides (10^6 , 10^5 , 10^3 , 10^2 et 10 copies/ μL) (Ipsogen®, Marseille, France) permet de déterminer le nombre de copies pour chaque gène étudié (figure 14C, D). La quantification du gène de référence *ABL1* (215) permet de normaliser les résultats.

La quantification de l'expression des gènes cibles a été réalisée sur ADNc par RQ-PCR TaqMan® sur *ABI Prism 7900* (Applied Biosystems). L'analyse des données d'amplification était ensuite réalisée à l'aide du logiciel *Sequence Detection System 2.3* (Applied Biosystems).

- Evaluation de l'expression de la mutation de *NPM1* :

Les amorces anti-sens sont spécifiques de la mutation de *NPM1* retrouvée au diagnostic (mutation A, B ou D) tandis que l'amorce sens et la sonde est commune aux différentes mutations (204). Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de référence *ABL1* et exprimés en nombre de copies de *NPM1* muté / 100 copies d'*ABL1* (%).

- Evaluation de l'expression de *WT1*

Les amorces et la sonde qui ont été utilisées sont celles recommandées par l'ELN (207). Les résultats ont été normalisés par rapport au gène de référence *ABL1* et exprimés en nombre de copies de *WT1* / 100 copies d'*ABL1* (%).

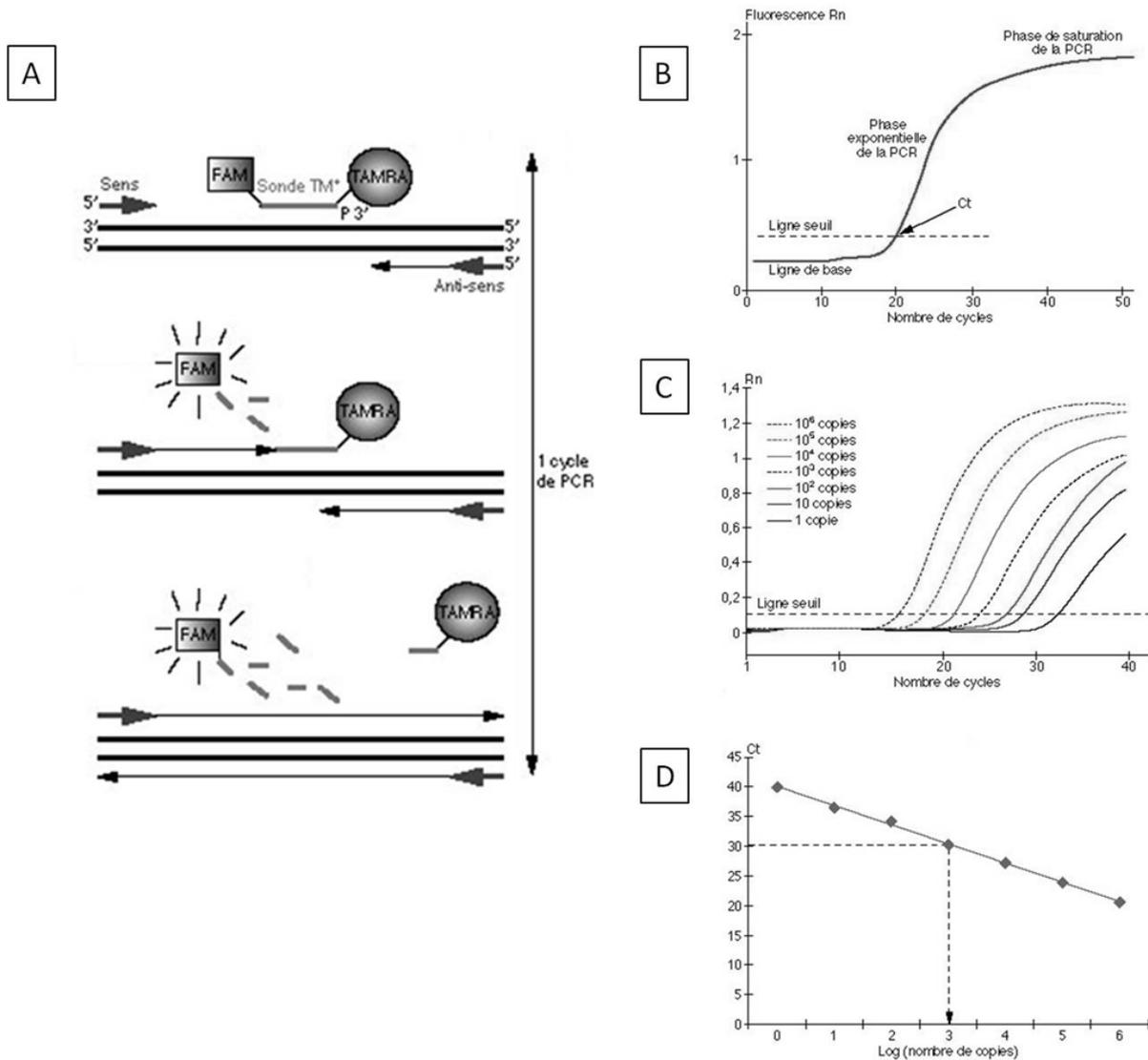


Figure 14 Principe de la RQ-PCR **A** : lors de l'hybridation de la sonde Taqman entre les deux amorces : le *quencher* TAMRA absorbe en grande partie l'énergie du *reporter* FAM. Lors de l'élongation, la sonde est clivée par la Taq polymérase. Le *reporter* émet un signal de fluorescence car libéré de l'effet *quenching*. La synthèse du nouveau brin d'ADN complémentaire est poursuivie. **B** : Cinétique de la réaction de PCR, *Ct* : *cycle threshold*. **C** : Courbes d'amplification obtenues avec la gamme standard. **D** : Relation linéaire existant entre le *Ct* et le nombre de copies de standard. Pour un échantillon donné, la quantité de cible est déduite du *Ct* en se reportant sur la droite D, le calcul étant réalisé par le logiciel de l'automate, d'après (216).

v. Seuils retenus pour analyse des données

Pour WT1, les seuils de positivité étaient ceux retenus par l'ELN (207) :

- Seuil sur moelle osseuse : 2.5 copies *WT1*/100 copies d'*ABL1*
- Seuil sur sang : 0.5 copies *WT1*/100 copies d'*ABL1*

Pour NPM1, un seuil arbitraire de 10 copies *NPM1*/100copies d'*ABL1* sur moelle osseuse et sang périphérique a été retenu.

La MRD BM a été évaluée pour *WT1* (MRD-WT1) et *NPM1* (MRD-NPM1) sur chacun des prélèvements et considérée comme positive en cas de valeur supérieure aux seuils sus-cités.

III. Analyse des données de maladie résiduelle

A partir des données de MRD-CMF et MRD-BM, le statut positif ou négatif de la MRD a été déterminé pour chacun des patients.

Après extraction des données de MRD, nous avons du recourir à une analyse *a posteriori* pour les MRD-CMF pour lesquelles aucune conclusion n'avait été rendue. Cette analyse *a posteriori* a été réalisée en utilisant les seuils de positivité définis par les moelles de référence lorsque cela était possible ou par l'utilisation des seuils définis par l'analyse des courbes ROC.

Aucune analyse *a posteriori* n'a été réalisée concernant les résultats de MRD par technique de biologie moléculaire.

IV. Analyses statistiques

Les variables ont été exprimées en médiane, les valeurs extrêmes sont signifiées entre crochets.

Les données cliniques concernant le suivi des patients ont été actualisées pour la dernière fois en date du 1^{er} décembre 2015. La RFS a été calculée à partir de la date d'obtention de la RC jusqu'à la rechute ou le décès en censurant les patients en vie n'ayant pas rechuté à la date des dernières nouvelles. L'OS a été calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à la date du décès, en censurant les patients en vie à la date des dernières nouvelles. Les analyses de survie ont été réalisées avec et sans censure à la greffe, cette dernière étant définie par une censure des données à partir de la date d'allogreffe pour les patients ayant été allogreffés.

L'OS et la RFS ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier.

L'impact de la MRD a été évalué sur les données de survie (RFS et OS) à l'aide d'un test du Log Rank et accompagné par le Hazard Ratio (HR) ainsi que les intervalles de confiance à 95% (IC95) qui ont été évalués à l'aide d'un modèle de régression à risques proportionnels de Cox. Une analyse avec ajustement a été réalisée en prenant en considération les facteurs confondants suivants: l'âge des patients au diagnostic, la leucocytose initiale, le groupe

pronostique ELN, la présence de localisations extramédullaires au diagnostic ou le statut secondaire de la LAM. Cette analyse a été réalisée à l'aide d'un modèle de régression à risques proportionnels de Cox. Le risque de première espèce a été fixé à 0.05.

L'analyse de concordance des MRD par CMF et BM a été réalisée, à partir des échantillons prélevés à la même date, par l'évaluation du coefficient Kappa (concordance excellente (0.81-1.00), bonne (0.61-0.80), modérée (0.41-0.60), juste (0.21-0.40), légère (0.0-0.20) ou mauvaise (<0) (217)

Les données ont été analysées en utilisant la version du logiciel SAS 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Résultats

I. Descriptions des patients et prélèvements

1. Description de la cohorte

Les caractéristiques cliniques et biologiques des 128 patients de la cohorte et des 111 patients présentant une évaluation précoce de la MRD sont présentées dans le tableau 11.

La population est homogène concernant la répartition des genres. L'âge médian des patients est de 52 ans [16-73] et 30% des patients ont plus de 60 ans. Sur le plan biologique, 36 patients (30%) présentent une leucocytose au diagnostic supérieure à 50G/L et 16 (13%) une hyperleucocytose dépassant 100G/L.

On retrouve chez 17 patients une localisation extramédullaire au diagnostic. Les localisations retrouvées sont une hypertrophie gingivale (7), un envahissement des organes hématopoïétiques secondaires (7), un envahissement neuroméningé (3), cutané (2), mammaire (1) ou pleural (1).

10 patients (8%) présentent une LAM secondaire (5 patients ont une t-LAM, 4 une s-LAM et le diagnostic de mutation constitutionnelle de *RUNX1* a été porté chez une patiente).

Concernant l'aspect cytologique, la plupart des LAM sont myéloblastiques (LAM1 ou 2 : 55%) ou à composante monocytaire (LAM 4 ou 5 : 39%). La majorité des LAM appartient au groupe des LAM avec anomalies génétiques récurrentes. On dénombre notamment 9 patients présentant une t(8;21), 11 une inv(16) ou une t(16;16) et 33 patients ont une mutation de *NPM1* au diagnostic. Parmi ces 33 patients, 31 ont un caryotype normal et 13 patients ont une mutation de type *FLT3-ITD*.

Environ la moitié des patients a un caryotype normal. Un caryotype complexe, hors translocation de bon pronostic, est retrouvé chez seulement 9 patients. Enfin, 4 patients présentent un caryotype monosomal.

Selon les critères de l'ELN, plus d'un tiers des patients de l'étude présente au diagnostic une anomalie de pronostic favorable tandis que seulement 15% des patients sont classés dans la catégorie défavorable.

Les patients ayant au moins un LAIP au diagnostic représentent 75% de la cohorte. Une expression supérieure à la normale de *WT1* est retrouvée chez 79% des patients.

Le traitement a été débuté (en médiane) 4 jours [0-32] après le diagnostic. Pour la majorité des patients (126), la chimiothérapie d'induction était composée d'anthracycline et d'aracytine en association. 109 patients ont été inclus ou traités selon les protocoles thérapeutiques de l'ALFA (CBF 2006, ALFA 9801, 9802, 9803, 0701, 0702, 1200). Les deux patients n'ayant pas reçu cette chimiothérapie ont reçu de l'aracytine haute dose seule ou de l'aracytine haute-dose associée à l'azacytidine.

60 patients ont été allogreffés (35 patients en 1^{ère} ligne thérapeutique et 25 patients après avoir rechuté). Le temps médian jusqu'à allogreffe était de 5 mois [0-48].

| | Cohorte totale N=128 | Cohorte « MRD précoce » N=111 |
|---|-------------------------|----------------------------------|
| Caractéristiques des patients au diagnostic | | |
| Age (années), m [extrêmes] | 52 [16-73] | 52 [16-73] |
| Genre (F/H) | 65/63 | 58/53 |
| Biologie, m [extrêmes] | | |
| Hémoglobine (g/dL) | 8,8 [2,7-15,4] | 8,9 [2,7-15,4] |
| Plaquettes (G/L) | 59 [5-611] | 57 [5-611] |
| Leucocytes (G/L) | 16 [0,7-325] | 18 [0,7-325] |
| Blastes circulants (G/L) | 5,5 [0-312] | 6,5 [0-312] |
| Localisations extra médullaires | 17 (13%) | 16 (14%) |
| Caractéristiques de la maladie au diagnostic | | |
| LAM secondaire | 9 (7%) | 9 (8%) |
| Classification FAB | N=116 | N=100 |
| LAM 0 | 4 (3%) | 4 (4%) |
| LAM 1 | 18 (16%) | 17 (17%) |
| LAM 2 | 45 (39%) | 40 (40%) |
| LAM 4 | 26 (22%) | 21 (21%) |
| LAM 5 | 20 (17%) | 16 (16%) |
| LAM 6 | 3 (3%) | 2 (2%) |
| Classification OMS 2008 | N=125 | N=108 |
| Avec anomalies génétiques récurrentes | 66 (53%) | 60 (56%) |
| Avec anomalies associées aux myélodysplasies | 18 (14%) | 14 (13%) |
| Induite par un traitement | 5 (4%) | 5 (5%) |
| Sans spécificité | 36 (29%) | 29 (27%) |
| Classification pronostique selon l'ELN | N=124 | N=107 |
| Favorable | 45 (36%) | 41 (38%) |
| Intermédiaire I | 34 (27%) | 29 (27%) |
| Intermédiaire II | 27 (22%) | 22 (21%) |
| Défavorable | 18 (15%) | 15 (14%) |
| t(8;21) | 9 (7%) | 9 (8%) |
| Inv(16) ou t(16;16) | 11 (9%) | 8 (7%) |
| Mutation NPM1 | 33 (26%) | 31 (28%) |
| Expression WT1 (> normale) | 101 (79%) | 101 (91%) |
| LAIP | 96 (75%) | 89 (80%) |
| Eléments de la prise en charge | | |
| Allogreffe de moelle osseuse | 60 (47%) | 51 (46%) |
| 1ère ligne/2ème ligne | 35/25 | 30/21 |
| MAC/RIC | 44/16 | 39/12 |
| phéno/géno/haplo identité | 39/20/1 | 32/18/1 |

Tableau 11 : Caractéristiques cliniques et biologiques de la cohorte étudiée et des patients ayant une évaluation précoce de la MRD. F : femme, H : homme, m : médiane, FAB : French American British, OMS : Organisation mondiale de la Santé, LAIP : Immunophénotype associé à la leucémie, MAC : conditionnement myeloablatif, RIC : conditionnement d'intensité réduite.

2. Description des prélèvements

Au total, 111 patients en RC ont bénéficié d'une évaluation précoce de la MRD entre la fin d'induction et la 1^{ère} cure de consolidation. Cela représente 227 analyses de MRD.

L'évaluation de la MRD précoce a été réalisée en médiane à 42 jours [22-125] après initiation de la chimiothérapie d'induction. 75 patients ont été évalués par MRD-CMF, 84 par MRD-BM. On note que 27 des 111 patients (24%) n'avaient qu'une évaluation de la MRD par CMF.

Le tableau 12 reprend le nombre de prélèvements positifs aux seuils définis selon les techniques utilisées et le type d'échantillon analysé.

| Méthode de suivi | N | Prélèvements positifs | Prélèvements négatifs |
|--|-----|-----------------------|-----------------------|
| CMF et/ou BM | 111 | 32 | 79 |
| CMF | 75 | 21 | 54 |
| BM (sur <i>WT1</i> et/ou <i>NPM1</i>) | 84 | 19 | 65 |
| <i>WT1</i> (moelle osseuse ou sang) | 84 | 18 | 66 |
| <i>WT1</i> (moelle osseuse) | 79 | 11 | 68 |
| <i>WT1</i> (sang) | 38 | 8 | 30 |
| <i>NPM1</i> (moelle osseuse ou sang) | 26 | 3 | 23 |
| <i>NPM1</i> (moelle osseuse) | 25 | 2 | 23 |
| <i>NPM1</i> (sang) | 13 | 1 | 12 |

Tableau 12 : Résultats de MRD selon la technique utilisée. *CMF* : cytométrie en flux, *BM* : biologie moléculaire (RQ-PCR).

