

**MEMOIRE  
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES  
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 1<sup>er</sup> Octobre 2020  
Par Melle Sophie DERREUMAUX**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur  
tient lieu de**

**THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

---

**ANALYSE DE LA MALADIE RESIDUELLE DES LEUCEMIES AIGUES  
MYELOIDES PAR CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE, APPROCHE  
ALFA FRENCH GROUP 2017 : MISE EN PLACE AU CENTRE HOSPITALIER DE  
VALENCIENNES**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie POULAIN, PU-PH, CHU Lille

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME, PU-PH, CHU Lille  
Monsieur le Docteur Christophe ROUMIER, PH, CHU Lille  
Madame le Docteur Nathalie CAMBIER, PH, CH Valenciennes

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur Claire HEMAR, PH, CH Valenciennes





## Faculté de Pharmacie de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

### Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIÉ
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

### Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

## Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

## Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire
Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

### Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie

Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

### Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale

Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique

Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

### Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

### Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

### Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

### AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie

Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

### ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

## ***Faculté de Pharmacie de Lille***

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX  
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64  
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

**L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.**



## **Remerciements**

À ma présidente de jury de thèse,

### **Madame le Professeur Stéphanie Poulain**

*Professeur des Universités - Praticien Hospitalier  
Laboratoire d'Hématologie cellulaire  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

À mes assesseurs,

### **Monsieur le Professeur Claude Preudhomme**

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier  
Chef de service du laboratoire d'Hématologie  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail. Soyez assuré de mon profond respect et de toute ma considération.

### **Madame le Docteur Nathalie Cambier**

*Praticien Hospitalier  
Service d'Hématologie clinique  
Centre Hospitalier de Valenciennes*

Vous avez aimablement accepté de participer à ce jury de thèse. Je vous remercie pour l'attention que vous avez portée à ce travail. Soyez assurée de ma sincère reconnaissance.

### **Monsieur le Docteur Christophe Roumier**

*Praticien Hospitalier  
Laboratoire d'Hématologie cellulaire  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Je tiens sincèrement à vous remercier de m'avoir proposé ce sujet, pour toute l'aide que vous m'avez apporté pour l'élaboration de ce travail et pour les connaissances que vous m'avez transmises. J'ai été ravie de travailler avec vous et je vous exprime ici toute ma gratitude.

À ma directrice de thèse,

**Madame le Docteur Claire Hémar**

*Praticien Hospitalier*

*Laboratoire d'Hématologie*

*Centre Hospitalier de Valenciennes*

Merci Claire pour la confiance que tu m'as accordée dès le début en me proposant de travailler sous ta direction. Ta rigueur, ta disponibilité et ton implication dans ce travail a été une grande source de motivation pour moi et m'a permis d'aller au bout de cette thèse. Merci également pour ta gentillesse et pour ton aide aussi bien pour ce travail que pour tout ce que tu m'as appris au cours de cette dernière année d'internat. Je suis ravie d'avoir mené ce projet avec toi et te remercie sincèrement.

*Je tiens également à remercier,*

Monsieur le Docteur Florent Dumezy. Merci pour ta participation à l'élaboration de ce travail, pour le temps que tu nous as accordé et pour tes nombreux conseils.

Toute l'équipe du laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille, pour avoir participé à ma formation. Merci aux biologistes pour votre accueil et vos conseils lors de mon semestre passé chez vous et aux techniciens de cytométrie, pour votre aide indispensable lors de mes journées lilloises.

Toute l'équipe du laboratoire du CHU d'Amiens où j'ai tellement appris, je n'oublierais jamais ces deux premières années et demi passées chez vous. Je remercie particulièrement l'équipe du laboratoire d'Hématologie. Merci Éric et Véronique de m'avoir transmis la passion de la cytologie et de la cytométrie et Maïlys de m'avoir tant appris en hémostase. Je remercie aussi les techniciens qui ont tellement contribué à ma formation et spécialement à toi Jean-Marc, ton écoute et tes conseils toujours justes m'ont beaucoup fait avancer tant sur le plan professionnel que personnel. Merci pour tout.

Toute l'équipe du laboratoire du CH de Valenciennes. Je vous remercie pour votre accueil chaleureux, j'ai adoré terminer mon internat avec vous. Votre soutien, votre bonne humeur et vos conseils m'ont permis de pouvoir écrire dans les meilleures conditions. Je remercie particulièrement les techniciens de cytométrie qui m'ont laissée les envahir de nombreuses fois, pour votre confiance et votre implication dans ce projet sans laquelle il n'aurait pu aboutir. Merci aux biologistes Monsieur Bisiau, Claire, Lucas, Benoit et Audrey, je continue à apprendre chaque jour et je suis très heureuse de rejoindre votre équipe en Novembre. Un grand merci Lucas pour la relecture de ma thèse.

*Je dédie cette thèse,*

À tous mes co-internes et amis,

Ceux d'Amiens, là où tout a commencé, « loin » de chez moi, merci d'avoir fait de mon début d'internat, deux années (et même un peu plus) parfaites. Je ne compte pas les bons souvenirs. Merci pour cette ambiance incroyable qui régnait entre internes. Je pense particulièrement à Mathilde, Cédric, Laurine, Quentin, Julie, Geoffrey et Stacy. Merci à la coloc de l'enfer, Amandine, Quentin et Laurine, pour votre soutien et votre amitié depuis le début de cet internat, on a commencé ensemble et on termine ensemble. Merci pour tout.

Ceux de Lille, merci pour votre accueil, je ne pensais pas passer un tel semestre quand je suis arrivée dans cette promo déjà soudée. Merci au groupe du love, Adé, Max, Nico, Paupau, Augustin, Mélissa, Ben, Doriane, Alex, Dani, pour ces (trop longues) pauses cafés et les fous rires qui ont rythmé cet été. Une spéciale dédicace à Alex pour cette année passée en hématologie, merci pour ton aide et ton soutien et pour les cafés chauds qui m'attendaient souvent !

À mes amis,

Clara, Camille, Anaëlle et Laura pour ces nombreux étés en colo et les moments d'après qui resteront gravés et j'espère ne s'arrêteront jamais même s'ils se font plus rares.

La team pharma de Lille, ma binôme, Corentine, Solweig, Victoria, France, Cécilia, Nico, Manon, Louise avec qui j'ai passé ces années étudiantes inoubliables. Merci tout particulièrement aux Pow wow et nos soirées (et surtout journées) tarot : Anthéa, Maram, Jojo, Justine, merci d'être toujours présents ! Nanou, merci à toi aussi de m'avoir montré la voie, on était parties toutes les deux pour ouvrir notre pharmacie, nous voilà finalement (presque) biologistes.

Le groupe « Amis » qui porte tellement bien son nom, pour toutes ces soirées, week end et vacances passées et futures et tous ces souvenirs innombrables !! Des groupes comme celui-là, il n'y en a pas beaucoup ! Hélène, « poussin », merci d'être présente pour moi depuis si longtemps, ton amitié m'est tellement précieuse, merci pour ton soutien et pour la confiance que vous me faites avec Fabien de me confier cette place si importante auprès d'Alix.

Mes copines de toujours, Diane, Alix (et Jimmy), Agathe, Flore, Lucie et maintenant toutes les pièces rapportées Ced, Max, François, Louis, Tanguy. Je me rends compte de la chance que j'ai d'avoir des amis si fidèles et un groupe si soudé. Merci pour votre présence, votre écoute et votre soutien dans tous les moments importants !

## À ma famille,

À mes parents, à qui je dois tout. Merci de m'avoir toujours poussée, encouragée et soutenue dans tout ce que j'ai entrepris et pour la confiance que vous avez pour moi. Je suis fière d'avoir des parents comme vous. Merci pour tout.

À mes frère et sœurs :

Olivia, ce n'est pas forcément évident d'être la première mais tu nous as montré le bon chemin et donné les bons conseils. J'ai toujours admiré ta force ! Je suis très fière d'être la marraine de Jeanne, merci pour votre confiance avec Matthieu. Je pense aussi très fort à Agathe et Octave, quelle belle famille.

Céline, mon esprit scientifique je sais de qui je le tiens. Merci pour ton oreille attentive, tu trouves toujours les mots justes dans les bons comme dans les moins bons moments ! Merci d'être toujours présente même à quelques kilomètres de Lille... Sans oublier Seb et Victor, la famille continue de s'agrandir en beauté !

Et Paul-Henry, mon grand frère, « les petits », c'est fini maintenant mais je garde en mémoire tellement de bons moments et de fous rire. J'ai beaucoup appris de tes conseils, tout paraît si simple avec toi. Merci de votre soutien et de votre bienveillance avec Julie et Gabrielle.

Catherine, Jean, Mimi, Pierre et les garçons, Charlotte et Damien, merci pour votre générosité et votre accueil tout naturel dans la famille.

À toi, Antoine. Merci de m'avoir portée et supportée ces dernières semaines et de m'avoir redonné confiance quand je doutais. J'espère faire aussi bien pour toi maintenant. Merci de prendre soin de moi tous les jours (tu sais que je pense particulièrement à tes bons petits plats). J'ai hâte de continuer cette vie avec toi, des projets plein la tête.

## Abréviations

AA700	AlexA 700
AA750	AlexA 750
ADN	Acides DésoxyriboNucléiques
ALFA	<i>Acute Leukemia French Association</i>
APC	AlloPhycoCyanine
Ara-C	<i>Cytosine Arabinoside</i>
ARN	Acide RiboNucléique
ATO	<i>Arsenic TriOxide</i>
ATRA	<i>All Trans Retinoic Acid</i>
BC	Beckman Coulter
BD	Becton Dickinson
BIG	<i>Backbone Inter Group</i>
BiTE	<i>Bi-specific T-cell Engager</i>
BM	Biologie Moléculaire
BV421	<i>Brilliant Violet 421</i>
CAR-T	<i>Chimeric Antigen Receptor - T</i>
CBF	<i>Core Binding Factor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CHV	Centre Hospitalier de Valenciennes
CHU	Centre Hospitalier Universitaire
CIL	Cellule Initiatrice de Leucémie
CIVD	<i>Coagulation IntraVasculaire Disséminée</i>
CLP	<i>Common Lymphoid Progenitor</i>
CMF	CytoMétrie en Flux
CMP	<i>Common Myeloid Progenitor</i>
cMPO	MPO cytoplasmique
CN	Caryotype Normal
DART	<i>Dual-Affinity Re-Targeting (antibody)</i>
ddPCR	<i>droplet digital PCR</i>
DfN	<i>Different from Normal</i>
dim	Expression diminuée
ECD	<i>Phycoérythrine Texas Red</i>
ECOG	<i>Eastern Cooperative Oncology Group</i>
ECT	ÉCart Type
EDTA	Éthylène-Diamine-Tétra-Acétique
ELN	<i>European Leukemia Net</i>
FAB	<i>French-American-British</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	<i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>
FITC	<i>Fluorescein IsoThioCyanate</i>
FMO	<i>Fluorescence Minus One</i>
FSC ou FS	<i>Forward Scatter</i>

GB	Globules Blancs
GMP	<i>Granulocyte-Monocyte Progenitor</i>
GO	Gemtuzumab Ozogamicine
GR	Globules Rouges
HCT	<i>Hematopoietic stem Cell Transplantation</i>
HSC	<i>Hematopoietic Stem Cell</i>
ic	intra cytoplasmique
IDAC	<i>Intermediate-Dose Ara-C</i>
ITK	Inhibiteur de Tyrosine Kinase
KrO	Krome Orange
LA	Leucémie Aiguë
LAIP	<i>Leukemia-Associated Immuno Phenotype</i>
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoïde
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LAM-MRC	LAM avec anomalies liées aux myélodysplasies
LAM-t	LAM post chimiothérapie
LAP	Leucémie Aiguë Promyélocytaire
LDAC	<i>Low-Dose Ara-C</i>
LDH	Lactate DésHydrogénase
LL	Lymphome lymphocytaire
LLC	Leucémie Lymphoïde Chronique
LMC	Leucémie Myéloïde Chronique
LMD	<i>List Mode Data</i>
LMPP	<i>Lymphoid-primed MultiPotent Progenitor</i>
LSC	<i>Leukemik Stem Cell</i>
MEP	<i>Megakaryocyte-Erythroid Progenitor</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
MGG	May-GrünwaldGiemsa
MM	Myélome Multiple
MO	Moelle Osseuse
MOY	Moyenne
MPAL	<i>Mixt-Phénotype Acute Leukemia</i>
MPO	MyéloPérOxydase
MPP	<i>MultiPotent Progenitor</i>
MRC	<i>Medical Research Council</i>
MRD	<i>Minimal Residual Disease</i> (Maladie résiduelle minimale)
MT	Moelle Témoin
NAF	Fluorure de Sodium (NaF)
NASDA	Naphtol-ASD-Acétate
NFS	Numération Formule Sanguine
NK	Natural Killer
NGS	<i>Next-Generation Sequencing</i>
NOD-SCID	<i>Non Obese Diabetic-SCID</i>
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
ORL	Oto-Rhino-Laryngologie
OS	<i>Overall Survival</i>

PB	<i>Pacific Blue</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PC5.5	<i>Phycoérythrine Cyanine 5.5</i>
PC7	<i>Phycoérythrine Cyanine 7</i>
PCA	<i>Principal Component Analysis</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PE	<i>PhycoÉrythrine</i>
PMT	<i>PhotoMultiplier Tube</i>
PNB	<i>PolyNucléaire Basophile</i>
PNE	<i>PolyNucléaire Éosinophile</i>
PNN	<i>PolyNucléaire Neutrophile</i>
RC	<i>Rémission Complète</i>
RCP	<i>Réunion de Concertation Pluridisciplinaire</i>
RFS	<i>Relapse-Free Survival</i>
RTq-PCR	<i>Reverse Transcription quantitative - Polymerase Chain Reaction</i>
SCID	<i>Severe Combined ImmunoDeficiency</i>
SIL	<i>Système Informatique du Laboratoire</i>
SL-ICs	<i>SCID Leukemia - Initiating Cells</i>
SMC	<i>Splénomégalie Myéloïde Chronique</i>
SMD	<i>Syndrome MyéloDysplasique</i>
SMD-EB-2	<i>Syndrome MyéloDysplasique avec Excès de Blastés de type 2</i>
SMD-t	<i>SMD post chimiothérapie</i>
SMP	<i>Syndrome MyéloProlifératif</i>
SOM	<i>Self Organizing Map</i>
SSC ou SS	<i>Side SCatter</i>
TAM	<i>Transient Abnormal Myelopoiesis</i>
TE	<i>Thrombocytémie Essentielle</i>
TP53	<i>Tumor Protein 53</i>
TRM	<i>Treatment-Related Mortality</i>
t-SNE	<i>t-Stochastic Neighbourhood Embedding</i>



# Sommaire

Abréviations.....	17
Introduction.....	29
I- Généralités.....	31
1- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) .....	31
1.1- Définition et critères diagnostiques.....	31
1.2- Épidémiologie et facteurs prédisposant.....	31
1.3- Physiopathologie .....	32
1.3.1- Rappels sur l'hématopoïèse normale .....	32
1.3.2- Leucémogénèse dans les LAM .....	34
1.3.3- Rôle des niches hématopoïétiques .....	37
1.4- Circonstances diagnostiques.....	38
1.4.1- Insuffisance médullaire.....	38
1.4.2- Anomalies du bilan sanguin.....	38
1.4.3- Syndrome tumoral .....	39
1.5- Confirmation du diagnostic .....	40
1.5.1- Myélogramme.....	40
1.5.2- Immunophénotypage.....	42
1.5.3- Cytogénétique .....	43
1.5.4- Biologie moléculaire .....	46
1.6- Classification des LAM et néoplasies associées selon l'OMS 2016 .....	48
1.7- Facteurs pronostiques .....	49
1.7.1- Facteurs liés au patient .....	50
1.7.2- Facteurs liés à la pathologie.....	50
1.8- Traitement .....	55
1.8.1- Schémas thérapeutiques conventionnels.....	56
1.8.2- Thérapeutiques innovantes .....	59
2- La maladie résiduelle dans la leucémie aiguë myéloïde (MRD-LAM) .....	62
2.1- Concept et définition.....	62
2.2- Place de la biologie moléculaire pour l'évaluation la MRD-LAM.....	64
2.2.1- Marqueurs de suivi et techniques de quantification.....	64
2.2.2- Intérêt de la MRD-LAM en biologie moléculaire .....	66
2.2.3- Limites de la MRD-LAM en biologie moléculaire .....	67
2.3- Place de la Cytométrie en flux dans la MRD-LAM.....	68
2.3.1- Principe de la Cytométrie en flux.....	68
2.3.2- Stratégies d'analyse de la LAM en CMF .....	72
2.3.3- Points de suivi .....	82
2.3.4- Intérêts .....	83

2.3.5-	Limites de la MRD-LAM en CMF .....	84
2.3.6-	Perspectives : Analyse non supervisée .....	88
II-	Objectifs .....	91
III-	Matériel et méthodes .....	93
1-	Population étudiée et prélèvements.....	93
1.1-	Population de l'étude .....	93
1.2-	Prélèvements.....	93
1.3-	Recueil de données.....	94
2-	Mise en place d'un nouveau protocole LAM en CMF .....	94
2.1-	Matériel.....	94
2.1.1-	Cytomètres .....	94
2.1.2-	Logiciel .....	95
2.2-	Mise en miroir des cytomètres.....	95
2.3-	Évaluation de la dilution du prélèvement .....	95
2.4-	Choix du tampon de lyse .....	97
2.5-	Anticorps et fluorochromes utilisés .....	97
2.5.1-	Choix du panel d'anticorps .....	97
2.5.2-	Nature des anticorps utilisés .....	98
2.6-	Traitement des échantillons.....	99
2.7-	Acquisition au cytomètre.....	100
2.8-	Stratégie de réanalyse sur Kaluza® .....	100
2.8.1-	Contrôle des compensations.....	100
2.8.2-	Fenêtrage initial ou « <i>Gating</i> » .....	101
2.8.3-	Stratégie LAIP/DfN au diagnostic.....	107
2.8.1-	Stratégie LSC .....	109
2.8.1-	Données statistiques .....	110
3-	Constitution d'un « <i>merge</i> » de moelles normales.....	111
4-	Évaluation de la MRD LAM LAIP/DfN-LSC.....	113
4.1-	MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN .....	113
4.1.1-	Identification et quantification de la MRD .....	113
4.1.2-	Sensibilité et limite de détection de la technique .....	115
4.1.3-	Expression des résultats .....	116
4.2-	Approche LSC .....	117
4.2.1-	Identification et quantification des LSC .....	117
4.2.1-	Sensibilité et limite de détection de la technique .....	117
4.2.2-	Expression des résultats .....	118
4.3-	Approche en BM.....	119
4.3.1-	Marqueurs et techniques.....	119

4.3.2-	Seuils de positivité et sensibilité en MRD .....	119
4.4-	Analyse des données .....	119
5-	Analyses des données de MRD-LAM sur FlowSom .....	120
5.1-	Script « R » .....	120
5.2-	Stratégie de réanalyse MRD-LAM FlowSOM .....	122
5.3-	Analyse des données .....	124
IV-	Résultats.....	125
1-	Population étudiée et prélèvements.....	125
1.1-	Patients.....	125
1.2-	Population témoin .....	125
1.3-	Échantillons .....	126
2-	Protocole technique MRD-LAM .....	126
2.1-	Mise en miroir des cytomètres.....	126
2.2-	Choix du tampon de lyse .....	127
2.3-	Comparaison des anticorps utilisés .....	128
2.4-	Détermination des seuils P6/P7/P8 .....	130
3-	Sensibilité de la technique : épreuve de dilutions .....	131
3.1-	Sensibilité de la technique selon l'approche LAIP/DfN .....	131
3.2-	Sensibilité de la technique selon l'approche LSC .....	133
4-	Résultats de la MRD-LAM LAIP/DfN-LSC .....	137
4.1-	Caractéristiques des profils LAIP étudiés .....	137
4.2-	Caractéristiques des profils LSC étudiés.....	139
4.3-	Comparaison inter-centres des résultats .....	140
4.3.1-	Approche LAIP/DfN .....	140
4.3.2-	Approche LSC.....	143
5-	Etude de la concordance entre les résultats de MRD en CMF et ceux de BM .....	145
6-	Résultats de MRD-LAM sur FlowSOM.....	154
6.1-	Sélection des échantillons .....	154
6.2-	Comparaison des résultats selon les deux approches : conventionnelle et FlowSOM.....	154
V-	Discussion.....	159
VI-	Conclusion.....	171
	Annexe .....	173
	Bibliographie.....	177



## Index des figures

Figure 1 : Représentation schématique du processus de l'hématopoïèse.....	33
Figure 2 : Représentation schématique de la leucémogénèse : mutations et mécanismes (14).....	35
Figure 3 : Modèle hiérarchique et stochastique de leucémogénèse (15) .....	36
Figure 4 : Répartition des anomalies cytogénétiques au diagnostic de LAM ( <i>de novo</i> ou secondaire) sur une cohorte de 5876 patients âgés de 16 à 59 ans traités selon un protocole intensif (31,32) .....	44
Figure 5 : Anomalies moléculaires dans les LAM à caryotype normal de l'adulte (33) .....	46
Figure 6 : Impact des anomalies cytogénétiques sur la survie des patients adultes atteints de LAM (31) .....	52
Figure 7 : Impact des mutations CEBPA sur la survie des patients LAM-CN (41)....	53
Figure 8 : La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës (33) .....	63
Figure 9 : Stratégie habituelle de suivi de la MRD-LAM en biologie moléculaire (83) .....	66
Figure 10 : Distribution en fonction de l'âge de marqueurs moléculaires permettant un suivi MRD-LAM par RT-qPCR (78).....	68
Figure 11 : Représentation schématique de la focalisation hydrodynamique (documentation Beckman-Coulter, Service formation – version L - juillet 2014).....	69
Figure 12 : Position des différents types cellulaires selon la représentation Side Scatter/ Forward Scatter (SS/FS) (données internes CHV).....	70
Figure 13 : Représentation schématique d'un banc optique de cytomètre (Documentation Navios® Beckman Coulter, Service formation – version L - juillet 2014) .....	71
Figure 14 : Exemples de graphiques mono- et bi-paramétriques (données CHV)....	71
Figure 15 : Maturation granulocytaire normale (92).....	73
Figure 16 : Maturation monocyttaire normale (92).....	74
Figure 17 : Intensité d'expression physiologique des différents marqueurs au cours de la maturation granuleuse (A. Orfao, ELNet Flow MDS 2008, Amsterdam) .....	76
Figure 18 : Hétérogénéité clonale au sein d'une même population blastique (Atelier de l'Association Française de Cytométrie, 5 juin 2018. Plesa et Roumier).....	77
Figure 19 : Représentation schématique : stratégies de recherche MRD-LAM en CMF (93) .....	79
Figure 20 : LAM au diagnostic avec fréquence élevée de cellules CD34+/CD38- (données CHV).....	80
Figure 21 : Variations d'expression de différents paramètres entre les LSC et les HSC (50).....	82
Figure 22 : Valeur pronostique (impact sur la survie sans rechute) de l'approche LSC combinée à l'approche LAIP/DfN (50) .....	83
Figure 23 : Détermination des seuils d'expression de différents LAIP sur des moelles témoins (112).....	85
Figure 24 : Stratégie d'harmonisation multicentrique de la MRD-LAM en cytométrie en flux, pour l'intergroupe ALFA (Plesa et Roumier, communication écrite, ASH 2019) .....	86

Figure 25 : Exemples de résultats de contrôles inter-laboratoires de MRD-LAM de l'intergroupe ALFA – automates Navios® (Beckman Coulter) et Canto® (Becton Dickinson) (Plesa et Roumier, communication écrite ASH 2019) .....	87
Figure 26 : Exemple de représentation de données de CMF selon l'analyse FlowSOM (117) .....	89
Figure 27 : Stratégie d'analyse sur FlowSOM (114) .....	90
Figure 28 : Modification de compensation (exemple du tube 1) .....	101
Figure 29 : Contrôle de marquage FLx/SS (exemple du tube 1) .....	101
Figure 30 : « Nettoyage » de l'acquisition.....	102
Figure 31 : Identification des WBC45+ (A), des MNC (B) et des MNC34+ (C) .....	103
Figure 32 : Identification des granuleux en beige, blastes en rouge, monocytes en vert, et lymphocytes B et T en rose .....	103
Figure 33 : Identification des monocytes en turquoise et des lymphocytes en rose sur le tube 2.....	104
Figure 34 : Identification des hématogones en mauve dans le tube 1 .....	104
Figure 35 : Identification « indirecte » des hématogones en mauve dans le tube 2	105
Figure 36 : Compartiments P6/P7/P8 pour l'étude des cellules souches leucémiques (LSC) .....	106
Figure 37 : Fenêtre CD117± CD34±.....	107
Figure 38 : Exemple de masque LAIP .....	108
Figure 39 : Contrôle interne – seuil de significativité LSC .....	109
Figure 40 : Exemple de moelle avec phénotype LSC au diagnostic.....	110
Figure 41 : Expression physiologique du LAIP étudié .....	112
Figure 42 : Fenêtrage « <i>Time</i> » : sélection d'une (A) ou plusieurs (B) moelles de référence .....	113
Figure 43 : Recherche du LAIP étudié dans la moelle de suivi.....	114
Figure 44 : Sélection des populations cellulaires d'intérêt .....	121
Figure 45 : Fenêtrage « <i>Time</i> » .....	122
Figure 46 : Arborescences FlowSOM de la population CD34+ CD117+ .....	123
Figure 47 : Visualisation des différents métaclusters de la population CD34+ CD117+ .....	123
Figure 48 : Distribution des métaclusters de la population CD34+ CD117+ dans une moelle de LAM en rechute par rapport à un pool de moelles de référence .....	124
Figure 49 : Passage des billes FlowSet® au CHV (cibles du CHU de Lille) .....	127
Figure 50 : Comparaison des profils de fluorescence obtenus avec les différentes lyses .....	128
Figure 51 : Comparaison des médianes de fluorescence obtenues avec les différentes lyses.....	128
Figure 52 : Comparaison des médianes de fluorescence MFI obtenues entre les 2 sites (anticorps liquides et Duraclones®) .....	129
Figure 53 : Comparaison des médianes de fluorescence MFI obtenues entre les 2 sites (anticorps liquides) .....	129
Figure 54 : Réglage du seuil P6/P7 par l'approche FMO ( <i>Fluorescence Minus One</i> ) .....	130
Figure 55 : Réglage du seuil P7/P8 .....	130
Figure 56 : Réglage du seuil de positivité du CD34.....	131