3. Données de survie de la cohorte :

Le suivi médian de la cohorte totale est de 37 mois [2-119]. Concernant les 72 patients en vie à la date de recueil, il est de 53 mois [18-119]. En censurant les données à la greffe, le suivi médian de la cohorte n'est que de 13 mois [2-116].

Au cours du suivi, 56 patients sont décédés. L'OS à 3 ans est de 60.7% [IC 95 : 52.0-69.3] (figure 15). En censurant les données à la greffe, la survie à 3 ans est de 67.6% [IC95 : 57.0-78.1].

65 patients ont rechuté au cours du suivi. La RFS à 3 ans est de 47.3% [IC95 : 38.0-56.5] (figure 16) et 42.4% [IC95 : 31.8-52.9] en censurant les données à la greffe.

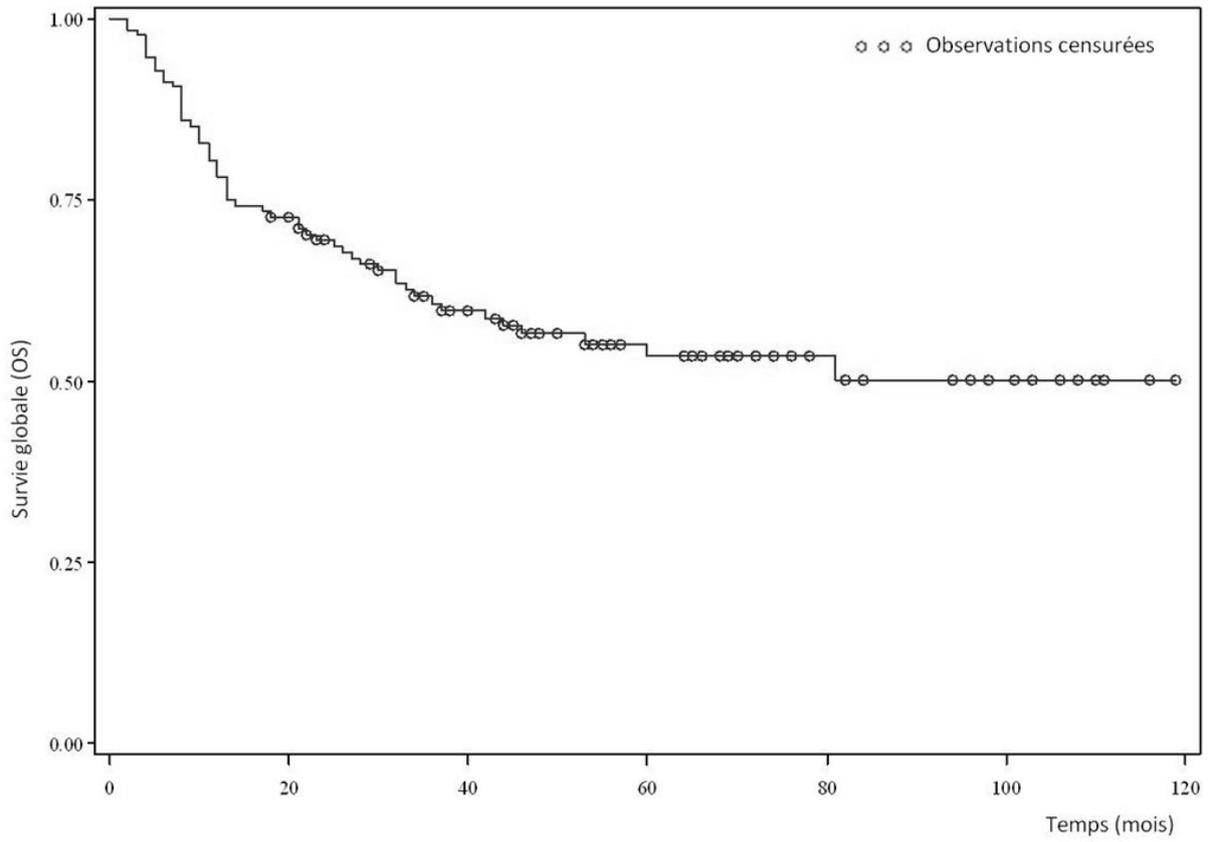


Figure 15 : Survie globale de la cohorte étudiée. Données non censurées à la greffe.

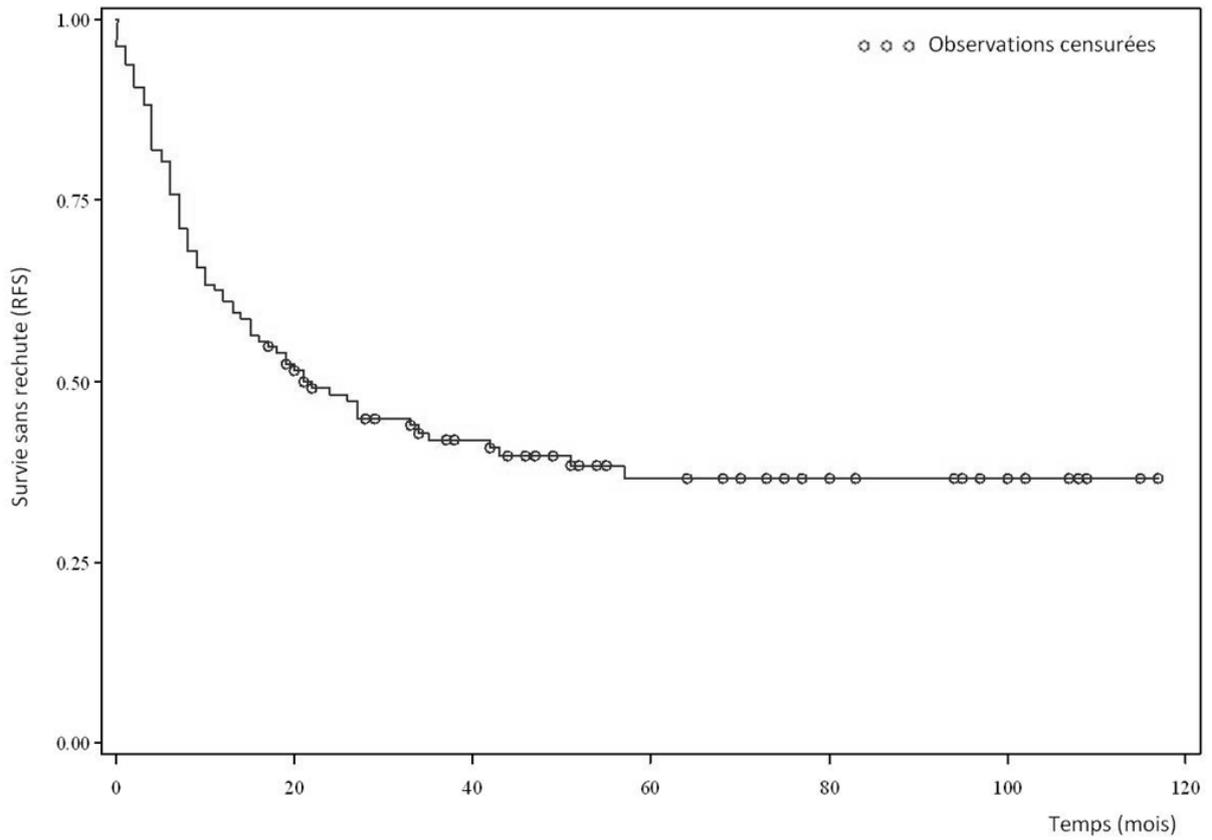


Figure 16 : Survie sans rechute de la cohorte étudiée. Données non censurées à la greffe.

II. Impact pronostique de l'évaluation précoce de la maladie résiduelle par cytométrie en flux et biologie moléculaire

1. Analyse univariée

i. Impact de la MRD sur la RFS

MRD par CMF et/ou BM

Parmi les patients présentant une MRD précoce positive (n=32), 23 ont rechuté ou sont décédés. Le temps médian jusqu'à événement est de 5 mois [0-21]. 19 patients ont présenté une rechute ou un décès dans l'année suivant la première RC. Chez les patients présentant une MRD négative (n=79), 42 ont rechuté ou sont décédés en médiane à 9.5 mois [0-57] et 23 dans l'année suivant la première RC. L'impact de la MRD précoce est significatif sur la RFS (HR : 2,049, IC95 : 1,226-3,423, p=0.0045) (figure 17). Les résultats restent significatifs en censurant les données à la greffe.

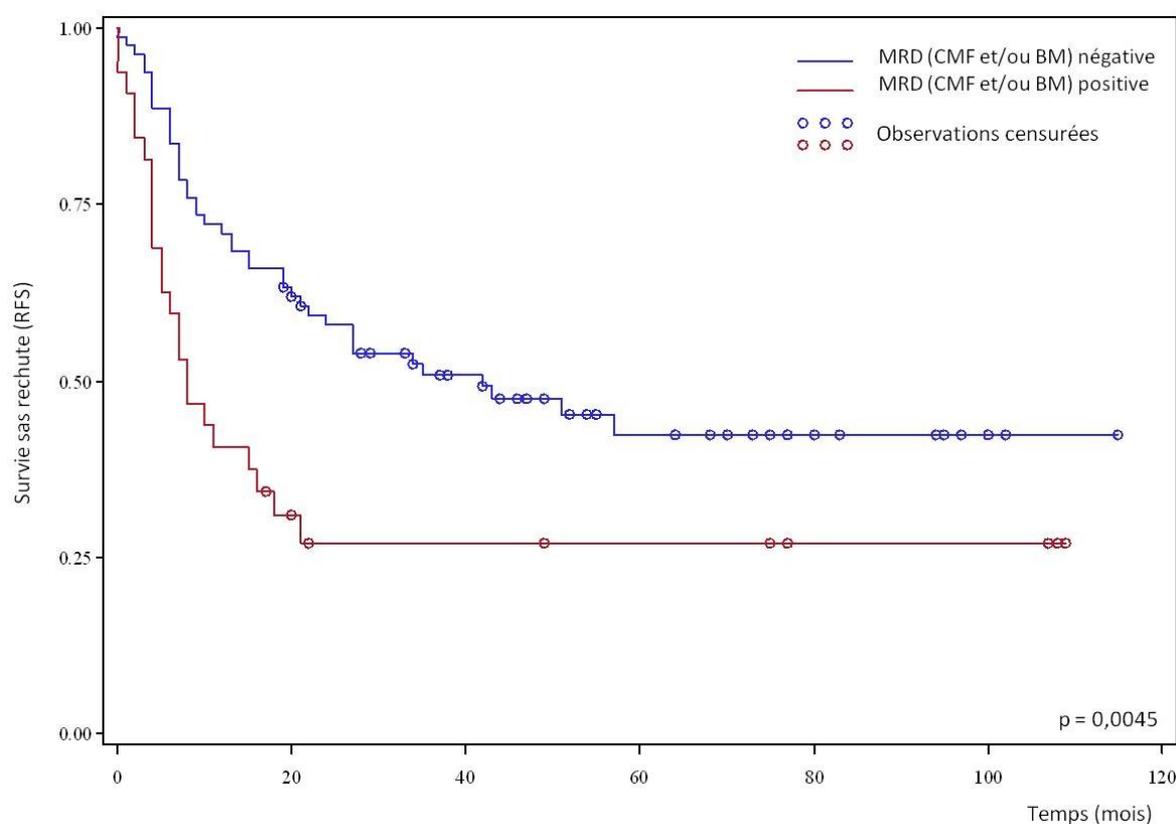


Figure 17 : Survie sans rechute en fonction du statut de la MRD globale (CMF et/ou BM). Données non censurées à la greffe.

MRD par BM

Parmi les patients ayant un suivi de la MRD par BM, 15 des 19 patients avec MRD positive ont présenté une rechute ou un décès au cours du suivi (13 dans l'année du diagnostic) contre 36 des 65 patients avec MRD négative. Pour les groupes avec MRD positive et négative, la RFS est significativement différente (HR : 2,79, IC95 : 1,510-5,154, p=0.0005) (figure 18) en prenant ou non en compte la censure à la greffe.

Sur les 26 patients suivis pour *NPM1*, les 3 patients présentant une MRD positive (avec un seuil de 10 copies de *NPM1* muté sur 100 copies d'*ABL1*) ont rechuté dans l'année. 11 des 23 patients avec une MRD-*NPM1* négative ont présenté une rechute ou un décès au cours du suivi.

D'autre part, parmi les patients suivis sur *WT1*, 14 sur 18 ayant une MRD positive ont présenté une rechute ou un décès. Parmi les 66 patients avec une MRD-*WT1* négative, 37 ont présenté un une rechute ou un décès. Pour les patients suivis uniquement sur l'expression de *WT1*, la RFS est significativement différente selon le statut de la MRD précoce (HR : 2,601, IC95 : 1,392-4,858, p= 0,0016) (figure 19). La significativité de ce résultat est retrouvé sur l'analyse avec censure à la greffe.

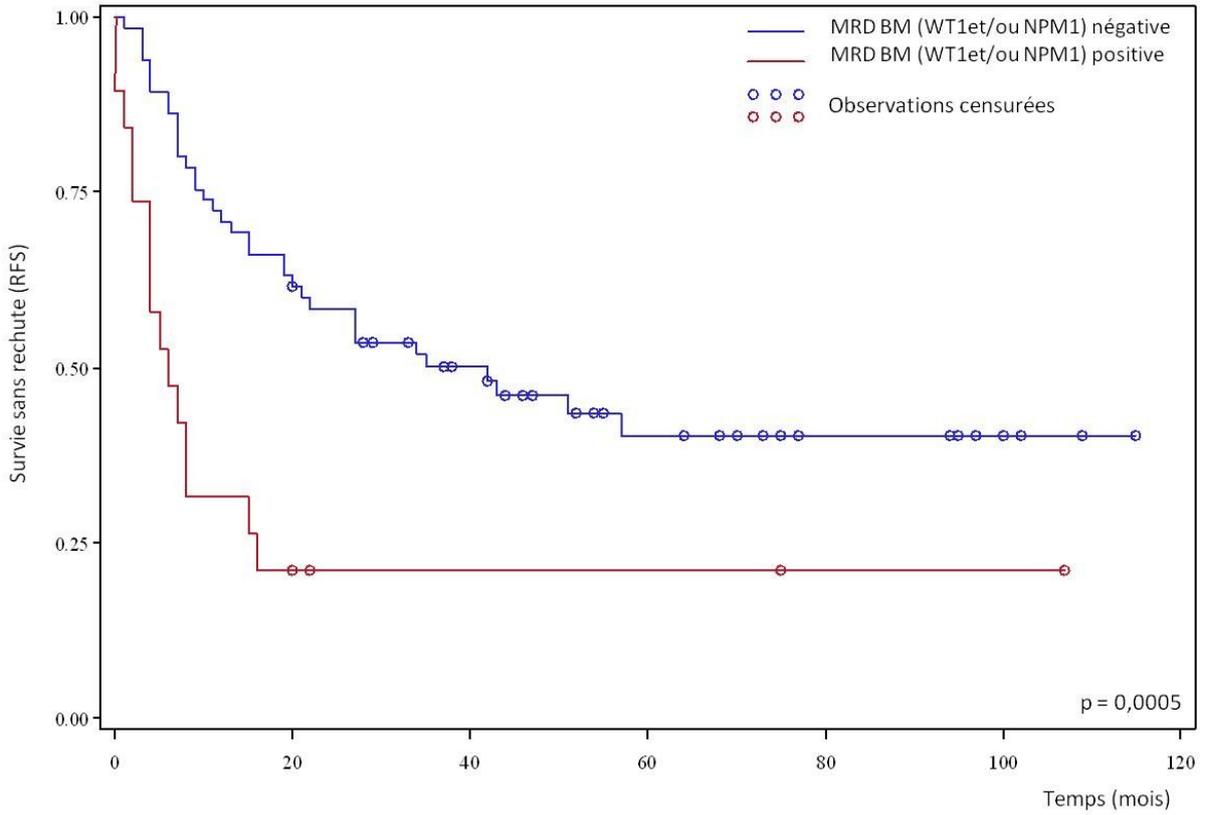


Figure 18 : Survie sans rechute en fonction du statut de la MRD-BM (*WT1* et/ou *NPM1*). Données non censurées à la greffe.