Figure 57 : « Boîtes » finales P6/P7/P8 pour l'étude des cellules souches leucémiques (LSC) .....	131
Figure 58 : Profil phénotypique étudié pour l'épreuve de dilutions : LAIP au diagnostic .....	132
Figure 59 : Résultats de l'épreuve de dilutions (approche LAIP) .....	132
Figure 60 : Courbe d'étalonnage de l'épreuve de dilutions réalisée sur le tube d'orientation (approche LAIP).....	133
Figure 61 : Profil phénotypique utilisé pour l'épreuve de dilution : profil LSC au diagnostic .....	134
Figure 62 : Résultats de l'épreuve de dilutions (approche LSC) .....	135
Figure 63 : Courbe d'étalonnage de l'épreuve de dilution réalisée sur le tube LSC	136
Figure 64 : Exemples de différents types de LAIP .....	139
Figure 65 : Cinétique de la MRD-LAM-CMF du patient 15 .....	152
Figure 66 : Cinétique de la MRD-LAM-CMF du patient 13 .....	153
Figure 67 : Résultat d'une MRD négative par l'approche FlowSOM (patient 10)....	155
Figure 68 : Résultat d'une MRD positive (rechute) (patient 15) par l'approche DfN (switch phénotypique) ; approche FlowSOM .....	156
Figure 69 : Résultat d'une MRD positive (MRD1) par l'approche FlowSOM (patient 21) .....	157

## **Index des tableaux**

Tableau 1 : Classification des LAM selon le groupe French-American-British (FAB) (27,28) .....	41
Tableau 2 : Expression des marqueurs de surface cellulaire et cytoplasmique pour le diagnostic de LAM et MPAL (22) .....	43
Tableau 3 : Classification des LAM - OMS 2016 (10).....	49
Tableau 4 : Groupes pronostiques cytogénétiques du <i>Medical Research Council</i> (MRC) (31).....	51
Tableau 5 : Classification génétique pronostique des LAM selon l'ELN (22).....	54
Tableau 6 : Marqueurs de biologie moléculaire utilisables en suivi de la MRD-LAM	65
Tableau 7 : Marqueurs d'intérêt pour l'identification des LSC (107) .....	81
Tableau 8 : Cibles FlowSet® du CHU de Lille .....	95
Tableau 9 : Panel d'anticorps recommandé par le groupe CMF-LAM BIG ALFA .....	97
Tableau 10 : Tube 4 du panel LAM sur moelle au diagnostic (CHV) .....	98
Tableau 11 : Protocole de dilutions pour le calcul de la sensibilité - Exemple du tube 1 .....	116
Tableau 12 : Principales caractéristiques des moelles témoins (MT) .....	125
Tableau 13 : Description des LAIP étudiés et expression physiologique.....	137
Tableau 14 : Profil des cellules souches leucémiques (LSC) étudiés.....	140
Tableau 15 : Comparaison inter-opérateur des résultats de MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN .....	140
Tableau 16 : Comparaison inter-opérateur de la stratégie de réanalyse du protocole MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN .....	142
Tableau 17 : Comparaison inter-opérateur de la stratégie de réanalyse du protocole MRD-LAM selon l'approche LSC.....	144
Tableau 18 : Résultats de l'analyse de MRD-LAM en CMF et en BM .....	146
Tableau 19 : Patients présentant une MRD positive en BM et négative en CMF ...	147
Tableau 20 : Evaluation de la MRD-LAM par l'approche FlowSOM et comparaison avec l'approche conventionnelle.....	154

## **Annexe**

Tableau 21 : Anticorps utilisés pour la mise en place de la MRD-LAM-CMF.....	173
Tableau 22 : Caractéristiques au diagnostic des patients inclus dans ce travail ....	174

## Introduction

Les leucémies aiguës (LA) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies caractérisées par l'expansion clonale et non contrôlée de précurseurs appelés « blastes ». On distingue classiquement deux grandes catégories de leucémies aiguës : les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL).

La place de la cytométrie en flux (CMF) dans la prise en charge diagnostique et le suivi de ces hémopathies est devenue incontournable. Elle permet une analyse qualitative précise des cellules leucémiques au diagnostic, ainsi que la détection de petits clones leucémiques responsables ultérieurement de rechute dans le cadre de la recherche de maladie résiduelle (MRD).

Le développement de la cytométrie multiparamétrique permet la détection d'une cellule leucémique parmi 1 000 à 10 000 cellules analysées, via l'étude de l'expression aberrante d'antigènes par les blastes leucémiques (immunophénotype associé aux leucémies, LAIP). Cette stratégie basée sur l'immunophénotype des blastes au diagnostic présente néanmoins certaines limites liées à l'hétérogénéité phénotypique des cellules leucémiques dans les LAM. En effet, une expression aberrante d'antigène n'est pas systématiquement présente sur l'ensemble des blastes au diagnostic. De plus, une évolution phénotypique des blastes est fréquemment observée au cours du temps, rendant le suivi en CMF difficile. Il est alors impératif pour le biologiste de bien connaître les chemins phénotypiques de maturation « normaux » afin d'identifier les blastes leucémiques par leurs déviations phénotypiques (stratégie DfN, *Different from Normal*), indépendamment du phénotype au diagnostic. Ces deux stratégies (LAIP, DfN), partiellement superposables utilisent un panel d'anticorps associant à la fois des marqueurs d'immaturité, des marqueurs myéloïdes et des marqueurs aberrants. Enfin, plus récemment, d'autres marqueurs ciblant notamment les cellules souches leucémiques (LSC) sont en cours d'étude dans le cadre de la MRD-LAM, en complément des approches LAIP et DfN.

Malgré les progrès réalisés en cytométrie multiparamétrique, les techniques d'évaluation de la MRD-LAM en CMF souffrent cependant toujours d'un défaut de standardisation et il n'existe à l'heure actuelle pas de réel consensus sur le panel

d'anticorps devant être utilisé, le seuil de positivité et le protocole technique à adopter. Ces limites restreignent l'utilisation de la MRD-LAM par cytométrie en flux à quelques laboratoires spécialisés. Ceci a conduit l'intergroupe Français des LAM à réaliser un travail de standardisation dans la mise en place d'un panel de suivi de la MRD en CMF multiparamétrique (approche conjointe LAIP/DfN et LSC) : stratégie actuellement utilisée pour le suivi de la MRD des patients LAM de deux études cliniques BIG-1 et ALFA-1200.

La première étape de ce travail a consisté à mettre en place au Centre Hospitalier de Valenciennes (CHV), le protocole MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN-LSC de l'intergroupe ALFA, en cytométrie multiparamétrique 10 Couleurs. Dans le cadre d'un travail de standardisation inter centres, nous avons ensuite comparé les résultats de MRD-LAM obtenus en cytométrie en flux au Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille et au CHV. Puis, un recueil des données obtenues en CMF et en biologie moléculaire (BM) a permis une comparaison des techniques pour l'évaluation de la MRD-LAM. Enfin, nous avons souhaité tester l'utilisation d'algorithmes d'analyses non supervisées capables de traiter simultanément un grand nombre de paramètres et s'affranchir de la subjectivité de l'opérateur.

## I- Généralités

### 1- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

#### 1.1- Définition et critères diagnostiques

Les leucémies aiguës myéloïdes sont caractérisées par l'accumulation de précurseurs de nature myéloïdes (myéloblastes), bloqués à un stade de maturation, ayant perdu leur capacité de différenciation et s'accumulant dans la moelle osseuse, le sang et éventuellement d'autres tissus (1).

#### 1.2- Épidémiologie et facteurs prédisposant

Les LAM sont des pathologies rares mais elles représentent environ 80% des leucémies aiguës de l'adulte. En 2018, les taux d'incidence standardisés sur la population mondiale sont de 2,3 pour 100 000 chez les femmes (F) et 3,1 pour 100 000 chez les hommes (H), ce qui correspond à un sex-ratio H/F de 1,3. Les LAM touchent en majorité les personnes âgées et l'âge médian au diagnostic est de 72 ans pour les femmes et 69 ans pour les hommes (2).

Plusieurs facteurs prédisposant sont aujourd'hui connus :

- *certaines syndromes génétiques* (3) sont associés à un risque accru de développer une LAM – en particulier les LAM infantiles - tels que le syndrome de Down (trisomie 21) (4), certaines maladies associées à un défaut de réparation de l'ADN (anémie de Fanconi, syndrome de Bloom, ataxie télangiectasie), la maladie de von Recklinghausen, l'anémie de Blackfan-Diamond, le syndrome de Shwachman-Diamond (5), le syndrome de Wiskott-Aldrich, le syndrome de Klinefelter, la trisomie 8 (liste non exhaustive)
- *L'exposition à un certain nombre d'agents chimiques* tels que le benzène (6)
- *L'exposition à des radiations ionisantes* de façon accidentelle ou dans un cadre thérapeutique (radiothérapie)

Pour la plupart des patients atteints de leucémie aiguë, la cause de la maladie est néanmoins inconnue.

Des LAM secondaires peuvent survenir chez des patients avec antécédent d'hémopathie maligne ou d'exposition à des thérapies ou agents leucémogènes. Les patients aux antécédents de syndrome myélodysplasique (SMD) ou de syndrome myéloprolifératif (SMP) présentent ainsi un risque accru d'acutisation en LAM (7).

Certaines chimiothérapies telles que les agents alkylants ou anthracyclines sont plus susceptibles de favoriser le développement d'une LAM dans les années suivant le traitement.

Enfin, plus rarement, certaines mutations germinales ont été décrites dans les LAM et sont associées à un risque accru de développer la maladie. On parle alors de LAM familiales (8,9). Celles-ci sont parfois associées à des anomalies plaquettaires ou à d'autres dysfonctions d'organes, et sont répertoriées dans la classification OMS 2016 révisée, dans la catégorie des néoplasmes myéloïdes avec prédisposition germinale (10).

### **1.3- Physiopathologie**

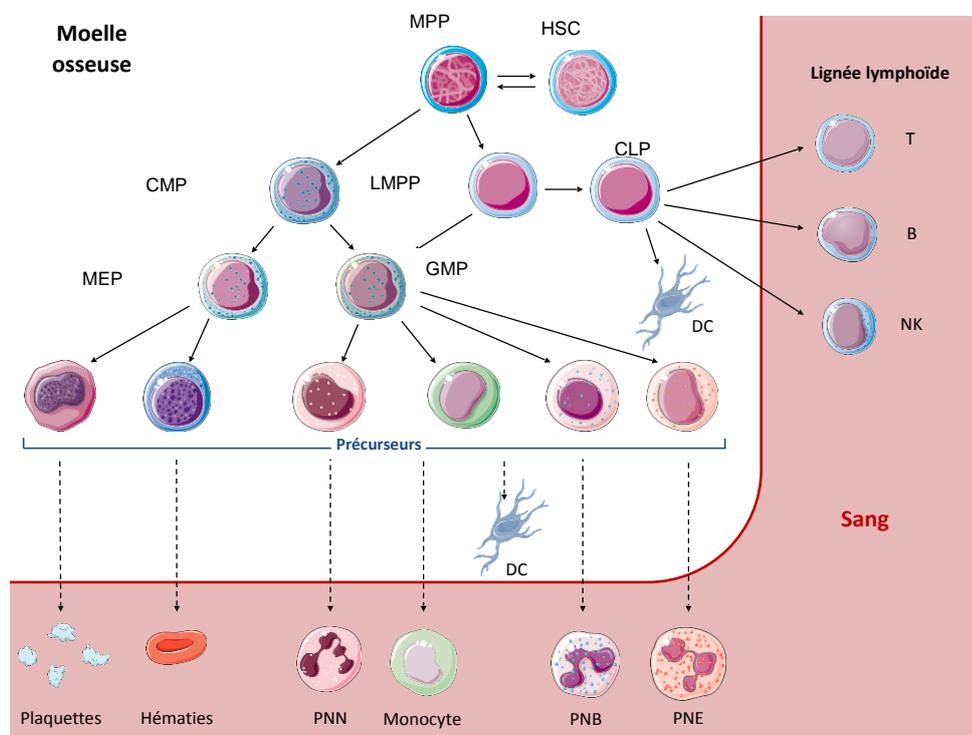
#### 1.3.1- Rappels sur l'hématopoïèse normale

L'hématopoïèse est le processus qui permet à partir de cellules souches hématopoïétiques (HSC), la synthèse de l'ensemble des cellules du sang : les globules rouges, les plaquettes et les leucocytes (polynucléaires, lymphocytes, monocytes). Les cellules souches présentent différentes caractéristiques : pluripotentialité, capacité d'auto-renouvellement, propriété de quiescence qui les protège des agressions (radiothérapie et chimiothérapie notamment) et capacité de reconstitution *in vivo* de l'hématopoïèse après injection chez des souris immunodéficientes (SCID) ou NOD-SCID (*non obese diabetic-SCID*).

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC), multipotentes ont ainsi la capacité de s'auto-renouveler et de donner naissance à des progéniteurs multipotents (MPPs, *MultiPotent Progenitors*) capables de se multiplier et de se différencier en progéniteurs plus avancés : soit en LMPP (*Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor*), soit en CMP (*Common Myeloid Progenitors*). Ces progéniteurs donnent naissance à des progéniteurs de plus en plus différenciés de la lignée lymphoïde : CLP (*Common Lymphoid Progenitor*) et de la lignée granulocytaire, via leur

différenciation en MEP (*Megakaryocyte-Erythroid Progenitor*), progéniteur des lignées mégacaryocytaire et érythroïde, ou en GMP (*Granulocyte-Monocyte Progenitor*), pour aboutir aux éléments matures du sang (11).

Une représentation schématique de l'hématopoïèse est présentée en figure 1.



**Figure 1 : Représentation schématique du processus de l'hématopoïèse**

*HSC : Hematopoietic Stem Cell ; MPP : MultiPotent Progenitors ; CMP : Common Myeloid Progenitors ; LMPP : Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor ; CLP : Common Lymphoid Progenitor ; MEP : Megakaryocyte-Erythroid Progenitor ; GMP : Granulocyte-Monocyte Progenitor ; DC : Dendritic Cell ; PNN : Polynucléaire Neutrophile ; PNB : PolyNucléaire Basophile ; PNE : PolyNucléaire Eosinophile ; NK : Natural Killer*

Néanmoins, bien que l'organisation générale de l'hématopoïèse soit connue, les interconnexions entre les progéniteurs sont encore aujourd'hui soumises à controverse avec plusieurs modèles proposés sans stricte séparation entre les progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et les progéniteurs lymphoïdes communs (LMPP) comme décrit dans le modèle « courant » (11) (figure 1).

Par ailleurs, afin que l'hématopoïèse puisse se faire, de nombreuses conditions doivent être remplies à commencer par la présence d'un microenvironnement spécifique, on parle de niche hématopoïétique. Cette structure anatomique et fonctionnelle est composée d'un certain nombre d'éléments cellulaires (cellules stromales, ostéoblastes, adipocytes, macrophages...) ce qui lui permet d'assurer la

maintenance, la mobilisation et la régulation des fonctions des CSH. Chez l'adulte sain l'hématopoïèse a lieu dans la moelle osseuse tout au long de la vie.

L'intervention de facteurs d'adhésion, de facteurs de croissance et de transcription, de récepteurs et de voies de transduction du signal est également indispensable afin de maintenir une hématopoïèse normale (12).

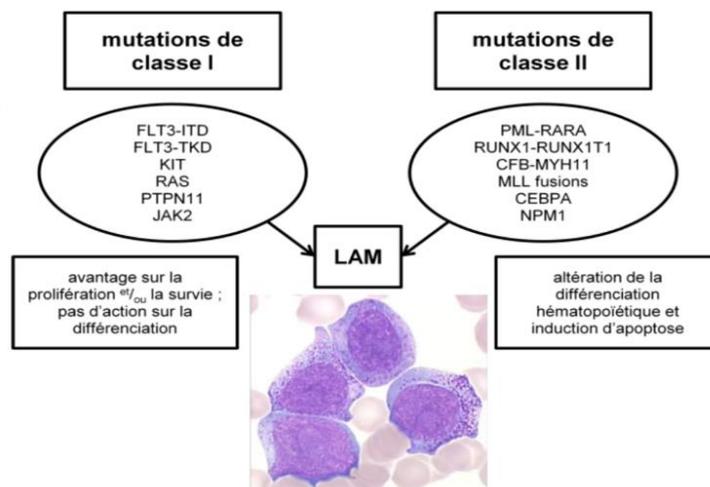
### 1.3.2- Leucémogénèse dans les LAM

#### *a. Aspects moléculaires : le « two-hit model »*

La leucémogénèse est définie par l'ensemble des mécanismes à l'origine de la transformation des cellules normales en cellules leucémiques. En 2002, Gilliland DG *et al*, proposent un modèle à deux évènements : le « two-hit model » (13) selon lequel les anomalies moléculaires responsables d'une part de l'arrêt de différenciation des progéniteurs hématopoïétiques, et d'autre part, d'un excès de prolifération pourraient coopérer pour aboutir à une leucémie. La coexistence d'au moins deux de ces altérations géniques serait nécessaire à l'apparition de la LAM (figure 2) :

- *Une mutation de classe I* : activation constitutive de récepteurs de surface (*RAS*, récepteurs tyrosine kinase comme *FLT3* ou *c-KIT*) qui confère un avantage prolifératif et de survie aux cellules leucémiques.

- *Une mutation de classe II* : mutations de facteurs de transcription ou de co-activateurs responsables d'un blocage de la différenciation myéloïde. La translocation t(8;21) aboutissant à la formation du gène de fusion *RUNX1-RUNX1T1* en est un exemple.



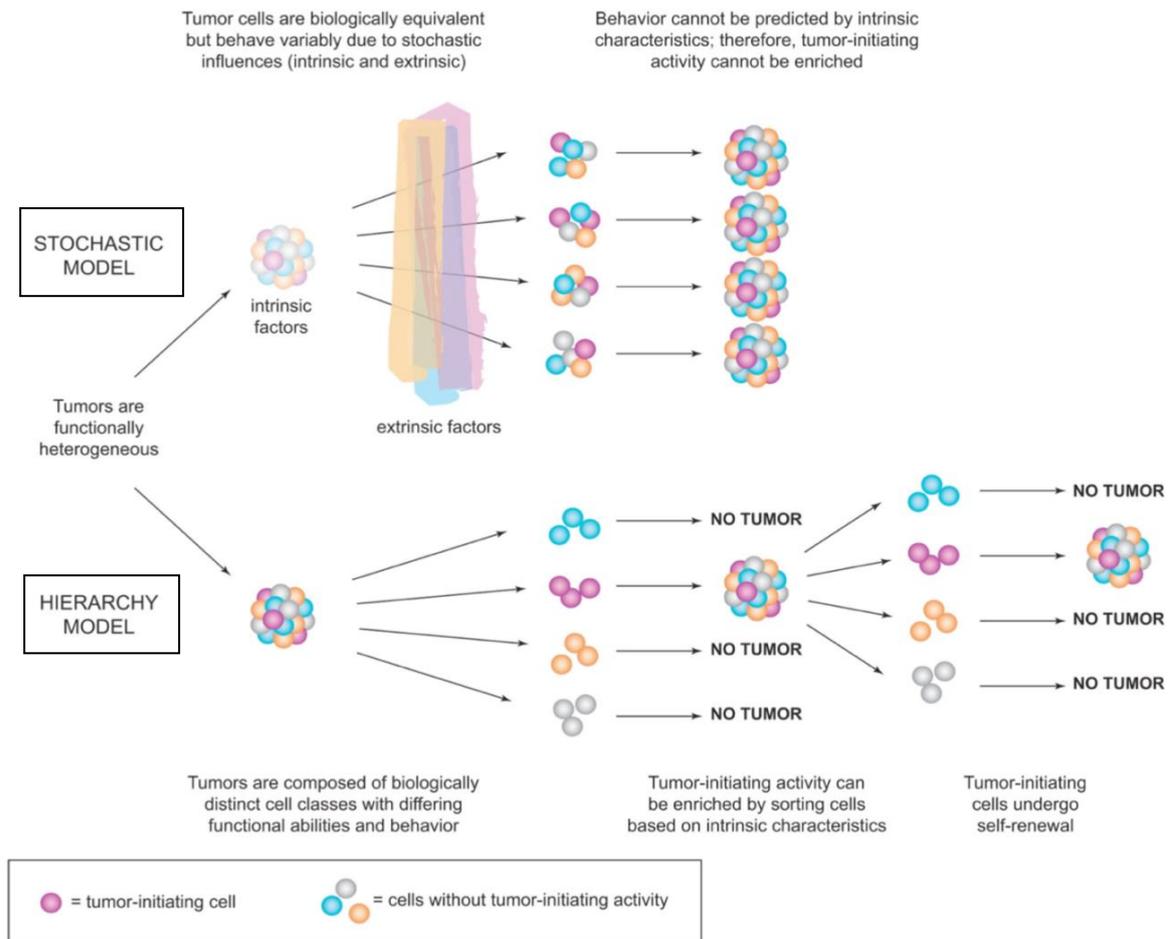
**Figure 2 : Représentation schématique de la leucémogénèse : mutations et mécanismes (14)**

Deux types de mutations peuvent être impliqués dans la leucémogénèse des LAM : mutations de classe I favorisant la prolifération et/ou la survie et mutations de classe II altérant la différenciation ou induisant l'apoptose.

*b. Hétérogénéité fonctionnelle des LAM : modèle stochastique et hiérarchique*

Les LAM présentent une grande hétérogénéité en termes de morphologie, de phénotype, sur le plan génétique, prolifératif et fonctionnel. Deux modèles (figure 3) ont été décrits pour expliquer l'hétérogénéité fonctionnelle des LAM (15) :

- Le modèle stochastique
- Le modèle hiérarchique



**Figure 3 : Modèle hiérarchique et stochastique de leucémogénèse (15)**

Le modèle **stochastique** (en haut de la figure) est une théorie selon laquelle toutes les cellules tumorales pourraient être biologiquement équivalentes et que l'hétérogénéité découle d'influences plus ou moins aléatoires, extrinsèques ou intrinsèques. Cela induit que le comportement cellulaire ne peut être prédit par ses caractéristiques intrinsèques.

Le modèle **hiérarchique** (en bas de la figure) implique une leucémogénèse mimant l'hématopoïèse physiologique, avec présence à son sommet de certaines cellules souches leucémiques (LSC) ayant des caractéristiques proches des HSC physiologiques : capacités d'auto-renouvellement, de pluripotentialité et de quiescence. Selon cette théorie, il est alors possible d'induire une prolifération tumorale à partir d'une fraction cellulaire initiatrice de leucémie.

### c. Les cellules souches leucémiques (LSC)

Les LSC (ou CIL : cellules initiatrices de la leucémie) ont été mises en évidence dans les LAM pour la première fois en 1994 par Dick et son équipe (16). En effet, ils ont reproduit la leucémogénèse à partir d'un modèle de xénotransplantation de cellules de moelle osseuse de LAM chez des souris immunodéficientes (SCID).

Les LSC présentent beaucoup de similitudes avec les HSC physiologiques : capacités de différenciation, de prolifération et potentiel d'auto-renouvellement, leur

permettant de maintenir la croissance du clone leucémique à long terme *in vivo*. Elles partageraient par ailleurs un immunophénotype commun CD34+ CD38- avec les CSH normales (16). Les LSC résisteraient également mieux à l'apoptose, présenteraient une sensibilité *in vitro* réduite à la chimiothérapie et une expression accrue des gènes de multirésistance aux médicaments. Ces caractéristiques pourraient expliquer un taux de rechute élevé dans les LAM (17). En effet, les chimiothérapies actuelles restent peu efficaces sur ce compartiment cellulaire, ciblant les cellules possédant des capacités de prolifération, et épargnant les LSC, quiescentes pour la plupart (18).

Si les LSC présentent beaucoup de similitudes avec les HSC normales, les travaux de Goardon *et al.* montrent que les LSC retrouvées dans les LAM CD34+ (environ 80% des LAM) sont phénotypiquement très proches des GMP (CD34+ CD38- CD90- CD45RA+) ou, moins fréquemment, des LMPP (CD34+ CD38- CD90- CD45RA-). Ils suggèrent ainsi que dans la plupart des cas de LAM CD34+, la leucémie serait une pathologie de progéniteurs où les LSC auraient acquis un potentiel d'auto-renouvellement anormal (19).

Par ailleurs, si les travaux de xéno greffe ont montré le rôle fondamental de la fraction CD34+ CD38- dans l'initiation de la leucémie (16), le postulat selon lequel les LSC proviendraient uniquement de ce compartiment est contesté. En effet, des modèles de LAM réalisés chez des souris immunodéprimées ont montré que des compartiments plus matures CD38+ ou CD34- pouvaient également contenir des cellules initiateuses de leucémies après transplantation (20).