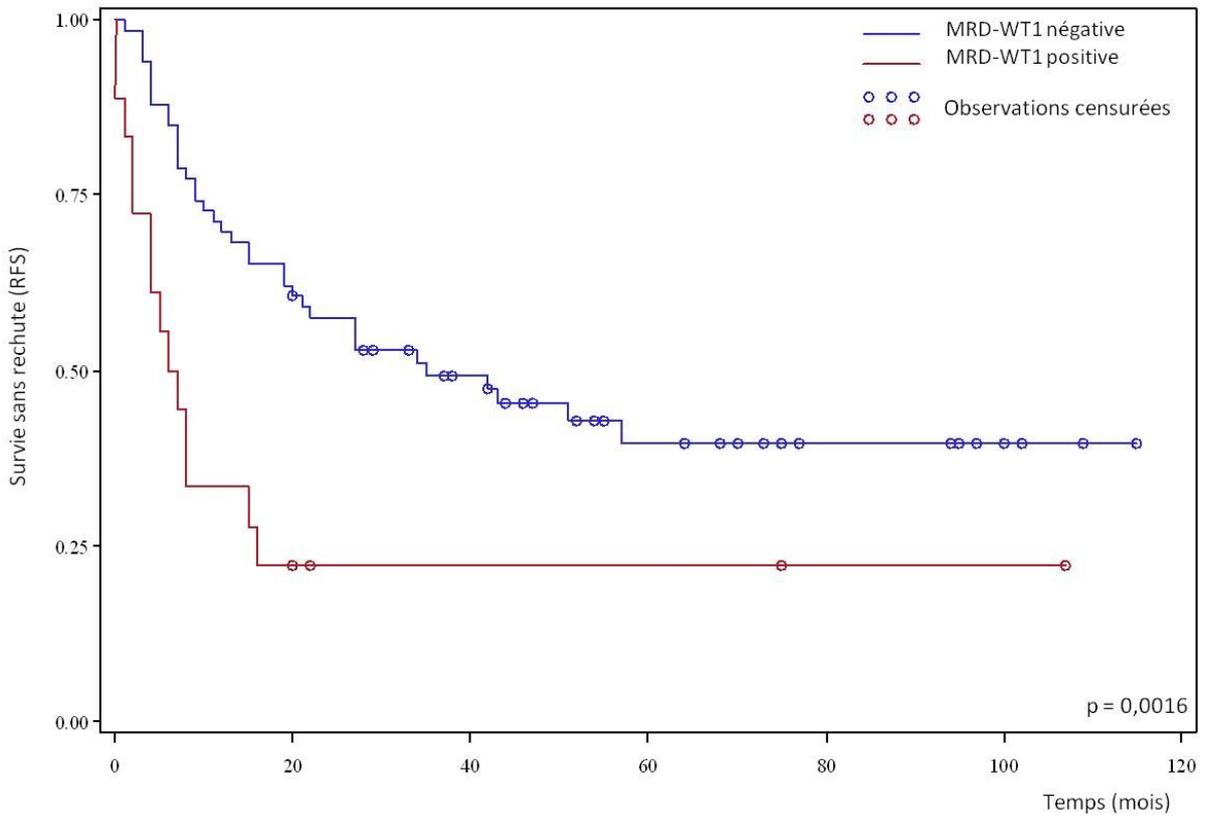


Figure 19 : Survie sans rechute en fonction du statut de la MRD-WT1. Données non censurées à la greffe.

MRD par CMF

Sur les 75 patients ayant bénéficié d'un suivi par CMF, 44 ont rechuté ou sont décédés (dont 15 parmi les 21 patients présentant une MRD positive et 29 parmi les 54 patients ayant une MRD négative). La MRD-CMF a une tendance à un impact significatif sur la RFS (HR : 1,691, IC95 : 0,904-3,163, $p=0.0894$) (figure 20). En censurant les patients à la greffe, on observe cependant une différence significative ($p=0.0494$).

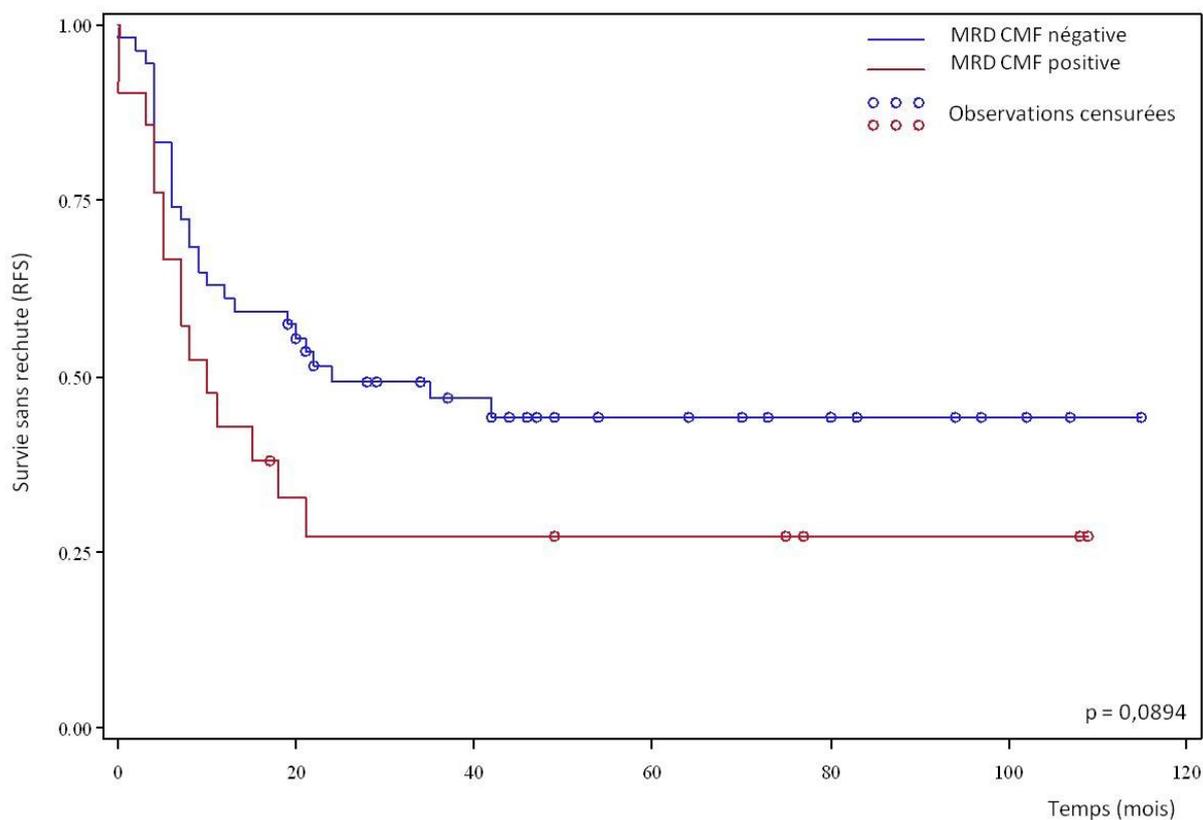


Figure 20 : Survie sans rechute en fonction du statut de la MRD-CMF. Données non censurées à la greffe.

ii. Impact de la MRD sur l'OS

MRD par CMF et/ou BM

Parmi les 111 patients ayant une évaluation précoce de la MRD (par CMF et/ou BM), 48 sont décédés au cours du suivi. Le taux de décès parmi les patients ayant une MRD précoce positive est de 59%, tandis qu'il est de 37% chez les patients présentant une MRD négative. A 3 ans, l'OS est estimée à 67.6% [IC95 : 58,8-79%] et 40.5% [IC95 : 26-63.2%] dans les groupes avec MRD négative et positive, respectivement ($p=0.02$) (figure 21). Cette différence est retrouvée dans les analyses censurées à la greffe ($p=0.029$).

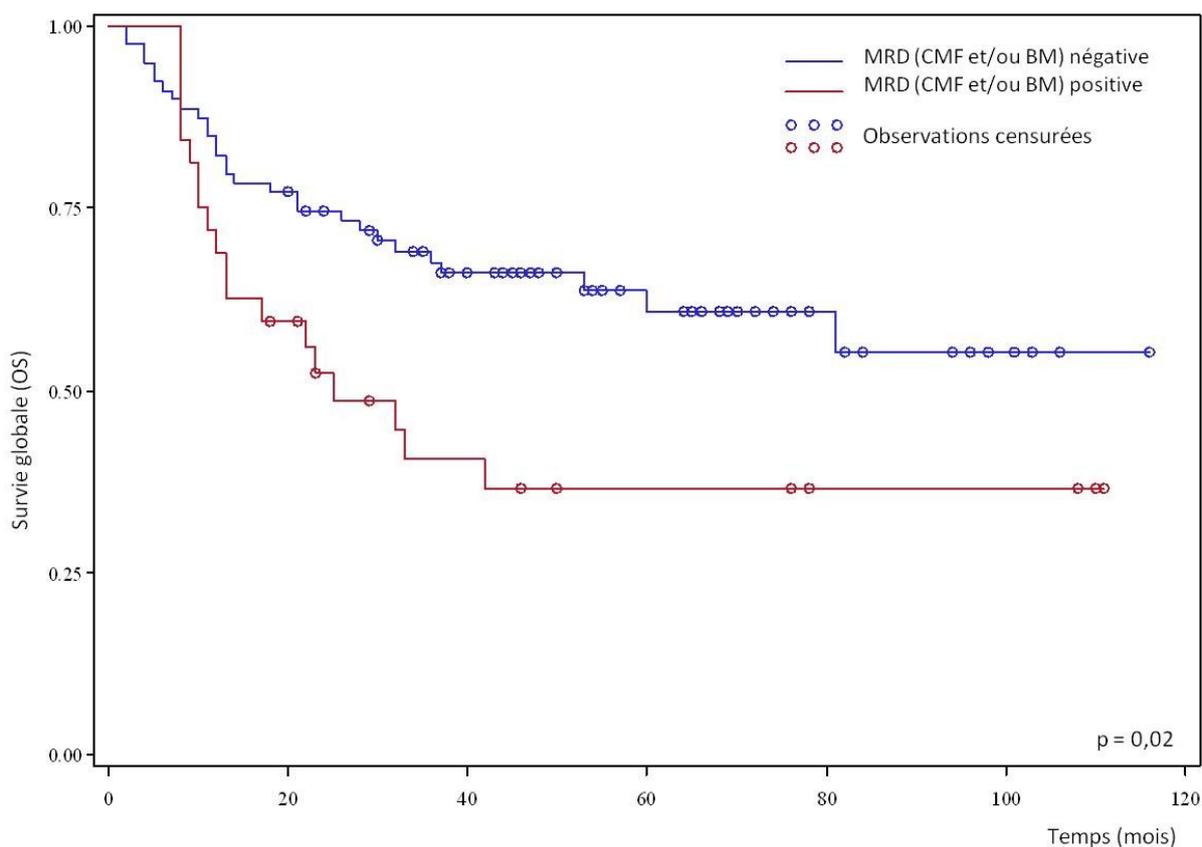


Figure 21 : Survie globale en fonction du statut de la MRD (CMF et/ou BM). Données non censurées à la greffe.

MRD par BM

On observe une différence significative d'OS selon le statut de la MRD-BM (HR : 2,734, IC95 : 1,373-5,446, $p= 0,0027$). A 3 ans, elle est estimée à 68.8% [IC95 : 58.3-81.2%] et 34.5% [IC95 : 18-66.1%] dans les groupes avec MRD négative et positive, respectivement (figure 22). Cette différence est retrouvée dans les analyses censurées à la greffe ($p=0.004$).

Sur les 26 patients suivis pour *NPM1*, les 3 patients présentant une MRD positive sont décédés dans l'année contre 5 des 23 patients avec une MRD-*NPM1* négative.

Concernant les patients suivis sur le marqueur *WT1*, 12 des 18 patients présentant une MRD positive sont décédés au cours du suivi contre 25 des 66 patients qui avaient une MRD négative. Cette différence de survie est également statistiquement significative avec ou sans censure à la greffe (HR : 2,476, IC95 : 1,229-4,989, $p=0.0081$) (figure 23).

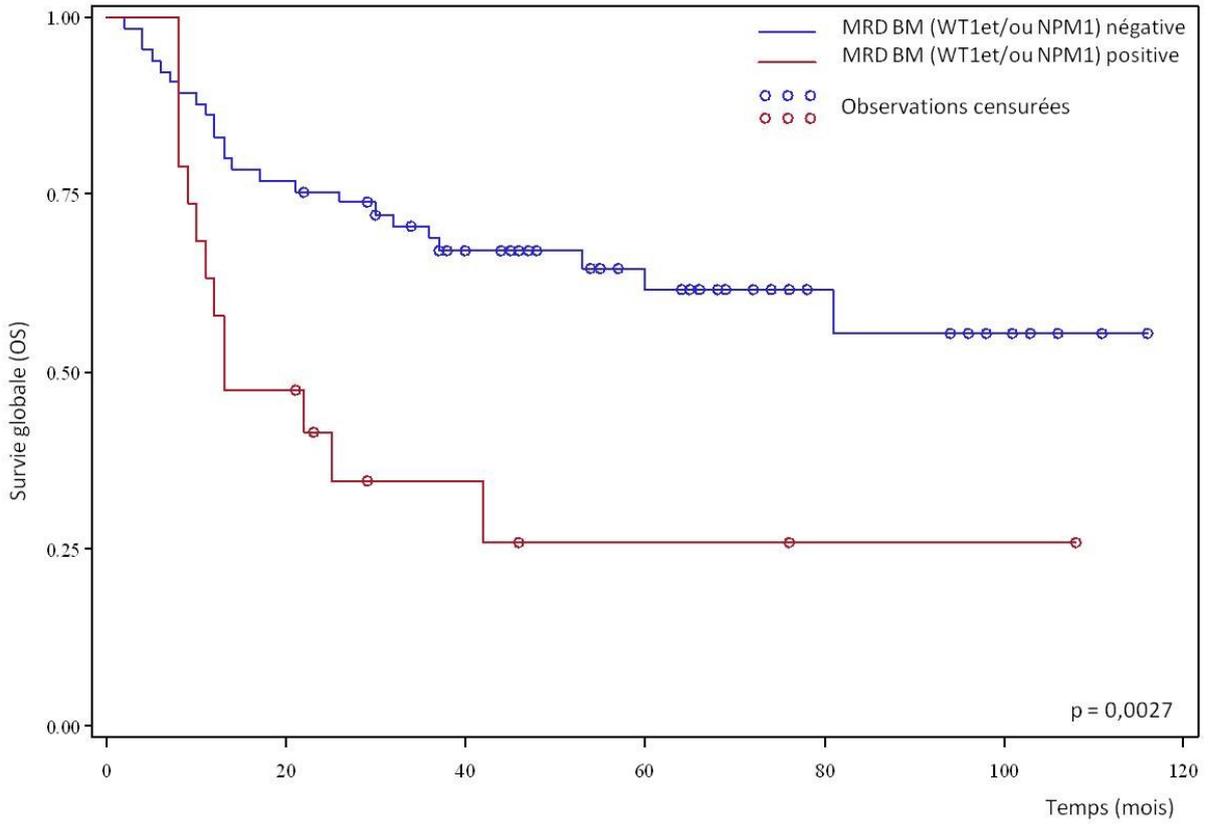


Figure 22 : Survie globale en fonction du statut de la MRD-BM (*WT1* et/ou *NPM1*). Données non censurées à la greffe

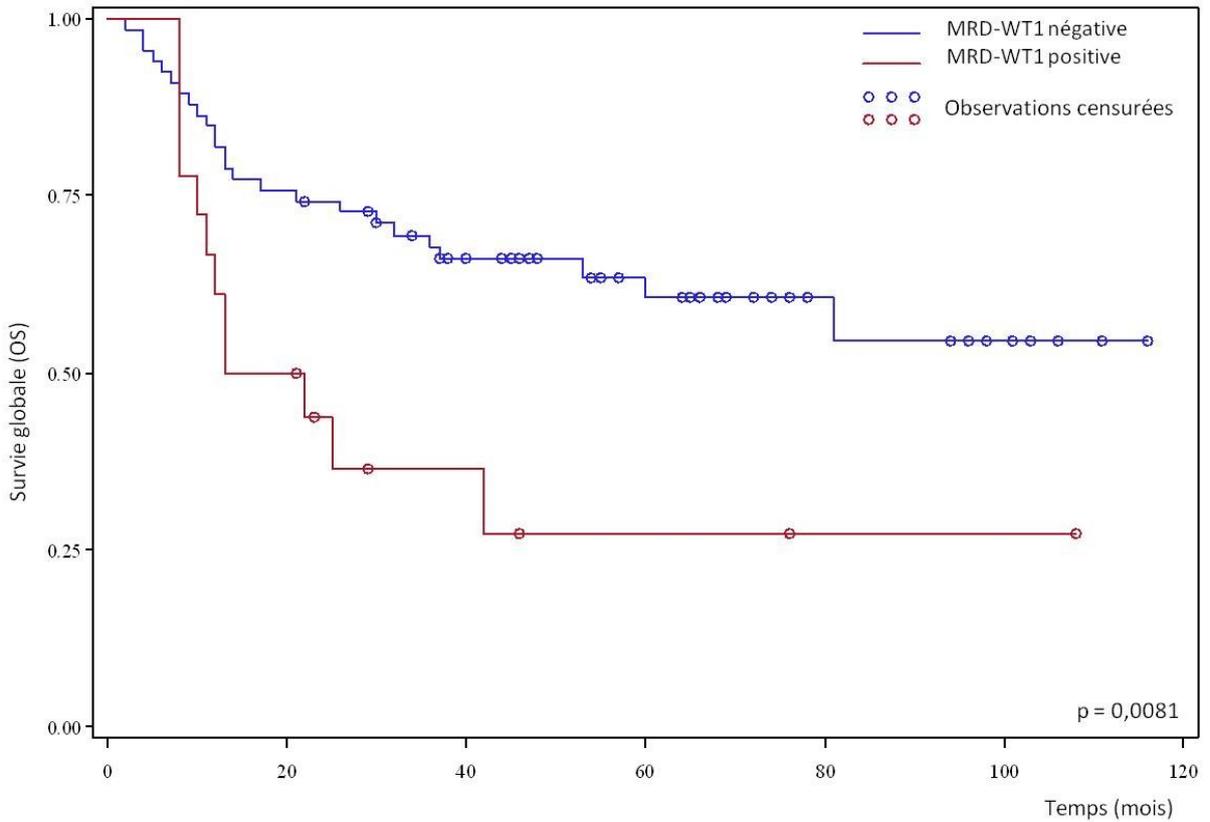


Figure 23 : Survie globale en fonction du statut de la MRD-WT1. Données non censurées à la greffe.