### 1.3.3- Rôle des niches hématopoïétiques

Les niches hématopoïétiques présenteraient un rôle à la fois dans la prolifération des cellules leucémiques de LAM, l'adhésion, mais aussi dans la résistance aux chimiothérapies. En effet, malgré les chimiothérapies intensives et l'allogreffe de HSC, la survie globale dans les LAM reste pauvre. Plusieurs travaux expérimentaux ont permis d'étayer l'hypothèse d'une implication des niches dans la leucémogénèse et la résistance aux traitements. Une inhibition des interactions cellulaires et moléculaires entre la niche médullaire et les cellules leucémiques constituerait ainsi une piste prometteuse de thérapie ciblée.

En effet, dans les LAM, le remodelage des niches hématopoïétiques conduit à un

environnement favorable à la prolifération et la survie des LSC et des cellules leucémiques (21). Une meilleure connaissance des interactions entre ces niches et les cellules leucémiques pourrait constituer une cible thérapeutique permettant d'améliorer la survie des patients atteints de LAM.

#### **1.4- Circonstances diagnostiques**

##### 1.4.1- Insuffisance médullaire

L'insuffisance médullaire est définie par un défaut de production des cellules matures myéloïdes circulantes, d'apparition aiguë ou progressive. Dans les leucémies aiguës, elle est brutale et secondaire à l'envahissement de la moelle osseuse par les blastes.

*Le syndrome anémique* est souvent mal toléré car d'installation rapide et peut provoquer une asthénie importante et une dyspnée à l'effort. L'examen clinique peut mettre en évidence une tachycardie, une pâleur cutanéomuqueuse, des vertiges et bourdonnements d'oreille.

*Le syndrome infectieux* est lié à la neutropénie. La symptomatologie est variable : allant de la fièvre isolée, à des manifestations de la sphère ORL ou sans caractère clinique spécifique, pouvant aller jusqu'au sepsis sévère.

*Le syndrome hémorragique* lié en premier lieu à la thrombopénie peut provoquer des manifestations cutanéomuqueuses de type purpura, épistaxis, gingivorragies ou des hémorragies extériorisées.

##### 1.4.2- Anomalies du bilan sanguin

La numération formule sanguine (NFS) associe fréquemment une hyperleucocytose avec blastes circulants et plusieurs cytopénies, orientant rapidement vers un diagnostic de leucémie aiguë. L'atteinte peut porter d'emblée sur les trois lignées avec un tableau de pancytopenie, mais elle peut être dissociée et n'atteindre qu'une ou deux lignées. L'anémie est quasi-constante, d'intensité variable, elle est classiquement normochrome, arégénérative, normo ou macrocytaire. Une neutropénie et une thrombopénie souvent profonde sont fréquemment retrouvées.

La leucocytose est très inconstante : elle peut aller de la leucopénie à l'hyperleucocytose franche supérieure à 100G/L. La blastose est variable : quasi constante dans les formes hyperleucocytaires, elle peut être absente en cas de leucopénie. Une hyperleucocytose blastique élevée peut constituer une urgence thérapeutique en raison du risque de syndrome de leucostase.

L'examen attentif du frottis sanguin est au centre du diagnostic. Deux éléments entrent en compte pour le diagnostic de LA : le pourcentage de blastes et leur aspect cytologique (22). La présence de granulations ou de signes de dysmyélopoïèse associés font suspecter une origine myéloblastique. Des blastes avec corps d'Auer permettent par ailleurs de confirmer le caractère malin des blastes et leur nature myéloïde (23).

Un bilan d'hémostase doit être réalisé de façon systématique à la recherche de signes de CIVD débutante ou déclarée pouvant être observée dans les leucémies aiguës promyélocyaires (LAP) et les LAM hyperleucocytaires (24).

Le bilan biochimique peut mettre en évidence un syndrome de lyse tumoral associant hyperuricémie, hyperphosphorémie, hypercalcémie, hyperkaliémie et augmentation des lactates déshydrogénases (LDH). Le risque majeur est de développer une insuffisance rénale aiguë.

#### 1.4.3- Syndrome tumoral

Le syndrome tumoral est inconstant, les adénopathies sont rares. Des atteintes extra-médullaires telles que la présence de chlorome ou sarcome granulocyttaire peuvent être observées dans les LA à composante monocyttaire et correspondent à des tumeurs de localisation souvent cutanée, orbitaire ou encore gingivale. Une splénomégalie est également rencontrée dans 15 à 20% des cas de LAM et peut orienter également vers une LA à composante monocyttaire.

D'autres manifestations moins spécifiques des LAM peuvent être observées telles que des douleurs osseuses ou des atteintes neuroméningées. Un syndrome de leucostase peut également être rencontré en cas de LAM fortement hyperleucocyttaire. Le syndrome de leucostase doit ainsi être évoqué devant la présence de signes de dyspnée ou signes neuroméningés de type hémorragie intracérébrale et constitue un critère de mauvais pronostic (25,26).

## 1.5- Confirmation du diagnostic

### 1.5.1- Myélogramme

Le myélogramme est indispensable au diagnostic et à la classification des leucémies aiguës. Outre la réalisation de frottis médullaires destinés à l'analyse cytologique et cytochimique, plusieurs échantillons sont prélevés pour analyse immunophénotypique, cytogénétique et de biologie moléculaire (23).

L'analyse cytologique permet de confirmer le diagnostic en cas d'infiltration médullaire supérieure ou égale à 20%. Le diagnostic de LAM peut également être posé quand le pourcentage de blastes dans le sang ou la moelle est inférieur à 20% en présence des anomalies cytogénétiques suivantes (22) :

- translocation  $t(15;17)(q22;q12)$  (réarrangement des gènes *RARA* et *PML*) ;
- translocation  $t(8;21)(q22;q22)$  (réarrangement des gènes *RUNX1* et *RUNX1T1*) ;
- translocation  $t(16;16)(p13.1;q22)$  ou inversion  $inv(16)(p13.1q22)$  (réarrangement des gènes *CBFB* et *MYH11*).

Des examens cytochimiques complémentaires peuvent être réalisés :

- Cytochimie à la myéloperoxydase (MPO) affirme la nature myéloïde de la leucémie aiguë.
- Réaction cytochimique aux estérases non spécifiques (NASDA) en cas de suspicion de LA à composante monocytaire, inhibée en présence de fluorure de sodium (NAF) (inhibition spécifique)

Enfin, la présence de signes de dysmyélopoïèse est en faveur d'une origine myéloïde et peut orienter vers une myélodysplasie préexistante ou associée.

Proposé en 1976, puis révisé en 1985, le système de la classification *French American British* (FAB) basé sur les critères morphologiques des blastes et le stade de maturation des cellules permet de classer les LAM en 8 types et sous-types (tableau 1) (27,28).

**Tableau 1 : Classification des LAM selon le groupe French-American-British (FAB) (27,28)**

Types/Sous-types	Nom	Caractéristiques
<b>LAM0</b>	LAM avec différenciation minimale	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blastes <math>\geq 90\%</math> (MO)</li> <li>- Indifférenciés</li> <li>- Réaction MPO négative</li> </ul>
<b>LAM1</b>	LAM sans maturation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blastes <math>\geq 90\%</math> (MO)</li> <li>- Avec ou sans granulations</li> <li>- Réaction MPO positive</li> </ul>
<b>LAM2</b>	LAM avec maturation	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blastes 20-90% (MO)</li> <li>- Avec granulations/corps Auer</li> <li>- +/- myélodysplasie</li> <li>- Réaction MPO positive</li> <li>- Persistance de différenciation granulocytaire (<math>\geq 10\%</math>)</li> </ul>
<b>LAM3 LAM3v</b>	LAM promyélocytaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blastes 20-90% souvent hypergranuleux (MO)</li> <li>- Corps d'Auer <b>en fagots</b></li> <li>- Réaction MPO positive</li> <li>- Forme variante hypogranuleuse</li> </ul>
<b>LAM4 LAM4éo</b>	LA myélomonocytaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Similaire LAM2</li> <li>- <b>+Monocytose sanguine <math>\geq 5G/L</math> Ou médullaire <math>\geq 20\%</math></b></li> <li>- Forme variante avec excès (MO) d'éosinophiles dysplasiques</li> <li>- Réaction MPO faiblement positive ou négative</li> <li>- Réaction NASDA positive et inhibée par NAF</li> </ul>
<b>LAM5 - 5a - 5b</b>	LA monoblastique - LAM5 peu différenciée - LAM5 différenciée	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Lignée monocytaire <math>\geq 80\%</math> (MO)</li> <li>- Monoblastes <b>5a</b></li> <li>- Promonocytes/monocytes <b>5b</b></li> <li>- Réaction MPO faiblement positive ou négative</li> <li>- Réaction NASDA positive et inhibée par NAF</li> </ul>
<b>LAM6</b>	Erythroleucémie * N'existe plus dans la classification OMS 2016, seule persiste la LA érythroïde pure	<ul style="list-style-type: none"> <li>- <math>\geq 50\%</math> d'érythroblastes <b>et</b> <math>\geq 20\%</math> blastes myéloïdes au sein de la granulo-monopoïèse (MO)</li> <li>- Dysérythropoïèse</li> </ul>
<b>LAM7</b>	LA mégacaryocytaire	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Blastes <math>\geq 20\%</math> ; au moins la moitié de mégacaryoblastes (MO)</li> <li>- Myélofibrose</li> </ul>

MO : Moelle Osseuse

### 1.5.2- Immunophénotypage

L'immunophénotypage est une étape incontournable du diagnostic des leucémies aiguës. Il consiste à rechercher par technique de cytométrie en flux l'expression par les cellules leucémiques de divers antigènes de différenciation membranaires ou intra-cytoplasmiques à l'aide d'anticorps spécifiques couplés à un fluorochrome.

Complément indispensable de l'analyse cytologique sanguine et médullaire, il permet de confirmer l'appartenance de la population blastique à une lignée et permet d'apprécier le stade de blocage des blastes dans leur différenciation (29). Enfin, certains antigènes étudiés en cytométrie en flux peuvent être la cible d'anticorps monoclonaux utilisés dans certaines thérapies ciblées. L'étude de leur expression peut donc être utile à des fins thérapeutiques. C'est le cas notamment du Gemtuzumab Ozogamicine (GO) dans le cadre de la prise en charge des LAM CD33+ (30).

*L'European Leukemia Net (ELN)* a émis des recommandations sur un panel d'anticorps à utiliser pour le diagnostic de LAM (tableau 2). D'une manière générale, la positivité d'au moins deux marqueurs appartenant à une même lignée est nécessaire pour préciser l'appartenance à la lignée myéloïde. Les panels de détection antigénique utilisés en pratique courante comprennent également des marqueurs associés aux lignées lymphoïdes B et T, afin d'exclure une LAL ou une leucémie aiguë de phénotype mixte (MPAL). Ils permettent également de rechercher des marqueurs dont l'expression aberrante pourra aider au suivi de la maladie résiduelle en CMF (22).

**Tableau 2 : Expression des marqueurs de surface cellulaire et cytoplasmique pour le diagnostic de LAM et MPAL (22)**

Diagnostic de LAM	
Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Marqueurs granuleux	CD65, MPO intracytoplasmique
Marqueurs monocytaires	CD14, CD36, CD64
Marqueurs érythrocytaires	CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa)
Diagnostic de MPAL	
Marqueurs myéloïdes	MPO (CMF, immunohistochimie, cytochimie) ou différenciation monocyttaire (au moins deux marqueurs parmi les suivants : cytochimie estérase non spécifique, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
Marqueurs lymphoïdes (T)	CD3 cytoplasmique fort ou CD3 de surface
Marqueurs lymphoïdes (B)	- CD19 fort avec au moins l'un des marqueurs suivants (forte expression) : CD79a cytoplasmique, cCD22, CD10 <b>OU</b> - CD19 faible avec au moins 2 des marqueurs suivants (forte expression) : CD79a, CCD22, CD10

### 1.5.3- Cytogénétique

L'étude du caryotype est fondamentale pour le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique. Ainsi, depuis 2001, les différentes classifications OMS, notamment celle de 2016 (10) intègrent les données cytogénétiques.

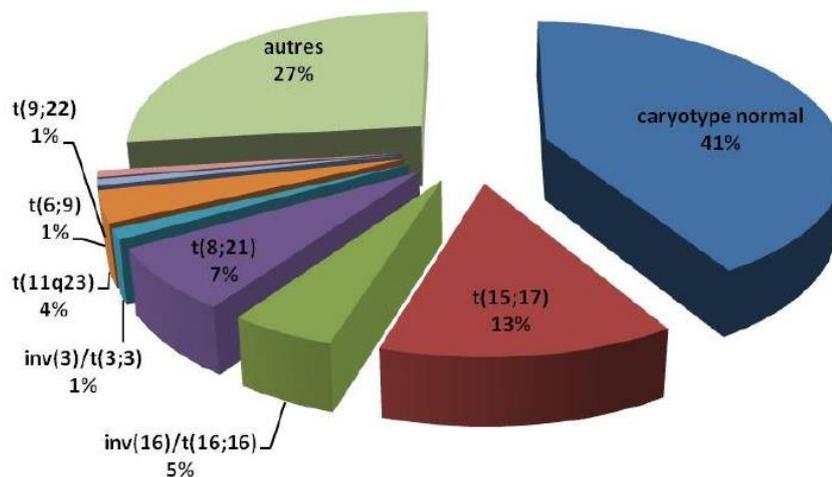
L'intérêt de la cytogénétique est plus limité dans le suivi des LAM du fait de la sensibilité relativement faible de la technique mais le caryotype garde une place importante lors de la prise en charge des rechutes où des changements peuvent être observés par rapport au caryotype du diagnostic.