MRD par CMF

Concernant les patients présentant un suivi par CMF, il n'existe pas de différence significative de survie entre patients positifs ou négatifs (HR : 1,269, IC95 : 0,615-2,618, $p=0.515$), sur les données censurées à la greffe (figure 24) ou non.

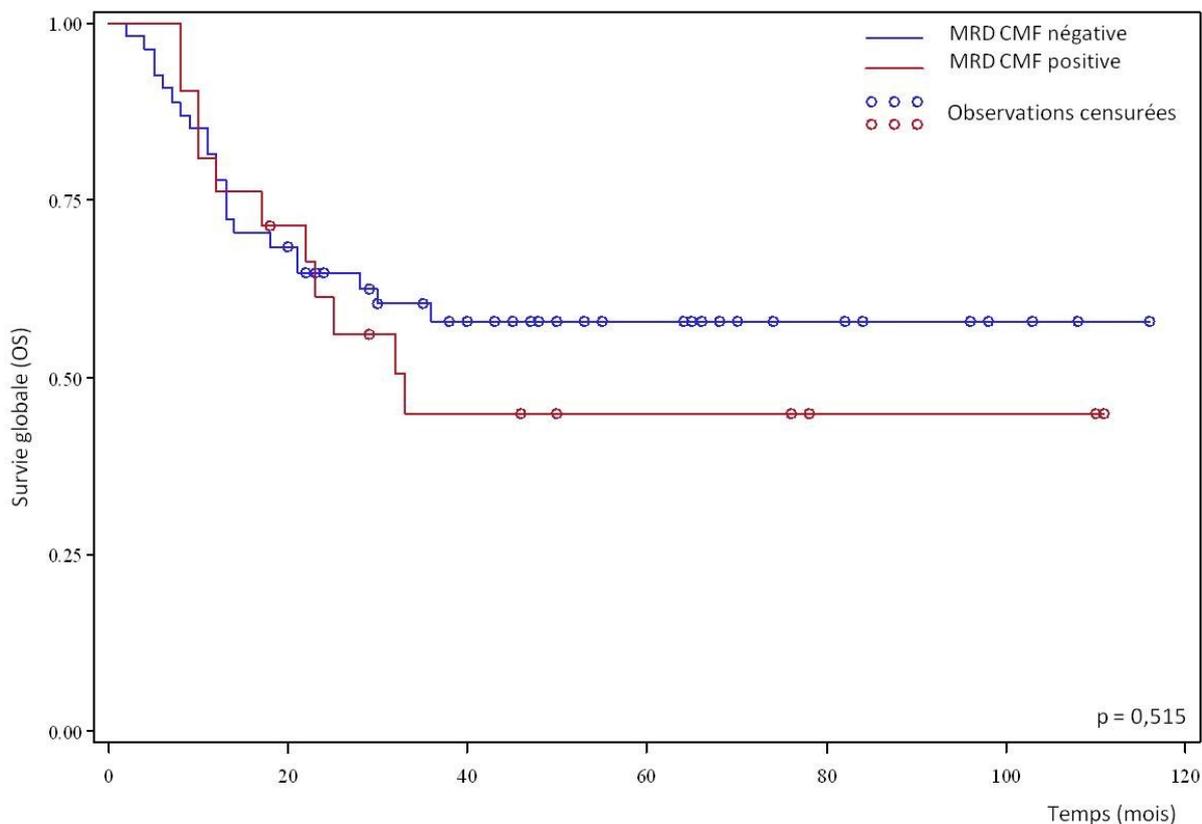


Figure 24 : Survie globale en fonction du statut de la MRD-CMF. Données non censurées à la greffe

2. Analyse après ajustement

Un ajustement a été réalisé sur les potentiels facteurs pronostiques confondants : l'âge au diagnostic, la leucocytose, le groupe pronostique ELN, la présence de localisation extra-médullaire au diagnostic, le caractère secondaire de la LAM.

Après ajustement, on retrouve un impact indépendant de la MRD évaluée par CMF et/ou BM sur la RFS ainsi qu'un impact pronostique indépendant de la MRD-BM et de la MRD-WT1. Seule la MRD-BM présente un caractère pronostique indépendant sur l'OS (tableau 13).

En censurant les données à la greffe, l'impact pronostique des MRD BM et/ou CMF, MRD-BM et MRD-WT1 est retrouvé de manière indépendante sur la RFS. La MRD globale ainsi que la MRD-BM sont des facteurs pronostiques indépendants de la survie (tableau 14).

| | RFS avec ajustement | | | OS avec ajustement | | |
|-------------------------|---------------------|-------------|---------------|--------------------|-------------|---------------|
| | HR | IC 95 | p | HR | IC 95 | p |
| MRD BM et/ou CMF | 2,347 | 1,346-4,093 | 0,0026 | 1,857 | 0,963-3,582 | 0,0648 |
| MRD-BM | 2,953 | 1,530-5,701 | 0,0013 | 2,196 | 1,006-4,795 | 0,0483 |
| <i>MRD-WT1</i> | 2,772 | 1,421-5,404 | 0,0028 | 1,961 | 0,882-4,360 | 0,0984 |
| MRD-CMF | 1,725 | 0,866-3,437 | 0,1211 | 0,974 | 0,416-2,279 | 0,9507 |

Tableau 13 : Impact de la MRD précoce selon la technique utilisée après ajustement (données non censurées à la greffe). Ajustement réalisé sur l'âge au diagnostic, la leucocytose, le groupe pronostique ELN, la présence de localisation extramédullaire au diagnostic, et le statut secondaire de la LAM. HR : Hazard Ratio, IC95 : intervalle de confiance à 95%. CMF : cytométrie en flux, BM : biologie moléculaire (RQ-PCR)

| | RFS avec ajustement | | | OS avec ajustement | | |
|-------------------------|---------------------|--------------|-------------------|--------------------|---------------------|---------------|
| | HR | IC 95 | p | HR | IC 95 | p |
| MRD BM et/ou CMF | 3,759 | 1,997-7,075 | <0,0001 | 3,049 | 1,287-7,226 | 0,0113 |
| MRD-BM | 5,01 | 2,317-10,832 | <0,0001 | 3,547 | 1,207-10,426 | 0,0214 |
| <i>MRD-WT1</i> | 4,639 | 2,145-10,034 | <0,0001 | 2,864 | 0,963-8,518 | 0,0584 |
| MRD-CMF | 2,146 | 0,960-4,799 | 0,063 | 1,337 | 0,383-4,666 | 0,6485 |

Tableau 14 : Impact de la MRD précoce selon la technique utilisée après ajustement (données censurées à la greffe). Ajustement réalisé sur l'âge au diagnostic, la leucocytose, le groupe pronostique ELN, la présence de localisation extramédullaire au diagnostic, et le caractère secondaire de la LAM. HR : Hazard Ratio, IC95 : intervalle de confiance à 95%. CMF : cytométrie en flux, BM : biologie moléculaire (RQ-PCR)

III. Etude de la concordance entre les résultats de cytométrie en flux et de biologie moléculaire

1. Concordance des résultats de MRD par CMF et BM

La concordance des résultats obtenus en CMF et BM a été analysée sur 42 prélèvements réalisés à la même date (tableau 15).

| | BM négative | BM positive |
|--------------|--------------------|------------------|
| CMF négative | 26 (rechutes = 10) | 5 (rechutes = 3) |
| CMF positive | 4 (rechutes = 3) | 7 (rechutes = 6) |

Tableau 15 : Prélèvements de maladie résiduelle positifs et négatifs selon les techniques de cytométrie en flux et biologie moléculaire. Les rechutes dans chaque groupe sont données à titre indicatif.

33 prélèvements sur 42 aboutissent à une conclusion identique. On retrouve une discordance pour 9 des 42 patients que nous détaillons par la suite. Le coefficient de concordance Kappa est de 0.46.

Concernant l'évaluation de MRD sur l'expression de *WT1*, on retrouve une concordance avec la MRD-CMF pour 34 patients (27 avec une MRD négative et 7 avec une MRD positive) et une discordance pour 8 patients. Le coefficient de corrélation Kappa est alors de 0.51.

Concernant l'évaluation de la MRD sur *NPM1* (N=10), 8 patients sont négatifs selon les deux méthodes et 2 patients ont une MRD-NPM1 positive alors qu'elle est négative en CMF.

2. Etude des discordances

i. Patients présentant une MRD positive par CMF et négative en BM

Les discordances sont reprises dans le tableau 16.

Patient n°12

Chez cette patiente, un diagnostic de LAM 4 selon la classification FAB, non hyperleucocytaire a été posé en 2005. L'immunophénotypage retrouvait des LAIP de type asynchronisme ($CD34^+CD14^-CD65^+$ et $CD34^+CD33^+CD15^+$) exprimés par plus de 10% des leucocytes totaux au diagnostic. Le caryotype était complexe et monosomal avec un réarrangement de *KMT2A (MLL)* retrouvé en FISH. Sur le plan moléculaire, la patiente présentait une mutation monoallélique de *CEBPA* et une surexpression de *WT1* supérieure à 10 fois la normale. La patiente a reçu deux cures d'induction afin d'obtenir une RC. Elle n'a pas rechuté au cours du suivi.

En post-induction 2, la quantification des LAIP par CMF était supérieure au seuil de positivité alors que la MRD médullaire *WT1* était négative. Secondairement, les LAIP se négativaient en pré-greffe.

L'analyse des LAIP en post-induction 2 a été relue en utilisant des seuils de positivité déterminés à partir de l'étude des moelles de référence (technique non utilisée à l'époque du résultat initial), l'expression des LAIP est alors inférieure aux seuils de positivité.

D'autre part, la réanalyse des prélèvements de ce patient a mis en évidence un LAIP non utilisé en 2005 : $CD34^+CD38^-$, qui est exprimé sur plus de 10% des leucocytes au diagnostic et dévient inférieur au seuil défini par les moelles de référence en post-induction 2.

Patient n°17

Cette patiente présentait une LAM non hyperleucocytaire au diagnostic avec mutation constitutionnelle de *RUNX1*. Le caryotype retrouvait une trisomie 21, non constitutionnelle. Il existait une mutation ainsi qu'une surexpression de *WT1* inférieure à dix fois la normale. Les LAIP retrouvés au diagnostic étaient : $CD34^+CD117^+CD7^+$, $CD34^+CD33^{int}CD7^+$ et $CD34^+HLA-DR^+CD7^+$.

En post-induction 2, la MRD était négative en BM et positive en CMF. La patiente a rechuté dans la première année de suivi.

Là encore, après relecture des prélèvements, à ce point de suivi, avec des seuils définis à partir des moelles de référence, la MRD-CMF n'est pas retrouvée positive.

Un autre LAIP a été retrouvé sur environ 6% des leucocytes au diagnostic. Il est plus spécifique ($CD34^+CD13^{++}CD33^+CD117^+CD7^+$) et est négatif en post-induction 2.

Patient n°29

Ce patient présentait une LAM4Eo selon la classification FAB associée à une leucocytose à 55G/L au diagnostic. Une inv(16) était retrouvée au caryotype. En plus du transcrit de fusion CBF β -MYH11, il existait une surexpression de *WT1* (à plus de 10 fois la normale). Les LAIP retrouvés au diagnostic chez ce patient étaient de type asynchronisme ($CD34^+CD117^+CD65^+$, $CD34^+CD33^+CD15^+$ et $CD34^+CD117^+CD11b^+$).

En post-induction, l'expression médullaire de *WT1* était inférieure aux limites de la normale, tandis que la MRD par CMF était positive. Le patient rechute à 13 mois du diagnostic.

Après relecture, la MRD-CMF est inférieure aux seuils de positivité actuelle.

De nouveau, un autre LAIP a été mis en évidence au diagnostic. Il s'agit d'un phénotype $CD34^+CD38^-CD19^-CD10^-$. Il est retrouvé sur 20 % des leucocytes dont 50% des blastes. Il est négatif en post-induction et présent sur 3.5% des leucocytes à la rechute. D'autre part, le transcrit de fusion CBF β -MYH11 présente une décroissance en post-induction de 2log par rapport à son expression au diagnostic.

Patient n°109

Ce patient présentait une LAM 5, non hyperleucocytaire au diagnostic. On retrouvait des anomalies du chromosome Y au caryotype. Une mutation de *FLT3* (*FLT3-TKD*), une mutation de *WT1* et une duplication de *KMT2A* (*MLL*) étaient retrouvées en biologie

moléculaire. Le patient présentait par ailleurs une surexpression de *WT1* et 3 LAIP au moment du diagnostic.

La MRD-*WT1* était négative en post-induction. Un des 3 LAIP (CD34⁺CD117⁺CD65⁺) était positif. Le patient a rechuté dans la première année de suivi.

Après relecture, la MRD-CMF est inférieure aux seuils de positivité actuelle (moelle de référence).

| Patient | Point de suivi | LAIP étudiés | Valeur (% leucocytes) | conclusion avant relecture | conclusion après relecture | Marqueur BM | Valeur (copies/100 copies <i>ABL1</i> *100) | conclusion BM | Rechute |
|---------|----------------|--|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-------------|---|---------------|---------|
| 12 | PI2 | CD34 ⁺ CD14 ⁻ CD65 ⁺ CD34 ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺ | 0,4 0,6 | + | - | WT1 (MO) | 1,52 | - | non |
| 17 | PI2 | CD45 ^{+/-} CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD7 ⁺ CD45 ^{+/-} CD34 ⁺ CD33 ^{+/-} CD7 ⁺ | 0,12 0,2 | + | - | WT1 (MO) | 1.52 | - | oui |
| 29 | PI | CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD65 ⁺ CD34 ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺ CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD11b ⁺ | 0,27 0,27 0,19 | + | - | WT1 (MO) | 0.090 | - | oui |
| 109 | PI | CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD11b ⁺ CD34 ⁺ CD33 ⁺ CD15 ⁺ CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD65 ⁺ | 0,23 0,54 0,55 | + | - | WT1 (MO) | 0.814 | - | oui |

Tableau 16 : Présentation des patients présentant une MRD discordante de type MRD CMF positive et MRD BM négative. *PI(2) : post-induction(2), LAIP : Immunophénotype associée à la leucémie, MO : moelle osseuse, CMF : cytométrie en flux, BM : biologie moléculaire (RQ-PCR).*

ii. *Patients présentant une MRD négative par CMF et positive en BM*

Les discordances sont reprises dans le tableau 17.

Patient n°14

Le diagnostic de LAM 2 a été posé en 2011. Le caryotype était normal. En biologie moléculaire, il existait une mutation de *NPM1*, quantifiable par RQ-PCR et une mutation de type *FLT3-ITD*. On retrouvait, d'autre part la présence de 3 LAIP de type infidélité de lignée.

En post-induction, alors que la MRD-WT1 et la MRD-CMF étaient négatives, la quantification de la mutation de *NPM1* était positive (supérieure à 10 copies/100 copies d'*ABL1*). Plus tardivement (en pré-consolidation 2), la MRD-CMF et la MRD-WT1 se positivisaient. La patiente a présenté une rechute précoce en fin de traitement.

La relecture de ce cas, confirme les résultats obtenus. A noter que les analyses en post-induction et au diagnostic n'ont pas été réalisées en utilisant les mêmes panels d'anticorps.

Patient n°32

Chez ce patient, une LAM 4 a été diagnostiquée en 2005. Le caryotype était normal. On retrouvait une mutation de *NPM1* et une mutation de type *FLT3-ITD* associée. L'expression de *WT1* était supérieure à 10 fois la normale au diagnostic. Il existait 2 LAIP (CD34⁻CD33⁺CD7⁺ et CD34⁺117⁺11b⁺) présents sur moins de 10% des leucocytes au diagnostic.

La MRD évaluée en post-induction 2 était négative en CMF et positive en BM sur *WT1*. Ces résultats restaient discordants jusqu'au dernier point de suivi avant rechute où malheureusement il n'y a pas eu d'évaluation de la MRD.

Après relecture, les résultats de CMF sont semblables. On remarque cependant une part de dilution sur le prélèvement post-induction 2.

On retrouve là encore un autre LAIP au diagnostic permettant le suivi (CD13⁺⁺HLA-DR^{dim}CD34⁻) présent sur 32% des leucocytes au diagnostic et négatif en post-induction 2.

Patient n°46

Ce patient présentait une LAM 5b, au caryotype normal avec duplication de *KMT2A (MLL)* et *FT3-ITD*. Une surexpression de *WT1* supérieure à la normale mais inférieure à 10 fois la normale ainsi que des LAIP (CD34⁻CD33⁺CD56⁺ et CD34⁻CD33⁺CD4⁺) étaient mis en évidence au diagnostic.

L'évaluation sur sang périphérique de la MRD-WT1 était supérieure à la normale en pré-consolidation 1. Ce résultat n'était ni retrouvé en BM ni en CMF sur moelle osseuse. La patiente n'a pas présenté pas de rechute au cours du suivi.

La relecture confirme une expression des LAIP inférieure aux seuils de positivité. On note d'autre part que le prélèvement présente une part de dilution.

Patient n°73

Il s'agit d'un patient qui présentait une LAM 4 avec inv(16) au diagnostic, surexpression de *WT1* et présence d'un transcrite de fusion CBF β -MYH11. Par ailleurs, il y avait 2 LAIP identifiés au diagnostic.

En post induction, seule la MRD par quantification de *WT1* sur sang périphérique était positive. La MRD-CMF ainsi que la MRD-WT1 sur moelle osseuse étaient négatives. Hormis cette quantification de MRD positive sur sang périphérique, tous les prélèvements réalisés au cours du suivi étaient négatifs. Le patient n'a pas présenté de rechute.

La relecture confirme une expression des LAIP inférieure aux seuils de positivité.

Patient n°110

Ce patient présentait une LAM 5a avec mutation de *NPM1* et *FLT3-ITD* ainsi qu'une hyperleucocytose au diagnostic. Le caryotype était normal. Deux LAIP étaient retrouvés : CD34⁻CD33⁺CD7⁺CD117⁺ et CD34⁻HLA-DR⁻CD7⁺

En pré-consolidation, la MRD-WT1 sur moelle osseuse était positive, tout comme la MRD-NPM1. La MRD-CMF était négative.

Lors de la relecture, la comparaison de l'expression des LAIP chez ce patient en pré-consolidation par rapport aux seuils déterminés à partir des moelles de référence retrouve une positivité des LAIP.

| Patient | Point de suivi | LAIP étudiés | Valeur (% leucocytes) | conclusion avant relecture | conclusion après relecture | Marqueur BM | Valeur (copies/100 copies ABL1 *100) | conclusion BM | Rechute |
|---------|----------------|---|-----------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------|--------------------------------------|---------------|---------|
| 14 | PI | CD45 ^{+/} -CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD7 ⁺ | 0,08 | - | - | WT1 (MO) NPM1 (MO) | 0.842 120 | + | oui |
| | | CD45 ^{+/} -CD34 ⁻ CD33 ⁺ CD7 ⁺ | 0,08 | | | | | | |
| | | CD45 ^{+/} -CD34 ⁻ CD13 ⁺ CD19 ⁺ | 0,02 | | | | | | |
| 32 | PI2 | CD34 ⁻ CD33 ⁺ CD7 ⁺ | 0,07 | - | - | WT1 (MO) | 5,29 | + | oui |
| | | CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD11b ⁺ | 0,08 | | | | | | |
| 46 | pC1 | CD34 ⁻ CD33 ⁺ CD56 ⁺ | 0,01 | - | - | WT1 (MO) WT1 (S) | 0.412 0.523 | + | non |
| | | CD34 ⁻ CD33 ⁺ CD56 ⁺ CD4 ⁺ | 0,01 | | | | | | |
| 73 | PI | CD34 ⁺ CD14 ⁻ CD65 ⁺ | 0,08 | - | - | WT1 (MO) WT1 (S) | 0,410 1,873 | + | non |
| | | CD34 ⁺ CD117 ⁺ CD15 ⁺ | 0,03 | | | | | | |
| 110 | pC1 | CD34 ⁻ CD117 ⁺ CD7 ⁺ | 0,12 | - | + | WT1 (MO) NPM1 (MO) | 2.79 41.8 | + | oui |
| | | CD34 ⁻ HLA-R ⁻ CD33 ⁺ CD7 ⁺ | 0,03 | | | | | | |

Tableau 17 : Présentation des patients présentant une MRD discordante de type MRD CMF négative et MRD BM positive. *PI(2) : post-induction (2), pC1 : pré-consolidation n°1, LAIP : Immunophénotype associée à la leucémie, MO : moelle osseuse, CMF : cytométrie en flux, BM : biologie moléculaire (RQ-PCR).*

Discussion

Dans la pratique clinique, l'utilisation de marqueurs spécifiques de la maladie comme les transcrits de fusion permet d'optimiser le suivi des patients et leur prise en charge thérapeutique. C'est actuellement le cas concernant les LAP et l'impact de ces marqueurs a été validé sur des cohortes prospectives de LAM du groupe CBF (37, 180-182). Dans les LAM sans translocations récurrentes, l'évaluation de la MRD pourrait être un outil décisionnel sur les indications d'intensification thérapeutique.

Actuellement le suivi de la MRD peut se faire par des techniques de RQ-PCR comme c'est le cas par exemple pour la surexpression de *WT1* ou par CMF en se basant sur des LAIP déterminés au moment du diagnostic. Cette dernière méthode est particulièrement intéressante car elle peut s'appliquer à un grand nombre de patient et son utilisation en pédiatrie a fait la preuve de son utilité (194, 199). Le suivi de la MRD via *WT1* en RQ PCR est un autre outil car *WT1* est surexprimé dans un grand nombre de LAM (68, 207). Quant au suivi des mutations de *NPM1*, il a fait récemment l'objet d'une publication sur une cohorte rétrospective et prospective adulte mettant en lumière l'impact sur la rechute et le décès d'une MRD détectable après deuxième cycle de chimiothérapie (201).

Dans cette étude rétrospective, monocentrique, nous avons souhaité déterminer l'impact pronostique de l'évaluation précoce de la MRD par CMF et/ou RQ-PCR dans une cohorte de patients atteints de LAM et traités de manière intensive et évaluer la concordance entre ces deux méthodes.

Notre cohorte de patient est représentative des cohortes de patients traités de manière intensive. En particulier, la médiane d'âge au diagnostic, le taux de LAM secondaires, de localisations extramédullaires et l'hyperleucocytose au diagnostic sont comparables aux cohortes retrouvées dans la littérature ((78, 101, 187, 208). On note qu'une majorité des patients inclus dans l'étude appartient au groupe favorable selon l'ELN (36%) ou intermédiaire I (27%), ce qui pourrait être lié à la sélection sur le mode de traitement (intensif chez tous les patients inclus).

Le taux de patients qui présentaient des LAIP au diagnostic permettant le suivi d'une MRD-CMF était de 96/128 (75%). Pour seulement 75 d'entre eux, une évaluation précoce de la MRD-CMF a été réalisée. Ce nombre semble peu élevé, comparativement à ce qui a été publié (184-188), d'autant plus que les patients ont été sélectionnés sur le fait qu'il existait des données de suivi de MRD (quel que soit le délai par rapport au diagnostic) en CMF ou en BM.

Concernant *WT1* qui est l'autre marqueur majoritaire de suivi dans notre population, 86% des patients présentaient une expression de *WT1* supérieure à la normale au diagnostic (101/117). Ce résultat est comparable aux données des autres études (68, 207, 210). Toutefois cette proportion importante est à nuancer car une partie de ces patients présentaient seulement une faible surexpression de *WT1* (inférieure à 10 fois la normale) et n'ont pas été suivis sur ce critère. Ainsi seuls 84 patients ont eu une évaluation précoce de la MRD basée sur *WT1* et pour 18 d'entre eux le suivi a été réalisé malgré une surexpression au diagnostic à moins de 10 fois la normale.

Enfin, la mutation de *NPM1* est retrouvée chez 33 patients (28% de la cohorte totale), ce qui est en accord avec le taux de mutation de *NPM1* retrouvé dans la littérature (15, 53). 26 de ces patients ont été suivis précocement sur ce paramètre et les 7 autres présentaient une mutation rare ne permettant pas le suivi en routine.

Nos données de survie mettent en évidence plusieurs résultats importants.

Le premier résultat de notre étude concerne l'intérêt du suivi de la MRD par CMF. 27 des 75 patients suivis en CMF, ne pouvaient pas être suivis sur un autre marqueur de BM. Nos données retrouvent un bénéfice de l'évaluation précoce de la MRD par CMF sur la RFS après censure à la greffe. Ce résultat est cohérent avec les données de la littérature sur des cohortes plus importantes : Freeman *et al.* ont par exemple montré un impact de la MRD CMF sur l'incidence cumulée de rechute dans une étude prospective sur une population d'environ 400 sujets âgés (médiane d'âge de 67 ans) (188) et Terwijn *et al.*, dans l'essai HOVON/SAKK AML42A, ont retrouvé un impact de la MRD-CMF analysée après 1^{ère} cure de chimiothérapie non seulement sur le risque de rechute et la RFS mais aussi sur l'OS ce qui n'est pas le cas dans notre étude (186). D'autres études rétrospectives ont retrouvés des résultats similaires sur la rechute (184, 185, 191, 192, 195, 196) et sur l'OS (184, 185).

Après ajustement sur les autres facteurs de risque, le lien entre la MRD-CMF et la RFS n'est plus significatif ($p=0.063$) ce qui s'explique probablement par un manque de puissance de notre étude.

Nous avons d'autre part confirmé que l'évaluation précoce de la MRD par RQ PCR était un élément important du pronostic. Elle impacte la RFS et l'OS que l'on censure ou non les données à partir de l'allogreffe. Pour les marqueurs utilisés (*WT1* et *NPM1*), ceci a déjà été décrit dans la littérature aussi bien pour la rechute (*WT1* (68, 195-198, 207, 210-212, 214) et *NPM1* (200, 201, 203, 205, 206, 209, 210) que sur l'OS (*WT1* (68, 95, 210, 211, 214) et *NPM1* (203, 205, 206, 209)). Si l'on considère chaque marqueur individuellement, la MRD-*WT1* conserve un impact significatif aussi bien sur la RFS que sur l'OS et les données pour *NPM1* n'ont pas pu être évaluées en raison du trop faible nombre de patients dans ce sous-groupe. Néanmoins on remarquera que les 3 patients qui ont une MRD-*NPM1* positive ont présenté une rechute puis un décès précoces.

Après ajustement sur les autres facteurs pronostiques, il est à noter que l'évaluation précoce de la MRD par RQ-PCR reste significativement liée à la RFS et l'OS alors que pour MRD-*WT1* l'impact sur l'OS n'est plus significatif.

L'originalité de notre étude est d'avoir considéré une MRD précoce globale indépendamment du type de marqueur ou de technique (RQ PCR et/ou CMF) utilisée pour la détection. Plusieurs études ont utilisé la CMF et la RQ-PCR, en utilisant notamment le suivi sur l'expression de *WT1*, pour évaluer l'impact pronostique de la MRD mais sans les associer, (195-197, 208, 209, 218). Nous retrouvons un impact de cette MRD globale précoce à la fois sur l'OS et la RFS que l'on censure ou non les données à partir de l'allogreffe. Après ajustement, le résultat est le même si l'on considère les données censurées à la greffe. En revanche avec les données sans censure l'impact de la MRD est significatif seulement sur la RFS et non sur l'OS ($p = 0,0648$). Ces résultats sont importants car ils traduisent qu'en augmentant sensiblement le nombre de patients chez lequel une MRD peut être détectée (84 par MRD-BM *versus* 111 par MRD-CMF et/ou BM), le retentissement sur la survie demeure. Nous montrons ainsi que l'association de la RQ-PCR et de la CMF pour la détection de la MRD est pertinente sur le plan clinique et pourrait être utilisée dans la prise en charge thérapeutique.

Le second objectif de notre étude était d'étudier la concordance entre les techniques de RQ-PCR et de CMF pour la détection de la MRD. Nous avons retrouvé un coefficient kappa de 0,46 traduisant une concordance modérée entre les deux techniques avec une discordance dans 9 cas sur 42.

De plus, nous avons également comparé la concordance entre la MRD-CMF et la MRD-WT1. Sans surprise le coefficient kappa était très semblable à 0,51 reflétant le fait que tous les patients qui présentaient une MRD évaluée sur l'expression de *NPM1* l'étaient également sur *WT1* et que seulement une seule patiente présentait une positivité de la MRD sur *NPM1* alors qu'elle était retrouvée négative sur *WT1* et en CMF (patiente n°14).

Dans la littérature les données de concordance sont peu détaillées. Dans l'étude de Weisser *et al.* (208), les niveaux d'expression de *WT1* et des LAIP étaient corrélés chez 33 des 38 (87%) patients au cours du suivi. La répartition des cas discordants n'était pas détaillée. Dans l'étude de Marani *et al.* (196), 42 patients âgés de moins de 60 ans, traités de manière intensive et en RC à l'issue du traitement d'induction ont été étudiés. 34 patients sur les 42 ont eu une évaluation de la MRD post-induction à la fois par RQ-PCR sur *WT1* et par CMF. 20 résultats sur 34 concordait (59%). Dans 13 cas la MRD-WT1 était négative alors que la MRD-CMF était positive et pour un cas seulement la MRD-CMF était négative alors que MRD-WT1 était négative. Les nombreux cas MRD-CMF positifs et MRD-WT1 négatifs sont expliqués par un seuil de positivité de la MRD-CMF très bas (25 cellules leucémiques résiduelles pour 100 000 événements).

Dans notre étude, les cas discordants entre la MRD-BM et la MRD-CMF étaient répartis de manière équilibrée : 4 cas étaient positifs en CMF et négatifs en RQ-PCR et 5 cas positifs en RQ-PCR et négatifs en CMF. Nous avons relu les cas pour lesquels les résultats de MRD étaient discordants. La plupart de ces cas avaient été analysés avant 2011 et cette analyse était basée sur une comparaison à des seuils de positivité établis par courbes ROC. Cette relecture a été réalisée en comparant lorsque cela était possible les résultats aux moelles de référence. De manière intéressante, l'ensemble des cas qui étaient négatifs en RQ-PCR et positifs en CMF étaient, après relecture, négatifs en CMF et seulement un cas sur 5 initialement négatif en CMF et positif en RQ-PCR était finalement retrouvé positif en CMF. Ce résultat suggère que les nouveaux seuils de positivité pour les LAIP en CMF, utilisés dans notre centre, pourraient être mieux corrélés aux résultats de RQ-PCR avec moins de cas positifs en CMF et négatifs en RQ-PCR. Afin d'évaluer si cette méthode permettait d'obtenir des résultats plus significatifs sur les paramètres de survie, nous avons recherché quel était l'impact de la MRD-

CMF pour les patients diagnostiqués après 2010 (date approximative d'intégration des moelles de référence dans les résultats). Dans ce sous-groupe, la MRD-CMF n'était pas pronostique concernant la RFS et l'OS. Il existait toutefois une différence sur la RFS lorsque la censure à la greffe était prise en compte (résultats non présentés). Il n'existe donc pas d'arguments permettant de recommander à l'heure actuelle l'une ou l'autre méthode de détermination des seuils de positivité de CMF.