L'étude des anomalies cytogénétiques peut être effectuée par deux techniques bien distinctes :

- la cytogénétique conventionnelle qui consiste en l'étude du caryotype : mise en évidence d'anomalies de taille, de nombre et/ou de structure (trisomies, monosomies, translocations, délétions, inversions etc...).
- la cytogénétique moléculaire avec la technique FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*) qui permet une analyse ciblée de certaines anomalies

chromosomiques cryptiques telles que la translocation t(15;17) de la LAM3, grâce à des sondes fluorescentes, spécifiques des séquences d'acides nucléiques.

Les techniques de cytogénétique conventionnelle et de FISH permettent de mettre en évidence des anomalies cytogénétiques dans près de 60% des cas au diagnostic (figure 4). Leur mise en évidence est incontournable non seulement pour la classification des LAM mais aussi pour le choix de la prise en charge thérapeutique en raison de leur impact pronostique.



**Figure 4** : Répartition des anomalies cytogénétiques au diagnostic de LAM (*de novo* ou secondaire) sur une cohorte de 5876 patients âgés de 16 à 59 ans traités selon un protocole intensif (31,32)

Différents types d'anomalies cytogénétiques peuvent être retrouvées :

#### a. Les LAM avec translocations récurrentes

Dans environ 30% des cas, on retrouve une translocation récurrente. A ce jour, plusieurs translocations associées aux LAM ont été identifiées. Ces anomalies correspondent dans la plupart des cas à des translocations impliquant des gènes codant pour des facteurs de transcription (33).

Les principales translocations récurrentes décrites dans les LAM sont les suivantes (22,34) :

- LAM avec t(15 ;17) induisant la fusion du gène *PML* relocalisé en 15q24 avec le gène *RARA* (17q21) codant pour le récepteur alpha de l'acide rétinoïque. Cette

translocation est pathognomonique de la LAM3 de la classification FAB avec blastes souvent d'allure bilobée et corps d'Auer en fagots.

- LAM du groupe CBF : t(8;21) impliquant le gène *RUNX1* et les t(16;16)(p13q22) ou inv(16)(p13q22) impliquant le gène *CBFB*. Ces deux gènes codent pour les sous unités  $\alpha$  et  $\beta$  du complexe CBF.

- LAM avec réarrangements du gène *KMT2A* (anciennement *MLL*) : Certaines translocations en 11q23 du gène *KMT2A* sont facilement identifiables en cytogénétique conventionnelle mais d'autres nécessitent le recours à des techniques de FISH.

D'autres translocations récurrentes peuvent être retrouvées dans les LAM. Par ordre de fréquence on peut retrouver les anomalies suivantes: inv(3)(q21;q26.2), ou t(3;3)(q21;q26.2), t(6;9)(p13 ;q34) ; t(8;16)(p11;p13) (35).

#### *b. Autres anomalies cytogénétiques récurrentes retrouvées dans les LAM*

Outre les translocations récurrentes décrites précédemment, d'autres anomalies cytogénétiques peuvent être observées dans les LAM (31,34). Dans 20 à 25% des cas, on retrouve une délétion partielle ou complète des chromosomes 5 ou 7. Enfin, dans 10 à 15% des cas, sont retrouvées des anomalies cytogénétiques diverses telles que la présence d'un chromosome surnuméraire 8 ou 11, des anomalies du chromosome 17 ou une trisomie 8.

Certaines anomalies peuvent être associées, et on distingue alors deux entités de pronostic défavorable :

- Un caryotype complexe est défini par la présence d'au moins trois anomalies cytogénétiques indépendantes et en l'absence d'une des translocations ou inversions récurrentes suivantes désignées par l'OMS : t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) ou t(3;3) et LAM avec BCR-ABL1.

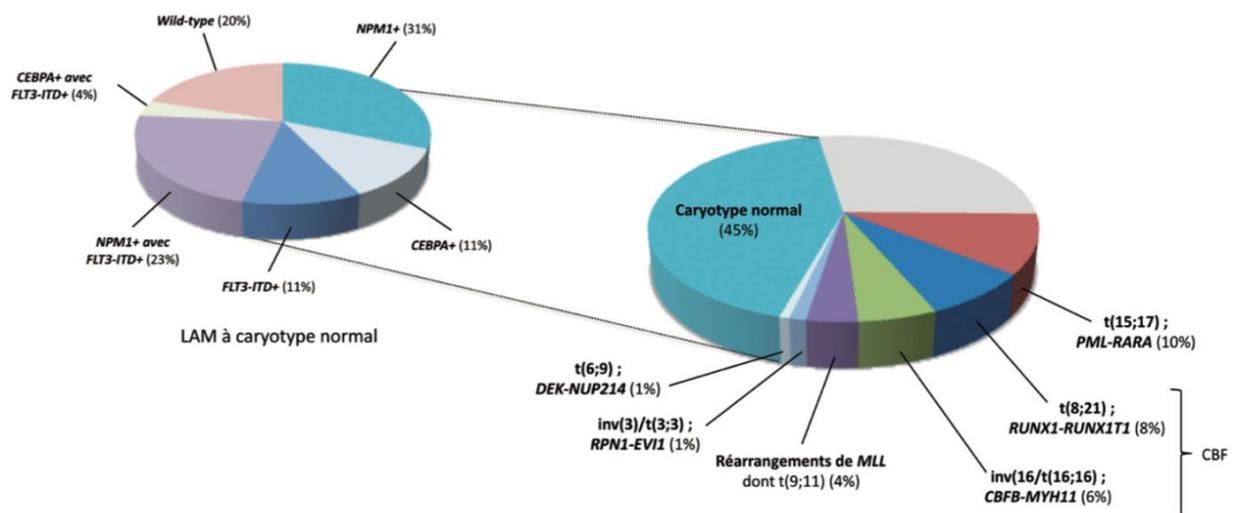
- Un caryotype monosomal est défini par la présence d'une monosomie (en excluant la perte de X ou Y) associée à au moins une anomalie de structure (en excluant celles caractérisant les LAM-CBF ou les LAP) ou une autre monosomie autosomique.

### c. Les LAM à caryotype normal

Dans environ 40% des cas, aucune anomalie cytogénétique n'est retrouvée. Le recours aux techniques de biologie moléculaire permettra alors de préciser les caractéristiques des LAM à caryotype normal (LAM-CN) (31).

#### 1.5.4- Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire (BM) sont devenues incontournables dans la prise en charge des LAM, à la fois en terme diagnostique, pronostique et thérapeutique. Elles occupent ainsi une place majeure dans la classification OMS 2016 où l'intégration de la biologie moléculaire à la cytogénétique a permis la définition d'entités distinctes dont la valeur pronostique est de mieux en mieux établie (10). Dans les LAM à caryotype normal, l'étude moléculaire permet dans environ 80% des cas de retrouver des anomalies, de créer des sous-groupes et ainsi d'affiner le pronostic de ces patients (figure 5) (33).



**Figure 5 : Anomalies moléculaires dans les LAM à caryotype normal de l'adulte (33)**

La figure 5 détaille spécifiquement les anomalies retrouvées en biologie moléculaire dans la catégorie des LAM à caryotype normal. Pour seulement 20% d'entre elles, aucune anomalie moléculaire n'est retrouvée.

Le dépistage rapide d'anomalies moléculaires, en complément des données de cytogénétique permet ainsi d'adapter précocement la prise en charge thérapeutique. De plus, la grande sensibilité de ces techniques permet à la biologie moléculaire de

constituer l'outil de choix pour l'évaluation de la réponse au traitement et/ou la détection précoce d'éventuelles rechutes infracliniques.

Des progrès considérables ont été réalisés dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des LAM, grâce à l'identification de mutations somatiques (*NPM1*, *CEBPA*, *KIT*...) mais aussi dans la dérégulation de certains gènes (*EVI1*). Le développement et l'utilisation du séquençage haut-débit (NGS) permettent actuellement de compléter les connaissances sur les bases moléculaires des LAM. Les recommandations de l'ELN 2017 préconisent désormais la recherche systématique de mutations génétiques incluant *NPM1*, *CEBPA*, *RUNX1*, *FLT3*, *TP53* et *ASXL1* (22).

Ces anomalies moléculaires peuvent être regroupées en différentes catégories fonctionnelles, détaillées dans les paragraphes suivants.

#### a. Gènes de fusion

Les transcrits de fusion résultent de translocations mises en évidence dans les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes :

- Transcrit de fusion *RUNX1-RUNX1T1* (5 à 10% des LAM) conséquence de la t(8;21). Le gène *RUNX1* code pour la sous unité alpha2 du *core binding factor* (CBF) impliqué dans l'hématopoïèse physiologique. Son réarrangement conduit à la dérégulation du complexe CBF.
- Transcrit de fusion *CBFB-MYH11* (5 à 10% des LAM) conséquence de l'inv(16) ou t(16;16). Comme pour le gène *RUNX1*, le réarrangement du gène *CBF* conduit à la dérégulation du complexe CBF.
- Transcrit de fusion *PML-RARA* (8 à 12% des LAM) conséquence de la t(15;17). Le gène *RARA* code pour la sous unité alpha de l'acide rétinoïque. Cette recherche sera systématiquement réalisée pour confirmer le diagnostic de LAP qui justifie d'un traitement spécifique par acide tout *trans* rétinoïque (ATRA) et dérivés de l'arsenic. Ce traitement permet de rétablir la différenciation des cellules leucémiques.

Le dépistage de ces réarrangements génétiques (*PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*) doit être effectué si une information rapide est nécessaire pour recommander une thérapie appropriée, si la morphologie chromosomique est de

mauvaise qualité (échec du caryotype) ou s'il existe une présentation cytologique typique mais que l'anomalie cytogénétique suspectée n'est pas présente (22).

D'autres transcrits de fusion, plus rares, peuvent être observés dans les LAM. Ils concernent notamment les gènes de fusion *DEK-NUP214*, *RBM15-MKL1* (*OTT-MAL*) et *BCR-ABL*.

#### *b. Réarrangement de KMT2A*

Les LAM avec réarrangement du gène *KMT2A* concernent environ 4 à 6% des LAM de l'adulte. Le gène *KMT2A* code pour un régulateur épigénétique impliqué dans les modifications post-traductionnelles des histones.

#### *c. Autres anomalies récurrentes dans les LAM*

Parmi les autres gènes d'intérêt dans cette pathologie, on retrouve des facteurs de transcriptions myéloïdes (comme *CEBPA*, *RUNX1*, *EVI1*), des gènes de transduction du signal (*FLT3*, *KIT*, *RAS*), des gènes impliqués dans des modifications de la chromatine (*ASXL1*, *EZH2*), des gènes modifiant l'ADN (*IDH*, *TET2*, *DNMT3A*), des gènes suppresseurs de tumeurs (*WT1* et *TP53*) et le gène *NPM1* codant pour une nucléophosmine jouant un rôle anti-tumoral en stabilisant la protéine p53.

### **1.6- Classification des LAM et néoplasies associées selon l'OMS 2016**

Éditée pour la première fois en 2001, puis révisée en 2008 et en 2016, la classification OMS des LAM (tableau 3) intègre les données cytogénétiques, moléculaires, génétiques ainsi que les antécédents thérapeutiques ou pathologiques du patient (LAM secondaires, myélodysplasie sous-jacente etc...) (10,36).

Cette classification définit différentes entités de LAM ayant une signification pronostique distincte (tableau 3).