Le trop faible nombre de patients pour lesquels nous disposions de données à la fois sur *NPM1* et la MRD-CMF ne nous a pas permis de comparer statistiquement ces deux méthodes. La seule publication comparant ces deux techniques retrouvait une meilleure sensibilité de détection de la MRD-NPM1 par rapport à la MRD CMF (219).

La concordance modérée obtenue avec les deux techniques traduisent en partie les difficultés pour établir des seuils de positivité de la MRD offrant à la fois une bonne sensibilité et spécificité. Ceci se retrouve dans les études cliniques où les seuils varient beaucoup et sont souvent fixés à posteriori pour permettre d'observer des différences de survie ou rechutes significatives. Ceci rend difficile la comparaison des résultats entre les études. Pour *NPM1*, par exemple, les seuils utilisés dans la littérature sont variables : seuil de détection de la mutation ou un seuil arbitrairement fixé : 1% (205), 0.1% ou 0.01% (200) (pourcentage du nombre de copies par rapport au gène de référence *ABL1*). Nous avons fixé un seuil arbitraire à 10% ce qui correspond au seuil le plus élevé dans la littérature (utilisé en post greffe par Shayegi et al. (205)).

Pour *WT1*, nous avons utilisé le seuil défini par l'ELN qui est largement répandu tout du moins en Europe.

En ce qui concerne la CMF, il existe un certain nombre de contraintes inhérentes à la technique qui sont autant de limites pour la comparaison des résultats avec les données publiées. Le mode de quantification des LAIP diffère souvent de centre à centre : certains utilisent le pourcentage de cellules exprimant le LAIP par rapport aux cellules mononuclées, d'autres par rapport au nombre d'événements acquis ou plus fréquemment au nombre d'événements CD45+ (réalisé dans cette étude). En plus des difficultés à définir des seuils de positivité consensuels, les techniques d'établissement des LAIP sont dépendantes des centres et sont fonction des cytomètres utilisés et de leur configuration.

Pour les seuils en CMF, ils étaient dans notre étude initialement définis à l'aide de courbe ROC selon les classes de LAIP puis à partir de 2011 les valeurs des LAIP ont été comparées

aux valeurs obtenues sur des moelles dites de référence comme détaillé dans le chapitre matériels et méthodes. Notre méthodologie diffère de la plupart des études récentes. En effet bien que l'utilisation de moelles de références comme contrôle soit devenu assez consensuel elles servent en général à définir les LAIP au moment du diagnostic mais rarement à évaluer le seuil de positivité lors du suivi. Ainsi, au diagnostic, un LAIP n'est retenu que s'il est retrouvé sur un certain seuil (en général moins de 0.1%) des cellules de moelle normale (190, 191, 203). Dans notre étude, les LAIP au diagnostic ne sont pas testés sur moelle normale et ce n'est qu'au moment des différents temps de suivi que la valeur du LAIP est testée sur moelle normale afin de s'assurer qu'il ne s'agit pas d'un faux positif. Nous avons analysés nos datas avec un seuil de positivité fixé 0.1% car il est retrouvé dans de nombreuses études (186, 194, 197). Avec ce seuil, nous n'obtenions pas de différence significative de survie RFS et OS (résultat non présenté).

L'établissement de LAIP est parfois particulièrement difficile dans un certain nombre de cas particuliers. Par exemple, dans les LAM à composante monocyttaire, la fenêtre des blastes se confond partiellement avec la fenêtre des monocytes ce qui peut nuire à la fiabilité des LAIP. De même, dans les LAM CD34⁻, les blastes sont plus difficiles à sélectionner et il y a un risque de contamination par d'autres cellules plus matures. Une autre difficulté est rencontrée dans le contexte particulier de la régénération médullaire. Si le prélèvement est réalisé trop tôt par rapport à la sortie d'aplasie en post-induction, il y a un risque de surestimer les LAIP. Dans ce cas, la comparaison aux moelles de références (réalisées en sortie d'aplasie) semble nécessaire. Enfin, les blastes peuvent présenter à la rechute des variations phénotypiques par rapport au diagnostic. Les repérer lors de l'évaluation de la MRD est un enjeu. Pour cela, un suivi sur plusieurs LAIP semble indispensable (184).

Si les analyses de CMF sont contraignantes, elles permettent cependant de pouvoir suivre un grand nombre de patients (dans notre étude 96 des 128 auraient pu être suivis). On remarque que 27 (24%) des patients ayant eu une évaluation précoce de la MRD par quantification des LAIP ne présentaient pas d'autre marqueurs de suivi. Pour ces patients, le suivi d'une MRD peut s'avérer informatif. Des recommandations pour une analyse consensuelle des données est donc nécessaire afin d'optimiser le champ d'application de cette technique

L'utilisation d'échantillons médullaires ou de sang périphérique pour l'évaluation de la MRD par RQ-PCR est un avantage par rapport à la CMF, notamment au cours du suivi après traitement où la réalisation de médullogramme n'est pas systématique. L'analyse du sang périphérique dans le cadre de l'évaluation de la MRD-CMF est d'autant plus intéressante que

le sang périphérique ne contient pas de cellules blastiques, pouvant être à l'origine de faux positifs lors d'une évaluation médullaire. Les MRD-CMF sur sang périphérique et médullaire ont déjà été comparées avec une bonne corrélation retrouvée et une différence de mesure de 1 log (220).

Nous nous sommes concentrés sur l'évaluation de la MRD aux temps précoces dans l'optique de pouvoir répondre au mieux aux enjeux thérapeutiques : plus la MRD est détectée précocement plus les patients à risque de rechute peuvent être orientés rapidement vers des protocoles d'intensification. En effet, la recherche d'un donneur compatible et la mise en place d'une procédure aussi lourde que l'allogreffe doivent être anticipées. D'autre part, l'évaluation de cette MRD reflète la chimiosensibilité de la maladie. Dans cette même optique, l'équipe de Köhnke *et al.* a étudié l'impact de la MRD-CMF réalisée pendant l'aplasie post-induction. Cette évaluation était prédictive de la RFS et l'OS et constituait un facteur pronostique indépendant (191). Des études à des temps similaires ont été réalisées pour *NPM1* (191, 203) ou même parfois à des temps encore plus précoces pour *WT1* (213) avec des résultats impactant le pronostic.

D'autres études ont recherché l'impact d'une maladie résiduelle évaluée à des temps tardifs : en post-consolidation 1 par CMF (184, 188, 197, 218, 221) par RQ-PCR sur *WT1* ((207, 208, 212, 214, 218) ou sur *NPM1* ((200, 201, 203, 206) ou bien en fin de traitement. Là encore, l'évaluation de la MRD était prédictive de la rechute et était associée à la survie. Concernant les patients de notre cohorte, cette étude n'a pas pu être menée car peu présentaient une évaluation de la MRD aux temps plus tardifs (notamment par CMF). Cependant, pour les LAM (hors LAP), les traitements d'entretien ne sont pour le moment réalisés que dans le cadre d'essais thérapeutiques, les évaluations plus tardives de la MRD semblent donc actuellement moins intéressantes pour la prise en charge décisionnelle.

Conclusions

Cette étude monocentrique et rétrospective permet de mettre en évidence l'intérêt de l'utilisation de la cytométrie en flux et de la biologie moléculaire par quantification de *WT1* et de la mutation de *NPM1* dans l'évaluation de la MRD. Obtenir une quantification de la MRD de manière précoce pourrait permettre d'identifier les patients à plus haut risque d'évolution et de proposer un schéma thérapeutique incluant une intensification par allogreffe de cellules souches hématopoïétiques plus précocement.

La cytométrie en flux est un moyen rapide, accessible permettant le suivi d'une maladie résiduelle chez les patients, y compris ceux qui ne présentent pas de marqueur de suivi par RQ-PCR et qui sont nombreux.

La concordance modérée retrouvée entre les techniques de CMF et RQ-PCR sur les marqueurs *WT1* et *NPM1* muté nous incite à privilégier les données de MRD quantifiées par RQ-PCR quand cela est possible.

Concernant son impact pronostique, notre étude suggère que la CMF est pronostique sur la RFS, bien que non indépendante des facteurs pronostiques identifiés au diagnostic des patients. L'évaluation de la MRD par RQ-PCR sur *WT1* ou mutation de *NPM1* est à la fois pronostique sur la RFS mais aussi l'OS et ce, de manière indépendante.

Enfin, on montre dans ce travail qu'en utilisant l'une et/ou l'autre des techniques, on augmente non seulement le nombre de patients ayant un suivi mais qu'en plus, l'obtention d'une MRD négative après chimiothérapie d'induction, est associée à une meilleure RFS, de manière indépendante des autres facteurs pronostiques.

L'ensemble des données présentées valident l'intérêt d'une évaluation précoce de la maladie résiduelle, quelle que soit la technique utilisée. Cependant, une uniformisation des pratiques concernant l'évaluation de la MRD par CMF est nécessaire.

Ainsi à plus long terme et après validation prospective, ces données pourraient être utilisées dans des stratégies de stratifications thérapeutiques, comme c'est le cas aujourd'hui dans l'essai BIG 1 stratifiant les patients vers l'allogreffe en fonction de la maladie résiduelle sur *NPM1* muté en pré-consolidation 2.

Bibliographie

1. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Disease models & mechanisms*. 2014;7(8):941-51.
2. SEER Cancer Statistics Factsheets : Acute Myeloid Leukemia. Bethesda: National Cancer Institute; [28/05/2016]. Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html>.
3. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire; 2013. 88 p.
4. Visser O, Trama A, Maynadié M, Stiller C, Marcos-Gragera R, De Angelis R, et al. Incidence, survival and prevalence of myeloid malignancies in Europe. *European journal of cancer*. 2012;48(17):3257-66.
5. Maynadié M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica*. 2013;98(2):230-8.
6. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. 1997;3(7):730-7.
7. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. 2004;5(7):738-43.
8. Cozzio A, Passegué E, Ayton PM, Karsunky H, Cleary ML, Weissman IL. Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes & development*. 2003;17(24):3029-35.
9. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: Are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2003;100(suppl 1):11842-9.
10. Riether C, Schurch CM, Ochsenein AF. Regulation of hematopoietic and leukemic stem cells by the immune system. *Cell Death Differ*. 2015;22(2):187-98.
11. Brown D, Kogan S, Lagasse E, Weissman I, Alcalay M, Pelicci PG, et al. A PMLRARAalpha transgene initiates murine acute promyelocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997;94(6):2551-6.
12. Minelli A, Maserati E, Rossi G, Bernardo ME, De Stefano P, Cecchini MP, et al. Familial platelet disorder with propensity to acute myelogenous leukemia: genetic heterogeneity and progression to leukemia via acquisition of clonal chromosome anomalies. *Genes, chromosomes & cancer*. 2004;40(3):165-71.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532-42.
14. Gilliland DG, Jordan CT, Felix CA. The molecular basis of leukemia. *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2004:80-97.

15. Cancer Genome Atlas Research Network. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2013;368(22):2059-74.
16. Welch JS, Ley TJ, Link DC, Miller CA, Larson DE, Koboldt DC, et al. The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia. *Cell*. 2012;150(2):264-78.
17. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. 2012;481(7382):506-10.
18. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016;127(1):29-41.
19. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115(3):453-74.
20. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Cooperative Group. *British Journal of Haematology*. 1976;33(4):451-8.
21. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M-T, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7)A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of internal medicine*. 1985;103(3):460-2.
22. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *British Journal of Haematology*. 1991;78(3):325-9.
23. Bene MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567-74.
24. van Dongen JJM, Lhermitte L, Bottcher 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*. 2012;26(9):1908-75.
25. Arnoulet C, Béné MC, Durrieu F, Feuillard J, Fossat C, Husson B, et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: A reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry Part B: Clinical Cytometry*. 2010;78B(1):4-10.
26. Béné MC, Kaeda JS. How and why minimal residual disease studies are necessary in leukemia: a review from WP10 and WP12 of the European LeukaemiaNet. *Haematologica*. 2009;94(8):1135-50.
27. International Standing Committee on Human Cytogenomic Nomenclature. ISCN : an international system for human cytogenomic nomenclature (2016). Basel ; New York: Karger; 2016.
28. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Presented in part at

- the 43rd annual meeting of the American Society of Hematology, Orlando, FL, December 10, 2001, and published in abstract form 59. 2002;100(13):4325-36.
29. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group study. *Blood*. 2000;96(13):4075-83.
 30. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 2010;116(3):354-65.
 31. Rowley JD, Golomb HM, Dougherty C. 15/17 translocation, a consistent chromosomal change in acute promyelocytic leukaemia. *Lancet (London, England)*. 1977;1(8010):549-50.
 32. Solh M, Yohe S, Weisdorf D, Ustun C. Core-binding factor acute myeloid leukemia: Heterogeneity, monitoring, and therapy. *American journal of hematology*. 2014;89(12):1121-31.
 33. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT, et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *British Journal of Haematology*. 2006;135(2):165-73.
 34. Trujillo JM, Cork A, Ahearn MJ, Youness EL, McCredie KB. Hematologic and cytologic characterization of 8/21 translocation acute granulocytic leukemia. *Blood*. 1979;53(4):695-706.
 35. Le Beau MM, Larson RA, Bitter MA, Vardiman JW, Golomb HM, Rowley JD. Association of an inversion of chromosome 16 with abnormal marrow eosinophils in acute myelomonocytic leukemia. A unique cytogenetic-clinicopathological association. *N Engl J Med*. 1983;309(11):630-6.
 36. Meyer C, Kowarz E, Hofmann J, Renneville A, Zuna J, Trka J, et al. New insights to the MLL recombinome of acute leukemias. *Leukemia*. 2009;23(8):1490-9.
 37. Sanz MA, Grimwade D, Tallman MS, Lowenberg B, Fenaux P, Estey EH, et al. Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2009;113(9):1875-91.
 38. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Annales de genetique*. 1973;16(2):109-12.
 39. Liu P, Tarle S, Hajra A, Claxton D, Marlton P, Freedman M, et al. Fusion between transcription factor CBF beta/PEBP2 beta and a myosin heavy chain in acute myeloid leukemia. *Science*. 1993;261(5124):1041-4.
 40. Kadkol SS, Bruno A, Dodge C, Lindgren V, Ravandi F. Comprehensive Analysis of CBF β -MYH11 Fusion Transcripts in Acute Myeloid Leukemia by RT-PCR Analysis. *The Journal of Molecular Diagnostics*. 2004;6(1):22-7.
 41. de Botton S, Chevret S, Sanz M, Dombret H, Thomas X, Guerci A, et al. Additional chromosomal abnormalities in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) do not confer poor prognosis: results of APL 93 trial. *British Journal of Haematology*. 2000;111(3):801-6.

42. Cervera J, Montesinos P, Hernández-Rivas JM, Calasanz MJ, Aventín A, Ferro MT, et al. Additional chromosome abnormalities in patients with acute promyelocytic leukemia treated with all-trans retinoic acid and chemotherapy. *Haematologica*. 2010;95(3):424-31.
43. Grimwade D, Biondi A, Mozziconacci M-J, Hagemeijer A, Berger R, Neat M, et al. Characterization of acute promyelocytic leukemia cases lacking the classic t(15;17): results of the European Working Party. *Blood*. 2000;96(4):1297-308.
44. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. Lyon: IARC; 2008. 439 p.
45. Soupir CP, Vergilio J-A, Cin PD, Muzikansky A, Kantarjian H, Jones D, et al. Philadelphia Chromosome-Positive Acute Myeloid Leukemia. A Rare Aggressive Leukemia With Clinicopathologic Features Distinct From Chronic Myeloid Leukemia in Myeloid Blast Crisis. 2007;127(4):642-50.
46. Konoplev S, Yin CC, Kornblau SM, Kantarjian HM, Konopleva M, Andreeff M, et al. Molecular characterization of de novo Philadelphia chromosome-positive acute myeloid leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2013;54(1):138-44.
47. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016.
48. Schlenk RF, Dohner K, Krauter J, Frohling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008;358(18):1909-18.
49. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, Weber D, Paschka P, Hahn J, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016.
50. Lugthart S, van Drunen E, van Norden Y, van Hoven A, Erpelinck CA, Valk PJ, et al. High EVI1 levels predict adverse outcome in acute myeloid leukemia: prevalence of EVI1 overexpression and chromosome 3q26 abnormalities underestimated. *Blood*. 2008;111(8):4329-37.
51. Groschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, de Wit E, Bouwman BA, Erpelinck C, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in leukemia. *Cell*. 2014;157(2):369-81.
52. Gale RE, Hills R, Pizzey AR, Kottaridis PD, Swirsky D, Gilkes AF, et al. Relationship between FLT3 mutation status, biologic characteristics, and response to targeted therapy in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 2005;106(12):3768-76.
53. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2012;366(12):1079-89.
54. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*. 2006;20(6):965-70.
55. Caligiuri MA, Strout MP, Lawrence D, Arthur DC, Baer MR, Yu F, et al. Rearrangement of ALL1 (MLL) in Acute Myeloid Leukemia with Normal Cytogenetics. *Cancer research*. 1998;58(1):55-9.

56. Ohgami RS, Arber DA. The diagnostic and clinical impact of genetics and epigenetics in acute myeloid leukemia. *International Journal of Laboratory Hematology*. 2015;37:122-32.
57. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Mrózek K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011;118(26):6920-9.
58. Gangat N, Patnaik MM, Tefferi A. Myelodysplastic syndromes: Contemporary review and how we treat. *American journal of hematology*. 2016;91(1):76-89.
59. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, Alpermann T, Fasan A, Grossmann V, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013;27(1):82-91.
60. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125(9):1367-76.
61. Rakheja D, Konoplev S, Medeiros LJ, Chen W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Hum Pathol*. 2012;43(10):1541-51.
62. Gaidzik VI, Paschka P, Späth D, Habdank M, Köhne C-H, Germing U, et al. TET2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia (AML): Results From a Comprehensive Genetic and Clinical Analysis of the AML Study Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(12):1350-7.
63. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1373-81.
64. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2010;363(25):2424-33.
65. Hou HA, Kuo YY, Liu CY, Chou WC, Lee MC, Chen CY, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and clinical implications. *Blood*. 2012;119(2):559-68.
66. Gale RE, Lamb K, Allen C, El-Sharkawi D, Stowe C, Jenkinson S, et al. Simpson's Paradox and the Impact of Different DNMT3A Mutations on Outcome in Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(18):2072-83.
67. Gaidzik VI, Schlenk RF, Moschny S, Becker A, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Prognostic impact of WT1 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study of the German-Austrian AML Study Group. *Blood*. 2009;113(19):4505-11.
68. Lapillonne H, Renneville A, Auvrignon A, Flamant C, Blaise A, Perot C, et al. High WT1 Expression After Induction Therapy Predicts High Risk of Relapse and Death in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2006;24(10):1507-15.
69. Haferlach C, Dicker F, Herholz H, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Mutations of the TP53 gene in acute myeloid leukemia are strongly associated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia*. 2008;22(8):1539-41.

70. Hou HA, Chou WC, Kuo YY, Liu CY, Lin LI, Tseng MH, et al. TP53 mutations in de novo acute myeloid leukemia patients: longitudinal follow-ups show the mutation is stable during disease evolution. *Blood cancer journal*. 2015;5:e331.
71. Pedersen-Bjergaard J, Christiansen DH, Desta F, Andersen MK. Alternative genetic pathways and cooperating genetic abnormalities in the pathogenesis of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2006;20(11):1943-9.
72. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *New England Journal of Medicine*. 2005;352(3):254-66.
73. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. 2008;22(5):915-31.
74. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006;107(9):3481-5.
75. Juliusson G, Antunovic P, Derolf Å, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009;113(18):4179-87.
76. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of Early Death After Induction Therapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia With Pretreatment Risk Scores: A Novel Paradigm for Treatment Assignment. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(33):4417-24.
77. Oran B, Weisdorf DJ. Survival for older patients with acute myeloid leukemia: a population-based study. *Haematologica*. 2012;97.
78. Mrózek K, Marcucci G, Nicolet D, Maharry KS, Becker H, Whitman SP, et al. Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(36):4515-23.
79. Lazarevic V, Hörstedt AS, Johansson B, Antunovic P, Billström R, Derolf Å, et al. Incidence and prognostic significance of karyotypic subgroups in older patients with acute myeloid leukemia: the Swedish population-based experience. *Blood Cancer Journal*. 2014;4(2):e188.
80. Ostgard LSG, Norgaard JM, Sengelov H, Severinsen M, Friis LS, Marcher CW, et al. Comorbidity and performance status in acute myeloid leukemia patients: a nation-wide population-based cohort study. *Leukemia*. 2015;29(3):548-55.
81. Charlson ME, Pompei P, Ales KL, MacKenzie CR. A new method of classifying prognostic comorbidity in longitudinal studies: development and validation. *J Chronic Dis*. 1987;40.
82. Sorror ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005;106(8):2912-9.
83. Giles FJ, Borthakur G, Ravandi F, Faderl S, Verstovsek S, Thomas D, et al. The haematopoietic cell transplantation comorbidity index score is predictive of early death and survival in patients over 60 years of age receiving induction therapy for acute myeloid leukaemia. *British Journal of Haematology*. 2007;136(4):624-7.

84. Byrd JC, Weiss RB, Arthur DC, Lawrence D, Baer MR, Davey F, et al. Extramedullary leukemia adversely affects hematologic complete remission rate and overall survival in patients with t(8;21)(q22;q22): results from Cancer and Leukemia Group B 8461. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1997;15(2):466-75.
85. Reinhardt D, Pekrun A, Lakomek M, Zimmermann M, Ritter J, Creutzig U. Primary myelosarcomas are associated with a high rate of relapse: report on 34 children from the acute myeloid leukaemia-Berlin-Frankfurt-Munster studies. *Br J Haematol*. 2000;110(4):863-6.
86. Tsimberidou AM, Kantarjian HM, Wen S, Keating MJ, O'Brien S, Brandt M, et al. Myeloid sarcoma is associated with superior event-free survival and overall survival compared with acute myeloid leukemia. *Cancer*. 2008;113(6):1370-8.
87. Tallman MS, Hakimian D, Shaw JM, Lissner GS, Russell EJ, Variakojis D. Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1993;11(4):690-7.
88. Dutcher JP, Schiffer CA, Wiernik PH. Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1987;5(9):1364-72.
89. Ventura GJ, Hester JP, Smith TL, Keating MJ. Acute myeloblastic leukemia with hyperleukocytosis: Risk factors for early mortality in induction. *American journal of hematology*. 1988;27(1):34-7.
90. Larson RA. Is secondary leukemia an independent poor prognostic factor in acute myeloid leukemia? *Best practice & research Clinical haematology*. 2007;20(1):29-37.
91. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003;102(1):43-52.
92. Kantarjian HM, Keating MJ, Walters RS, Smith TL, Cork A, McCredie KB, et al. Therapy-related leukemia and myelodysplastic syndrome: clinical, cytogenetic, and prognostic features. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1986;4(12):1748-57.
93. Bello C, Yu D, Komrokji RS, Zhu W, Wetzstein GA, List AF, et al. Outcomes after induction chemotherapy in patients with acute myeloid leukemia arising from myelodysplastic syndrome. *Cancer*. 2011;117(7):1463-9.
94. Ades L, Guerci A, Raffoux E, Sanz M, Chevallier P, Lapan S, et al. Very long-term outcome of acute promyelocytic leukemia after treatment with all-trans retinoic acid and chemotherapy: the European APL Group experience. *Blood*. 2010;115(9):1690-6.
95. Ades L, Chevret S, Raffoux E, Guerci-Bresler A, Pigneux A, Vey N, et al. Long-term follow-up of European APL 2000 trial, evaluating the role of cytarabine combined with ATRA and Daunorubicin in the treatment of nonelderly APL patients. *American journal of hematology*. 2013;88(7):556-9.
96. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Breccia M, Gallo E, Rambaldi A, et al. Front-line treatment of acute promyelocytic leukemia with AIDA induction followed by risk-adapted consolidation for adults younger than 61 years: results of the AIDA-2000 trial of the GIMEMA Group. *Blood*. 2010;116(17):3171-9.

97. Hernandez JM, Martin G, Gutierrez NC, Cervera J, Ferro MT, Calasanz MJ, et al. Additional cytogenetic changes do not influence the outcome of patients with newly diagnosed acute promyelocytic leukemia treated with an ATRA plus anthracyclin based protocol. A report of the Spanish group PETHEMA. *Haematologica*. 2001;86(8):807-13.
98. Braun T, Cereja S, Chevret S, Raffoux E, Beaumont M, Detourmignies L, et al. Evolving characteristics and outcome of secondary acute promyelocytic leukemia (APL): A prospective analysis by the French-Belgian-Swiss APL group. *Cancer*. 2015;121(14):2393-9.
99. Breems DA, Van Putten WL, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KB, Mellink CH, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(29):4791-7.
100. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2015;373(12):1136-52.
101. Alpermann T, Kern W, Schnittger S, Schmid C, Kreuzer K-A, Serve H, et al. Evaluation of the proposed reporting system of the European LeukemiaNet and recommendations for prognosis of acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2013;37(2):197-200.
102. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(20):2758-65.
103. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005;106(12):3733-9.
104. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela J-M, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005;106(10):3618-20.
105. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005;106(12):3740-6.
106. Bienz M, Ludwig M, Mueller BU, Oppliger Leibundgut E, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk Assessment in Patients with Acute Myeloid Leukemia and a Normal Karyotype. *Clinical Cancer Research*. 2005;11(4):1416-24.
107. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010;116(18):3622-6.
108. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 2011;117(8):2469-75.

109. Hou HA, Lin LI, Chen CY, Tien HF. Reply to 'Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favorable prognosis'. *Br J Cancer*. 2009;101(4):738-40.
110. Pabst T, Eyholzer M, Fos J, Mueller BU. Heterogeneity within AML with CEBPA mutations; only CEBPA double mutations, but not single CEBPA mutations are associated with favourable prognosis. *Br J Cancer*. 2009;100(8):1343-6.
111. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113(13):3088-91.
112. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Becker H, Metzeler KH, et al. RUNX1 Mutations Are Associated With Poor Outcome in Younger and Older Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and With Distinct Gene and MicroRNA Expression Signatures. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(25):3109-18.
113. Tang J-L, Hou H-A, Chen C-Y, Liu C-Y, Chou W-C, Tseng M-H, et al. AML1/RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia: prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-61.
114. Whitman SP, Caligiuri MA, Maharry K, Radmacher MD, Kohlschmidt J, Becker H, et al. The MLL partial tandem duplication in adults aged 60 years and older with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(7):1713-7.
115. Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrózek K, Paschka P, Langer C, et al. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2007;109(12):5164-7.
116. Döhner K, Tobis K, Ulrich R, Fröhling S, Benner A, Schlenk RF, et al. Prognostic Significance of Partial Tandem Duplications of the MLL Gene in Adult Patients 16 to 60 Years Old With Acute Myeloid Leukemia and Normal Cytogenetics: A Study of the Acute Myeloid Leukemia Study Group Ulm. *Journal of Clinical Oncology*. 2002;20(15):3254-61.
117. Virappane P, Gale R, Hills R, Kakkas I, Summers K, Stevens J, et al. Mutation of the Wilms' Tumor 1 Gene Is a Poor Prognostic Factor Associated With Chemotherapy Resistance in Normal Karyotype Acute Myeloid Leukemia: The United Kingdom Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(33):5429-35.
118. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Whitman SP, Mrózek K, Maharry K, et al. Wilms' Tumor 1 Gene Mutations Independently Predict Poor Outcome in Adults With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26(28):4595-602.
119. Damm F, Markus B, Thol F, Morgan M, Göhring G, Schlegelberger B, et al. TET2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: Clinical implications and evolutionary patterns. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2014;53(10):824-32.
120. Weissmann S, Alpermann T, Grossmann V, Kowarsch A, Nadarajah N, Eder C, et al. Landscape of TET2 mutations in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2012;26(5):934-42.

121. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Herzig JK, Aulitzky T, Bullinger L, et al. ASXL1 mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: a study by the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *Haematologica*. 2015;100(3):324-30.
122. Chou WC, Huang HH, Hou HA, Chen CY, Tang JL, Yao M, et al. Distinct clinical and biological features of de novo acute myeloid leukemia with additional sex comb-like 1 (ASXL1) mutations. *Blood*. 2010;116(20):4086-94.
123. Thol F, Damm F, Lüdeking A, Winschel C, Wagner K, Morgan M, et al. Incidence and Prognostic Influence of DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(21):2889-96.
124. Marcucci G, Metzeler KH, Schwind S, Becker H, Maharry K, Mrózek K, et al. Age-Related Prognostic Impact of Different Types of DNMT3A Mutations in Adults With Primary Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2012;30(7):742-50.
125. Renneville A, Boissel N, Nibourel O, Berthon C, Helevaut N, Gardin C, et al. Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association. *Leukemia*. 2012;26(6):1247-54.
126. Gaidzik VI, Schlenk RF, Paschka P, Stölzle A, Späth D, Kuendgen A, et al. Clinical impact of DNMT3A mutations in younger adult patients with acute myeloid leukemia: results of the AML Study Group (AMLSG). *Blood*. 2013;121(23):4769-77.
127. Boissel N, Nibourel O, Renneville A, Gardin C, Reman O, Contentin N, et al. Prognostic Impact of Isocitrate Dehydrogenase Enzyme Isoforms 1 and 2 Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(23):3717-23.
128. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(14):2348-55.
129. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Krönke J, Bullinger L, et al. IDH1 and IDH2 Mutations Are Frequent Genetic Alterations in Acute Myeloid Leukemia and Confer Adverse Prognosis in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation Without FLT3 Internal Tandem Duplication. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(22):3636-43.
130. Rucker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012;119(9):2114-21.
131. Bowen D, Groves MJ, Burnett AK, Patel Y, Allen C, Green C, et al. TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia*. 2008;23(1):203-6.
132. Schnittger S, Kohl TM, Haferlach T, Kern W, Hiddemann W, Spiekermann K, et al. KIT-D816 mutations in AML1-ETO-positive AML are associated with impaired event-free and overall survival. *Blood*. 2006;107(5):1791-9.

133. Kim HJ, Ahn HK, Jung CW, Moon JH, Park CH, Lee KO, et al. KIT D816 mutation associates with adverse outcomes in core binding factor acute myeloid leukemia, especially in the subgroup with RUNX1/RUNX1T1 rearrangement. *Ann Hematol.* 2013;92(2):163-71.
134. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). *Blood.* 2013;121(1):170-7.
135. Wheatley K, Burnett AK, Goldstone AH, Gray RG, Hann IM, Harrison CJ, et al. A simple, robust, validated and highly predictive index for the determination of risk-directed therapy in acute myeloid leukaemia derived from the MRC AML 10 trial. United Kingdom Medical Research Council's Adult and Childhood Leukaemia Working Parties. *Br J Haematol.* 1999;107(1):69-79.
136. Lo-Coco F, Avvisati G, Vignetti M, Thiede C, Orlando SM, Iacobelli S, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide for acute promyelocytic leukemia. *N Engl J Med.* 2013;369(2):111-21.
137. Rai K, Holland J, Glidewell O, Weinberg V, Brunner K, Obrecht J, et al. Treatment of acute myelocytic leukemia: a study by cancer and leukemia group B. *Blood.* 1981;58(6):1203-12.
138. Yates JW, Wallace HJ, Jr., Ellison RR, Holland JF. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer chemotherapy reports Part 1.* 1973;57(4):485-8.
139. Sekeres MA, Elson P, Kalaycio ME, Advani AS, Copelan EA, Faderl S, et al. Time from diagnosis to treatment initiation predicts survival in younger, but not older, acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 2009;113(1):28-36.
140. Wiernik P, Banks P, Case DJ, Arlin Z, Periman P, Todd M, et al. Cytarabine plus idarubicin or daunorubicin as induction and consolidation therapy for previously untreated adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 1992;79(2):313-9.
141. Vogler WR, Velez-Garcia E, Weiner RS, Flaum MA, Bartolucci AA, Omura GA, et al. A phase III trial comparing idarubicin and daunorubicin in combination with cytarabine in acute myelogenous leukemia: a Southeastern Cancer Study Group Study. *Journal of Clinical Oncology.* 1992;10(7):1103-11.
142. Pautas C, Merabet F, Thomas X, Raffoux E, Gardin C, Corm S, et al. Randomized Study of Intensified Anthracycline Doses for Induction and Recombinant Interleukin-2 for Maintenance in Patients With Acute Myeloid Leukemia Age 50 to 70 Years: Results of the ALFA-9801 Study. *Journal of Clinical Oncology.* 2010;28(5):808-14.
143. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2009;361(13):1249-59.
144. Lowenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2009;361(13):1235-48.
145. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Cavenagh J, Kjeldsen L, et al. A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients. *Blood.* 2015;125(25):3878-85.
146. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2016;127(1):53-61.