**Tableau 3 : Classification des LAM - OMS 2016 (10)**

Type	Description
<b>LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LAM avec t(8;21)(q22;q22.1) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>- LAM avec inv(16)(p13.1q22) <b>ou</b> t(16;16)(p13.1;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>- LAP avec <i>PML-RARA</i></li> <li>- LAM avec t(6;9)(p23;q34.1) ; <i>DEK-NUP214</i></li> <li>- LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) <b>ou</b> t(3;3)(q21.3;q26.2) ; <i>GATA2, MECOM (EVI1)</i></li> <li>- LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3) ; <i>RBM15-MKL1</i></li> <li>- <i>Entité provisoire</i> : LAM avec <i>BCR-AML1</i></li> <li>- LAM avec <i>NPM1</i> muté</li> <li>- LAM avec mutation bi-allélique de <i>CEBPA</i></li> <li>- <i>Entité provisoire</i> : LAM avec <i>RUNX1</i> muté</li> </ul>
<b>LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies LAM-MRC</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Soit faisant suite à un SMD ou à un SMD/SMP</li> <li>- Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de SMD**</li> </ul>
<b>Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LAM-t</li> <li>- SMD-t</li> </ul>
<b>LAM sans autre spécificité (NOS)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- LAM avec différenciation minimale</li> <li>- LAM sans maturation</li> <li>- LAM avec maturation</li> <li>- LA myélomonocytaire</li> <li>- LA monoblastique/monocytaire</li> <li>- LA érythroïde pure (disparition ancienne LAM6)</li> <li>- LA mégacaryoblastique</li> <li>- LAM à composante basophile</li> <li>- LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)</li> </ul>
<b>Sarcomes myéloïdes</b>	Uniquement les sarcomes myéloïdes <b>de novo</b>
<b>Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down (trisomie 21)</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Proliférations myéloïdes transitoires (TAM)</li> <li>- Leucémies myéloïdes associées au syndrome de Down</li> </ul>

### 1.7- Facteurs pronostiques

L'évaluation précise du pronostic est essentielle à la prise en charge d'une LAM. En effet, elle conditionnera pour chaque patient les modalités de chimiothérapie – intensive ou atténuée, ainsi que l'indication éventuelle d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

On distingue deux types de facteurs pronostiques dans les LAM, ceux liés au patient et ceux liés à la leucémie. Les facteurs liés au patient prédisent généralement un risque de mortalité précoce dû au traitement, tandis que les facteurs liés à la maladie sont prédictifs de la résistance aux chimiothérapies actuelles (1).

## 1.7.1- Facteurs liés au patient

### a. *L'âge au diagnostic*

Il s'agit du facteur pronostique le plus important lié au patient. En effet, le taux de survie à 5 ans est de 46,6% pour les patients âgés de moins de 65 ans au diagnostic contre 7,9% pour ceux âgés de plus de 65 ans (37).

Différents facteurs participent au désavantage de survie : la présence plus fréquente de comorbidités chez les sujets âgés, un profil cytogénétique et moléculaire souvent plus défavorable (38) ainsi qu'une fréquence plus élevée de LAM secondaires post chimiothérapie de pronostic plus péjoratif.

### b. *Performans status*

Le « *Performans status* » constitue un système d'évaluation simple de l'état général du patient. Un état général altéré s'accompagne d'une survie diminuée et d'une moins bonne réponse aux thérapeutiques. En 2015, Appelbaum *et al.* montrent qu'un *Performans status* médiocre (ECOG à 2 ou 3) associé à un âge avancé (supérieur à 75 ans), est fortement corrélé à la mortalité, 82% d'entre eux n'ayant pas survécu dans les 30 jours suivant le début du traitement d'induction (38).

## 1.7.2- Facteurs liés à la pathologie

### a. *Leucocytose et autres anomalies du bilan sanguin*

Une hyperleucocytose majeure (GB supérieur à  $100 \times 10^9/L$ ) au moment du diagnostic est associée à un pronostic particulièrement sombre en raison d'un risque plus élevé de décès précoce résultant de complications de l'hyperleucocytose (CIVD, syndrome de lyse ou leucostase) et d'une probabilité plus importante de rechute et de décès à long terme (25,26,39).

Outre la leucocytose, d'autres anomalies du bilan biologique constituent des facteurs de mauvais pronostic comme un taux de LDH élevé, reflet de la masse tumorale, la concentration de fibrinogène, la numération de PNN, la profondeur de l'anémie, le taux de bilirubine et de créatinine (38,40).

## b. Cytogénétique

Le résultat du caryotype constitue le facteur pronostique le plus puissant de la réponse thérapeutique et du risque de rechute, il conditionne le choix des schémas thérapeutiques pour chaque patient : chimiothérapie intensive ou atténuée et indication éventuelle d'allogreffe en première rémission complète (RC).

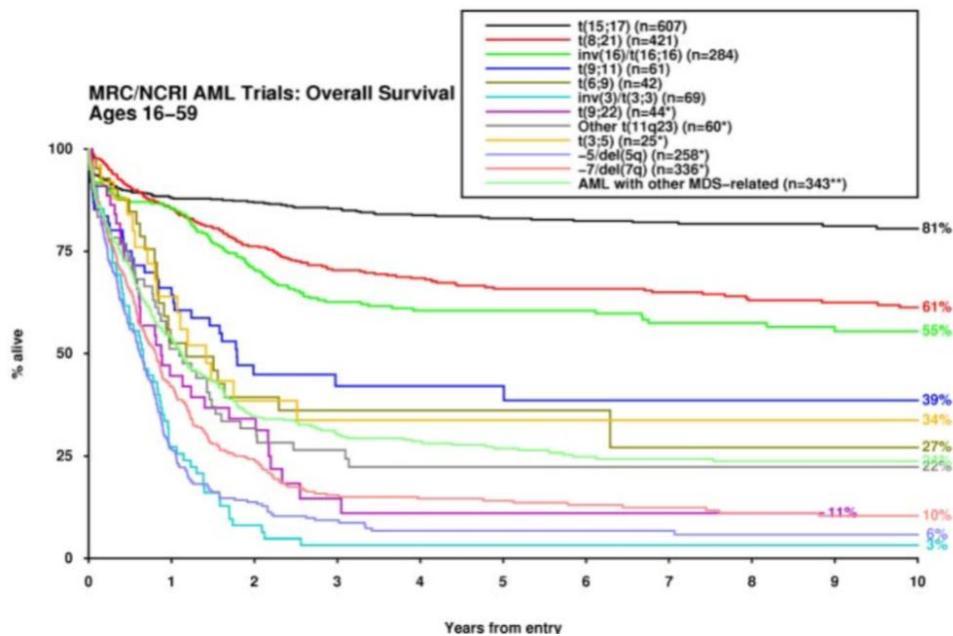
La classification du *Medical Research Council* (MRC) sépare les anomalies cytogénétiques en trois catégories : favorable, intermédiaire et défavorable (tableau 4) (31).

**Tableau 4 : Groupes pronostiques cytogénétiques du *Medical Research Council* (MRC) (31)**

Groupes pronostiques	Sous-types
<b>Favorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(15;17)(q24;q21) ; <i>PML-RARA</i></li> <li>- t(8;21)(q22;q22) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>- inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13q22)</li> </ul>
<b>Intermédiaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Toutes les entités non classées comme favorable ou défavorable</li> <li>- t(9;11)(p22;q23)</li> <li>- t(11;19)(q23;p13)</li> </ul>
<b>Défavorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Anomalie 3q [sauf t(3;5)(q21~25;q31~35)]</li> <li>- inv(3)(q21q26) <b>ou</b> t(3;3)(q21q26)</li> <li>- add(5q), del(5q), -5</li> <li>- -7, add(7q)/del(7q)</li> <li>- t(6;11)(q27;q23)</li> <li>- t(10;11)(p11~p13;q13~q23)</li> <li>- t(11q23)/<i>MLL</i> [sauf t(9;11)(p21~22;q23) et t(11;19)(q23;p13)]</li> <li>- t(9;22)(q34;q11) ; <i>BCR-ABL1</i></li> <li>- -17/anomalie 17p</li> <li>- Caryotype complexe (≥ 4 anomalies indépendantes)</li> </ul>

Le groupe favorable comprend les anomalies cytogénétiques récurrentes t(15;17), t(8;16), t(16;16) ou inv(16). Le groupe intermédiaire reprend toutes les entités non classées comme favorables ou défavorables, et comprend notamment les LAM à caryotype normal. Enfin, le groupe défavorable regroupe diverses anomalies et les caryotypes complexes répertoriés dans le tableau 4.

En 2010, Grinwalde *et al.* étudient la relation entre anomalies cytogénétiques et survie sur une cohorte de 5876 patients traités pour LAM et confirme ainsi la valeur pronostique fondamentale de la cytogénétique dans les LAM. Les résultats sont présentés en figure 6.



**Figure 6 : Impact des anomalies cytogénétiques sur la survie des patients adultes atteints de LAM (31)**

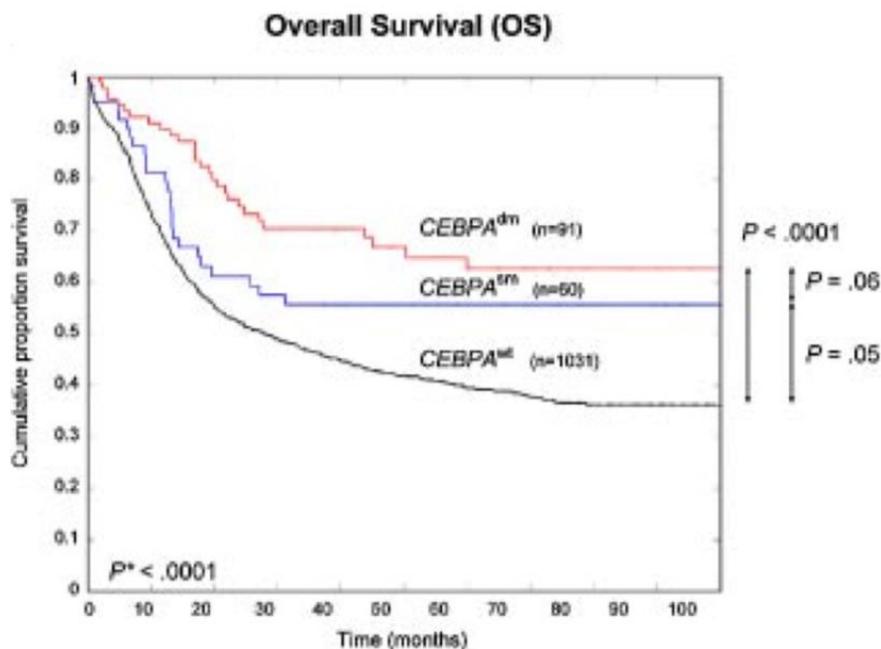
Cette étude met en évidence un taux de survie à 10 ans très variable selon les anomalies cytogénétiques retrouvés au diagnostic de LAM. Le taux de survie à 10 ans peut aller de 81% pour une LAP ( $t(15;17)$ ) à 2% pour une LAM avec une  $inv(3)$  ou une  $t(3;3)$ .

### c. Biologie moléculaire

Les avancées majeures réalisées dans le domaine de la biologie moléculaire ont permis d'affiner le pronostic des LAM à caryotype normal dites de « risque intermédiaire » en identifiant des sous-groupes de pronostics différents.

Au sein de cette diversité d'anomalies moléculaires, trois gènes présentent un intérêt pronostique significatif indéniable et impactent la prise en charge thérapeutique des patients : il s'agit des gènes *FLT3*, *NPM1* et *CEBPA*.

- Dans le groupe des LAM-CN, les mutations *NPM1* (en l'absence de mutation *FLT3-ITD*) et les mutations bialléliques de *CEBPA* (figure 7) sont associées à un pronostic favorable en termes de survie sans rechute et de survie globale. Les mutations de *NPM1* sont retrouvées dans 30 à 35% des cas dans les LAM *de novo* et dans plus de 50% des LAM-CN(41–43). Cette mutation – tous types de caryotype confondus - est cependant associée à la mutation *FLT3-ITD* dans environ 40% des cas (44–47).



**Figure 7 : Impact des mutations CEBPA sur la survie des patients LAM-CN (41)**

Cette figure illustre l'impact favorable des mutations bialléliques CEBPA sur la survie globale des patients atteints de LAM avec caryotype normal.

- La duplication en tandem *FLT3-ITD* retrouvée chez environ 35% des patients atteints de LAM confère, en revanche, un pronostic péjoratif dans la population de LAM à caryotype normal. Chez ces patients, si le gène *NPM1* est également muté, l'évaluation semi-quantitative du rapport allélique de *FLT3-ITD* permet de nuancer son impact pronostique : un impact pronostique péjoratif étant observé si la taille de la duplication est importante (mutation *FLT3-ITD* « high » de rapport allélique élevé) (48).

C'est en ce sens que le groupe *European Leukemia Net* propose en 2010, puis révisé en 2017 une classification différente intégrant à la fois les données cytogénétiques et moléculaires (tableau 5) (22).