147. Willemze R, Suciú S, Meloni G, Labar B, Marie JP, Halkes CJ, et al. High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(3):219-28.
148. Castaigne S, Pautas C, Terre C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie JN, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet (London, England)*. 2012;379(9825):1508-16.
149. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Freeman S, Kjeldsen L, et al. Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy improves survival in older patients with acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(32):3924-31.
150. Röllig C, Müller-Tidow C, Hüttmann A, Noppeney R, Kunzmann V, Baldus CD, et al. Sorafenib Versus Placebo in Addition to Standard Therapy in Younger Patients with Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results from 267 Patients Treated in the Randomized Placebo-Controlled SAL-Soramyl Trial. *Blood*. 2014;124(21):6-.
151. Stone RM, Mandrekar S, Sanford BL, Geyer S, Bloomfield CD, Dohner K, et al. The Multi-Kinase Inhibitor Midostaurin (M) Prolongs Survival Compared with Placebo (P) in Combination with Daunorubicin (D)/Cytarabine (C) Induction (ind), High-Dose C Consolidation (consol), and As Maintenance (maint) Therapy in Newly Diagnosed Acute My.... *Blood*. 2015;126(23):6-.
152. Mayer RJ, Davis RB, Schiffer CA, Berg DT, Powell BL, Schulman P, et al. Intensive Postremission Chemotherapy in Adults with Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine*. 1994;331(14):896-903.
153. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, et al. Frequency of Prolonged Remission Duration after High-Dose Cytarabine Intensification in Acute Myeloid Leukemia Varies by Cytogenetic Subtype. *Cancer research*. 1998;58(18):4173-9.
154. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 Study. *Blood*. 2011;117(8):2366-72.
155. Schaich M, Röllig C, Soucek S, Kramer M, Thiede C, Mohr B, et al. Cytarabine Dose of 36 g/m² Compared With 12 g/m² Within First Consolidation in Acute Myeloid Leukemia: Results of Patients Enrolled Onto the Prospective Randomized AML96 Study. *Journal of Clinical Oncology*. 2011;29(19):2696-702.
156. Lowenberg B. Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(1):26-8.
157. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. *Jama*. 2009;301(22):2349-61.
158. Cornelissen JJ, Blaise D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood*. 2016;127(1):62-70.

159. Schlenk RF, Döhner K, Mack S, Stoppel M, Király F, Götze K, et al. Prospective Evaluation of Allogeneic Hematopoietic Stem-Cell Transplantation From Matched Related and Matched Unrelated Donors in Younger Adults With High-Risk Acute Myeloid Leukemia: German-Austrian Trial AMLHD98A. *Journal of Clinical Oncology*. 2010;28(30):4642-8.
160. Biggs J, Horowitz M, Gale R, Ash R, Atkinson K, Helbig W, et al. Bone marrow transplants may cure patients with acute leukemia never achieving remission with chemotherapy. *Blood*. 1992;80(4):1090-3.
161. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, Milligan D, Prentice A, Yin J, et al. Curability of Patients With Acute Myeloid Leukemia Who Did Not Undergo Transplantation in First Remission. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(10):1293-301.
162. Breems DA, Van Putten WLJ, Huijgens PC, Ossenkoppele GJ, Verhoef GEG, Verdonck LF, et al. Prognostic Index for Adult Patients With Acute Myeloid Leukemia in First Relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 2005;23(9):1969-78.
163. Thol F, Schlenk RF, Heuser M, Ganser A. How I treat refractory and early relapsed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2015;126(3):319-27.
164. Fröhling S, Schlenk RF, Kayser S, Morhardt M, Benner A, Döhner K, et al. Cytogenetics and age are major determinants of outcome in intensively treated acute myeloid leukemia patients older than 60 years: results from AMLSG trial AML HD98-B. *Blood*. 2006;108(10):3280-8.
165. Gardin C, Chevret S, Pautas C, Turlure P, Raffoux E, Thomas X, et al. Superior Long-Term Outcome With Idarubicin Compared With High-Dose Daunorubicin in Patients With Acute Myeloid Leukemia Age 50 Years and Older. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(3):321-7.
166. Lowenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 1989;7(9):1268-74.
167. Gardin C, Turlure P, Fagot T, Thomas X, Terre C, Contentin N, et al. Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial. *Blood*. 2007;109(12):5129-35.
168. Griffin PT, Komrokji RS, De Castro CM, Rizzieri DA, Melchert M, List AF, et al. A multicenter, phase II study of maintenance azacitidine in older patients with acute myeloid leukemia in complete remission after induction chemotherapy. *American journal of hematology*. 2015;90(9):796-9.
169. Estey E, de Lima M, Tibes R, Pierce S, Kantarjian H, Champlin R, et al. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007;109(4):1395-400.
170. Forman SJ. What is the role of reduced-intensity transplantation in the treatment of older patients with AML? *Hematology / the Education Program of the American Society of Hematology American Society of Hematology Education Program*. 2009:406-13.
171. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid

for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. 2007;109(6):1114-24.

172. Quintas-Cardama A, Ravandi F, Liu-Dumlao T, Brandt M, Faderl S, Pierce S, et al. Epigenetic therapy is associated with similar survival compared with intensive chemotherapy in older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;120(24):4840-5.

173. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(4):562-9.

174. Kantarjian HM, Thomas XG, Dmoszynska A, Wierzbowska A, Mazur G, Mayer J, et al. Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(21):2670-7.

175. Dombret H, Seymour JF, Butrym A, Wierzbowska A, Selleslag D, Jang JH, et al. International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts. *Blood*. 2015;126(3):291-9.

176. Thepot S, Itzykson R, Seegers V, Recher C, Raffoux E, Quesnel B, et al. Azacitidine in untreated acute myeloid leukemia: a report on 149 patients. *American journal of hematology*. 2014;89(4):410-6.

177. Hart JS, Shirakawa S, Trujillo J, Frei E. The Mechanism of Induction of Complete Remission in Acute Myeloblastic Leukemia in Man. *Cancer research*. 1969;29(12):2300-7.

178. Baccarani M, Deininger MW, Rosti G, Hochhaus A, Soverini S, Apperley JF, et al. European LeukemiaNet recommendations for the management of chronic myeloid leukemia: 2013. *Blood*. 2013;122(6):872-84.

179. van Dongen JJ, van der Velden VH, Bruggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 2015;125(26):3996-4009.

180. Willekens C, Blanchet O, Renneville A, Cornillet-Lefebvre P, Pautas C, Guieze R, et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica*. 2016;101(3):328-35.

181. Yin JA, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 2012;120(14):2826-35.

182. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;121(12):2213-23.

183. Hourigan CS, Karp JE. Minimal residual disease in acute myeloid leukaemia. *Nature reviews Clinical oncology*. 2013;10(8):460-71.

184. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The Role of Multiparameter Flow Cytometry for Detection of Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *American Journal of Clinical Pathology*. 2009;131(1):16-26.

185. San Miguel JF, Vidriales MaB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla Jn, Gutiérrez N, Cañizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood*. 2001;98(6):1746-51.
186. Terwijn M, van Putten WL, Kelder A, van der Velden VH, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(31):3889-97.
187. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 2010;116(13):2295-303.
188. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2013;31(32):4123-31.
189. Feller N, van der Velden VH, Brooimans RA, Boeckx N, Preijers F, Kelder A, et al. Defining consensus leukemia-associated immunophenotypes for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia in a multicenter setting. *Blood cancer journal*. 2013;3:e129.
190. van der Velden VHJ, van der Sluijs-Geling A, Gibson BES, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Hop WCJ, et al. Clinical significance of flowcytometric minimal residual disease detection in pediatric acute myeloid leukemia patients treated according to the DCOG ANLL97/MRC AML12 protocol. *Leukemia*. 2010;24(9):1599-606.
191. Kohnke T, Sauter D, Ringel K, Hoster E, Laubender RP, Hubmann M, et al. Early assessment of minimal residual disease in AML by flow cytometry during aplasia identifies patients at increased risk of relapse. *Leukemia*. 2015;29(2):377-86.
192. Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2004;104(10):3078-85.
193. Loken MR, Alonzo TA, Pardo L, Gerbing RB, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. Residual disease detected by multidimensional flow cytometry signifies high relapse risk in patients with de novo acute myeloid leukemia: a report from Children's Oncology Group. *Blood*. 2012;120(8):1581-8.
194. Rubnitz JE, Inaba H, Dahl G, Ribeiro RC, Bowman WP, Taub J, et al. Minimal residual disease-directed therapy for childhood acute myeloid leukaemia: results of the AML02 multicentre trial. *The Lancet Oncology*. 2010;11(6):543-52.
195. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, de Waure C, di Nardo F, Melillo L, et al. Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leukemia Research*. 2012;36(4):401-6.
196. Marani C, Clavio M, Grasso R, Colombo N, Guolo F, Kunkl A, et al. Integrating post induction WT1 quantification and flow-cytometry results improves minimal residual disease stratification in acute myeloid leukemia. *Leukemia Research*. 2013;37(12):1606-11.

197. Rossi G, Minervini MM, Melillo L, Nardo F, Waure C, Scalzulli PR, et al. Predictive role of minimal residual disease and log clearance in acute myeloid leukemia: a comparison between multiparameter flow cytometry and Wilm's tumor 1 levels. *Annals of Hematology*. 2014;93(7):1149-57.
198. Malagola M, Skert C, Borlenghi E, Chiarini M, Cattaneo C, Morello E, et al. Postremission sequential monitoring of minimal residual disease by WT1 Q-PCR and multiparametric flow cytometry assessment predicts relapse and may help to address risk-adapted therapy in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Medicine*. 2016;5(2):265-74.
199. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, Pounds SB, Shurtleff SA, Wang KY, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(29):3625-32.
200. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-31.
201. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016;374(5):422-33.
202. Kristensen T, Møller MB, Friis L, Bergmann OJ, Preiss B. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression*. *European Journal of Haematology*. 2011;87(5):400-8.
203. Hubmann M, Köhnke T, Hoster E, Schneider S, Dufour A, Zellmeier E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014;99(8):1317-25.
204. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. 2006;20(6):1103-8.
205. Shayegi N, Kramer M, Bornhauser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013;122(1):83-92.
206. Kronke J, Schlenk RF, Jensen KO, Tschurtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(19):2709-16.
207. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(31):5195-201.
208. Weisser M, Kern W, Rauhut S, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, et al. Prognostic impact of RT-PCR-based quantification of WT1 gene expression during MRD monitoring of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2005;19(8):1416-23.
209. Miglino M, Colombo N, Grasso R, Marani C, Clavio M, Pica GM, et al. Nucleophosmin gene-based monitoring in de novo cytogenetically normal acute myeloid

- leukemia with nucleophosmin gene mutations: comparison with cytofluorimetric analysis and study of Wilms tumor gene 1 expression. *Leukemia & lymphoma*. 2012;53(11):2214-7.
210. Lambert J, Lambert J, Nibourel O, Pautas C, Hayette S, Cayuela J-M, et al. MRD assessed by WT1 and NPM1 transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin. 2014. 2014.
211. Ommen HB, Nyvold CG, Brændstrup K, Andersen BL, Ommen IB, Hasle H, et al. Relapse prediction in acute myeloid leukaemia patients in complete remission using WT1 as a molecular marker: development of a mathematical model to predict time from molecular to clinical relapse and define optimal sampling intervals. *British Journal of Haematology*. 2008;141(6):782-91.
212. Nowakowska-Kopera A, Sacha T, Florek I, Zawada M, Czekalska S, Skotnicki AB. Wilms' tumor gene 1 expression analysis by real-time quantitative polymerase chain reaction for monitoring of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia & lymphoma*. 2009;50(8):1326-32.
213. Gianfaldoni G, Mannelli F, Ponziani V, Longo G, Bencini S, Bosi A, et al. Early reduction of WT1 transcripts during induction chemotherapy predicts for longer disease free and overall survival in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2010;95(5):833-6.
214. Shibasaki Y, Seki Y, Tanaka T, Miyakoshi S, Fuse K, Kozakai T, et al. The association of level of reduction of Wilms' tumor gene 1 mRNA transcript in bone marrow and outcome in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia Research*. 2015;39(6):667-71.
215. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VH, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using 'real-time' quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. 2003;17(12):2474-86.
216. Collot S, Alain S, Denis F, Ranger-Rogez S. Real-time PCR quantification, TaqMan and virological applications. *Virologie*. 2001;5(6):439-48.
217. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
218. Malagola M, Skert C, Ruggeri G, Turra A, Ribolla R, Cancelli V, et al. Peripheral Blood WT1 Expression Predicts Relapse in AML Patients Undergoing Allogeneic Stem Cell Transplantation. *BioMed Research International*. 2014;2014:5.
219. Pettersson L, Leveen P, Axler O, Dvorakova D, Juliusson G, Ehinger M. Improved Minimal Residual Disease Detection by Targeted Quantitative Polymerase Chain Reaction in Nucleophosmin 1 Type A Mutated Acute Myeloid Leukemia. *Genes, chromosomes & cancer*. 2016.
220. Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A, Del Poeta G, Panetta P, Neri B, et al. Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica*. 2007;92(5):605-11.
221. Buccisano F, Maurillo L, Del Principe MI, Del Poeta G, Sconocchia G, Lo-Coco F, et al. Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2012;119(2):332-41.

Nom : **BORIES**

Prénom : **Claire**

Date de Soutenance : **14 juin 2016**

Titre de la Thèse : **Intérêt de l'évaluation précoce de la maladie résiduelle par cytométrie en flux et biologie moléculaire (sur *WT1* et mutation de *NPM1*) dans les leucémies aiguës myéloïdes**

Thèse - Médecine - Lille 2016

Cadre de classement : Hématologie

DES + spécialité : *Hématologie – Maladies du Sang*

Mots-clés : **Leucémie aiguë myéloïde, maladie résiduelle, cytométrie en flux, RQ-PCR, *WT1*, *NPM1***

Résumé :

Contexte : Environ 80% des patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) obtiennent une rémission complète (RC) après cure d'induction intensive, mais les rechutes sont fréquentes. Un des objectifs de l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) est d'identifier les patients dont l'évolution sera péjorative. A ce jour, il n'existe pas de marqueur universel de suivi et la place de la cytométrie en flux (CMF) par rapport à la biologie moléculaire (BM) reste à définir.

Méthodes : 128 patients atteints de LAM (à l'exclusion des LAM promyélocytaires), âgés de 16 à 72 ans, ayant eu une évaluation de la MRD au cours de leur suivi et en RC après chimiothérapie d'induction ont été inclus dans cette étude rétrospective monocentrique. L'impact pronostique de la MRD précoce (post-induction ou pré-consolidation 1), évaluée en CMF par la quantification des LAIP (phénotypes aberrants associés à la leucémie) et/ou en BM par PCR quantitative en temps réel sur l'expression de *WT1* et *NPM1* muté, a été analysé sur la survie sans rechute (RFS) et la survie globale (OS), en censurant ou non les données de greffe.

Résultats : 11 patients ont bénéficié d'une évaluation précoce de la MRD, 84 en BM (84 sur *WT1*, 26 sur *NPM1* muté) et 75 en CMF. Une MRD négative (par CMF et/ou BM) est associée à une meilleure RFS ($p=0.0045$) et OS ($p=0.02$). La MRD-BM a un impact sur la RFS ($p=0,0005$) et l'OS ($p=0,0027$). Ces données restent significatives après censure à la greffe. La MRD-CMF n'a un impact sur la RFS qu'après censure des données à la greffe ($p=0.0494$). Après ajustement sur les autres facteurs pronostiques (âge, groupes pronostiques moléculaires, leucocytose, caractère secondaire de la LAM, et localisation extramédullaire au diagnostic), le statut de la MRD CMF et/ou BM et de la MRD-BM est significativement associé avec la RFS ($p=0.0026$ et $p=0.0013$ respectivement), avec ou sans censure des données à la greffe. D'autre part, la MRD-BM est un facteur pronostique indépendant de l'OS ($p=0.0483$). La MRD CMF et/ou BM a un impact pronostique indépendant sur l'OS après censure à la greffe ($p=0.0113$). La concordance des évaluations de MRD obtenues par BM et CMF est modérée ($\kappa=0.47$).

Conclusion : L'utilisation de la CMF augmente le nombre de patients suivis sur la MRD. L'évaluation précoce d'une MRD par CMF et/ou BM permettrait d'identifier les patients à haut risque de rechute et d'adapter leur prise en charge en proposant notamment des protocoles d'intensification plus précocement.

Composition du Jury :

Président : **Monsieur le Professeur Thierry FACON**
Assesseurs : **Monsieur le Professeur Bruno QUESNEL**
Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME
Monsieur le Docteur Florent DUMEZY
Directeur de Thèse : **Madame le Docteur Céline BERTHON**