**Tableau 5 : Classification génétique pronostique des LAM selon l'ELN (22)**

Groupes pronostiques	Sous-types
<b>Favorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(8;21)(q22;q22) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i></li> <li>- inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22) ; <i>CBFB-MYH11</i></li> <li>- Mutation <i>NPM1</i> muté et <math>\emptyset</math> mutation <i>FLT3-ITD</i> ou mutation <i>FLT3-ITD<sup>low</sup></i>(CN)</li> <li>- Mutation bi-allélique <i>CEBPA</i> (CN)</li> </ul>
<b>Intermédiaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Mutation <i>NPM1</i> et mutation <i>FLT3-ITD<sup>high</sup></i> (CN)</li> <li>- <math>\emptyset</math> mutation <i>NPM1</i> et <math>\emptyset</math> mutation <i>FLT3-ITD</i> ou mutation <i>FLT3-ITD<sup>low</sup></i></li> <li>- t(9;11)(p22;q23) ; <i>MLL-MLLT3</i></li> <li>- Toutes les autres anomalies non classées comme favorable ou défavorable</li> </ul>
<b>Défavorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- t(6;9)(p23;q34) ; <i>DEK-NUP214</i> (CAN)</li> <li>- t(v;11)(v;q23.3) ; <i>KMT2A</i> réarrangé</li> <li>- t(9;22)(q34.1;q11.2) ; <i>BCR-ABL1</i></li> <li>- inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3q26.2) ; <i>GATA2</i>, <i>MECOM</i> (<i>EVI1</i>)</li> <li>- -5 ou del(5q) ; -7 ; -17/anomalie 17p</li> <li>- Caryotype complexe (<math>\geq 3</math> anomalies) ou caryotype monosomique</li> <li>- <math>\emptyset</math> mutation <i>NPM1</i> et mutation <i>FLT3-ITD<sup>high</sup></i> (CN)</li> <li>- Mutation <i>RUNX1</i></li> <li>- Mutation <i>ASXL1</i></li> <li>- Mutation <i>P53</i></li> </ul>

CN : Caryotype Normal

#### d. Les LAM secondaires

La survenue d'une LAM secondaire constitue en soi un critère de mauvais pronostic. Cette catégorie comprend deux entités distinctes (10) :

- Les formes secondaires à une autre hémopathie (SMD ou SMP/SMD) : LAM-MRC
- Les formes secondaires à une chimiothérapie potentiellement leucémogène, administrée dans un contexte de néoplasie : LAM-t

#### e. Les cellules souches leucémiques (LSC)

En 2005, van Rhenen *et al.* se sont intéressés à la valeur pronostique présumée de la fréquence de LSC au moment du diagnostic chez 92 patients atteints de LAM. Une corrélation significative a été mise en évidence entre le pourcentage de cellules CD34+/CD38- au diagnostic, compartiment riche en LSC, et tous les paramètres de survie (survie globale, survie sans rechute et survie sans maladie). Grâce à une

analyse multivariée, cette étude émet l'hypothèse qu'un pourcentage élevé de LSC au diagnostic serait corrélé à une faible survie indépendamment des facteurs de risque pronostiques connus (numération leucocytaire, âge, mutation *FLT3-ITD*) (49).

Plus récemment, les travaux de Terwijn *et al.* ont permis d'isoler par cytométrie en flux des LSC à partir des compartiments cellulaires CD34+/CD38-, mais aussi à partir des compartiments CD34+/CD38+ et CD34- de moelle osseuse de LAM. Ils ont montré qu'une proportion plus élevée de LSC CD34+/CD38- au diagnostic était associée à une diminution de la survie sans rechute. Ce résultat n'a pas été retrouvé pour les LSC des compartiments CD34+/CD38+ et CD34- (50).

#### *f. La maladie résiduelle*

Ce point sera développé dans le paragraphe I-2 de la partie Généralités.

### **1.8- Traitement**

L'approche générale des thérapies actuelles n'a pas beaucoup changé ces 30 dernières années. Elle repose classiquement sur l'instauration d'une chimiothérapie intensive chez le sujet jeune (18-60 ans). Pour les patients âgés, une chimiothérapie atténuée peut être proposée, si le patient n'est pas éligible à la chimiothérapie intensive. Une évaluation initiale permet de déterminer si un patient est considéré comme apte à recevoir une chimiothérapie intensive. Elle consiste en l'évaluation du risque de mortalité liée au traitement (TRM) après une chimiothérapie intensive.

Si l'âge constitue un critère important d'éligibilité, en raison notamment d'un état général plus souvent altéré et de la présence de comorbidités plus fréquentes chez le sujet âgé, il ne constitue pas le seul facteur d'évaluation. Ainsi le groupe d'expert de l'ELN estime que le fait de juger inapte un patient à recevoir une chimiothérapie intensive doit reposer sur différents critères d'évaluation de la TRM (22) :

- un mauvais état de performance (*Performans Status*)
- des comorbidités importantes
- un profil cytogénétique et/ou moléculaire défavorable

L'éligibilité à une chimiothérapie intensive est ainsi discutée pour chaque patient en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP). En accompagnement des traitements de chimiothérapie, des soins de support doivent par ailleurs être réalisés afin de diminuer la morbi/mortalité précoce des patients. Pour les LAM hyperleucocytaires, une phase de réduction blastique peut être mise en place avec de l'hydroxyurée avant l'instauration du traitement d'induction.

Au niveau thérapeutique, la LAP constitue une exception au schéma thérapeutique conventionnelle. Le traitement est basé sur l'administration d'acide tout-trans rétinoïque (ATRA) et de trioxyde d'arsenic (ATO) et représente la seule avancée thérapeutique spectaculaire dans la LAM (51). Ce cas particulier ne sera pas abordé.

Sont détaillés dans les paragraphes suivants les principaux schémas thérapeutiques.

#### 1.8.1- Schémas thérapeutiques conventionnels

##### *a. Patients éligibles à une chimiothérapie intensive*

Le traitement de ces patients inclue un traitement d'induction suivi d'un traitement de consolidation.

#### **Traitement d'induction**

Le traitement d'induction est basé sur l'association d'une anthracycline (agent intercalant, inhibiteur de topoisomérase II), et d'un antimétabolite (la cytarabine) selon un schéma communément nommé « 3+7 » en référence à son schéma d'administration (52) :

- L'anthracycline est administrée par voie intraveineuse pendant trois jours. Différentes drogues peuvent être administrées telles que la daunorubicine, l'idarubicine ou un apparenté aux anthracyclines (exemple : le mitoxantrone) (22)
- La cytarabine ou Ara-C est un antimétabolique analogue nucléosidique de la cytosine (inhibiteur de la synthèse d'ADN) administré par voie intraveineuse continue à faible dose pendant sept jours (22)

La chimiothérapie d'induction est une phase de réduction tumorale qui a pour but d'obtenir au terme de celle-ci et en sortie d'aplasie (environ 4 semaines) une rémission complète (RC). La RC est définie selon les recommandations de l'ELN 2017 par différents critères (22) :

- Blastose médullaire < 5% et absence de blaste avec corps d'Auer
- Absence de blastose circulante
- Absence de localisation extra-médullaire
- Taux de polynucléaires neutrophiles > 1G/L
- Numération plaquettaire > 100 G/L

Dans les LAM, une RC est obtenue chez 60 à 80% des adultes jeunes (moins de 60 ans) et environ 40 à 60% des sujets âgés (22).

### **Traitement de post-rémission ou de consolidation**

Le traitement de consolidation est mis en route après obtention d'une RC et a pour but de maintenir le plus longtemps possible cet état de RC.

Cette phase comprend classiquement une chimiothérapie intensive ± une greffe de cellules souches hématopoïétiques (HSC), la décision de traitement reposant essentiellement sur le profil pronostique du patient (âge et classification génétique) :

- Risque favorable :

La greffe de HSC n'est pas recommandée en première rémission (RC1). La consolidation repose alors sur l'administration de plusieurs cures de cytarabine à dose intermédiaire (IDAC), avec des posologies variables selon l'âge du patient (22).

- Risque intermédiaire et défavorable :

Différents schémas thérapeutiques ont été évalués : la chimiothérapie intensive conventionnelle, la greffe de HSC autologue ou allogénique (allogreffe) après chimiothérapie à hautes doses et le traitement d'entretien prolongé.

La greffe allogénique de HSC est recommandée chez les sujets jeunes (<60 ans) en raison de son plus faible taux de rechute. Elle est donc à privilégier en RC1. La transplantation de HSC est précédée d'un conditionnement myéloablatif afin d'induire une aplasie, celui-ci pouvant être atténué pour les patients plus âgés ou ayant des comorbidités. Le recours accru à des donneurs non apparentés et non compatibles

ainsi que le don de sang de cordon permet de trouver un donneur à la plupart des patients. Chez les sujets âgés, seule une minorité d'entre eux bénéficie de cette thérapeutique en raison principalement de leur âge avancé, de la présence de comorbidités, de l'incapacité à obtenir une RC, de la fréquence de rechute précoce ou de leucémie réfractaire (53).

Chez les sujets jeunes, en cas de non faisabilité de la greffe, une chimiothérapie de consolidation identique aux LAM à risque favorable peut être administrée pour les LAM à risque intermédiaire, alors qu'elle ne peut pas être recommandée chez les LAM à haut risque ou chez les sujets âgés.

Un cycle de chimiothérapie intensive suivie d'une greffe de cellules hématopoïétiques (HCT pour *Hematopoietic stem Cell Transplantation*) autologue utilisant les cellules CD34+ issue du sang périphérique constitue une autre alternative thérapeutique pour les LAM à risque intermédiaire du sujet jeune. Dans une étude randomisée, l'HCT autologue a permis l'obtention de meilleurs résultats en matière de survie sans rechute et de survie globale par rapport à la chimiothérapie conventionnelle (40,54).

Enfin, l'ELN ne donne aucune recommandation précise concernant le traitement en post rémission des sujets âgés de risque intermédiaire ou élevé (22).

A l'heure actuelle, la **chimiothérapie d'entretien** ne fait pas partie du traitement standard de la LAM en raison du manque de preuve de son bénéfice (55,56).

#### *b. Patients non éligibles à une chimiothérapie intensive*

Chez les patients inaptes à recevoir une chimiothérapie intensive, différentes thérapeutiques peuvent être proposées :

- La cytarabine à faible dose (LDAC) est bien tolérée et offre des taux de rémission de 15 à 25%, les résultats restent néanmoins modérés avec une médiane de survie globale allant de 5 à 6 mois (57).

- Les agents hypométhylants : l'azacitidine ou la décitabine peuvent être administrés tous les mois jusqu'à progression de la maladie. Ces traitements

donnent de meilleurs résultats en termes de survie globale par rapport au LDAC pour les patients âgés de plus de 65 ans (58,59).

- Enfin, un traitement de support incluant l'hydroxyurée est proposé pour les patients ne pouvant supporter aucune autre thérapie ou pour ceux ne souhaitant pas être traités par chimiothérapie intensive (22).

### *c. Patients en rechute ou avec LAM réfractaire*

Ces patients nécessitent une évaluation précise du ratio bénéfice/risque qu'une chimiothérapie de rattrapage est susceptible de leur causer. Le principal objectif de la thérapie de rattrapage est d'obtenir une RC avant la réalisation d'une greffe allogénique de HSC si l'état général du patient le permet. En l'absence d'éligibilité à la greffe de HSC, de nouvelles thérapies peuvent être testées avant d'envisager des soins de support.

## 1.8.2- Thérapeutiques innovantes

### *a. Inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK)*

Parmi les inhibiteurs de FLT3, deux générations successives d'inhibiteurs de la tyrosine kinase (ITK) ont été développées : la midostaurine et le sorafenid font partie de la première génération, tandis que la seconde génération comprend le quizartinib, le crenolanib et le gilteritinib. Ils visent à inhiber les formes mutées du récepteur FLT3.

L'essai RATIFY a évalué l'ajout de midostaurine versus placebo en chimiothérapie d'induction et en consolidation chez des patients atteints de LAM *FLT3* mutés. Les résultats sont prometteurs : ce traitement permettrait une augmentation du taux de RC et une amélioration de la survie globale (60). Ainsi l'ELN 2017 suggère de considérer son utilisation – en association avec la chimiothérapie intensive - chez les patients présentant une mutation de *FLT3* (22).

L'ajout de sorafenid en chimiothérapie d'induction a également été exploré, les résultats sont encourageants mais doivent être confirmés et ne justifient pas de modifier les protocoles utilisés actuellement (61,62).

Enfin, le gilteritinib a montré un bénéfice en termes de survie globale pour les patients *FLT3* mutés en rechute ou réfractaire à une chimiothérapie d'induction conventionnelle (63).

Le gilteritinib et la midostaurine ont ainsi été approuvés par la *Food and Drug Administration* (FDA). D'autres ITK tels que les inhibiteurs de KIT ou les inhibiteurs de PI3K/AKT/mTOR sont en cours d'évaluation clinique (22).

#### *b. Modulateurs épigénétiques*

Les inhibiteurs d'IDH1 et IDH2, fréquemment mutés dans les LAM sont également à l'essai, les premiers résultats montrent des réponses durables et semblent prometteurs (22). L'Enasidenib et l'Ivosidenib, des inhibiteurs respectivement d'IDH2 et IDH1 sont des nouvelles thérapies approuvées par la FDA dans les LAM avec mutations des gènes concernés (63,64).

La guadécitabine (SGI-110), un agent hypométhylant de deuxième génération en fait partie et est actuellement en phase 3 de développement (65). Elle présente l'avantage par rapport à la décitabine de résister à l'inactivation enzymatique de la molécule qui possède ainsi une activité *in vivo* plus longue.

#### *c. Nouveaux agents cytotoxiques*

Plusieurs essais s'intéressent au CPX-351 (également approuvé par la FDA), une formulation liposomale combinant la daunorubicine et la cytarabine selon un ratio molaire fixe (effet synergique). Des études de phase II ont suggéré un effet bénéfique de cet agent dans le traitement de première ligne des LAM secondaires (LAM-t et LAM liées aux SMD) avec un taux de réponse plus élevé comparé au traitement d'induction de référence « 3 + 7 » (66).

La vosaroxine, un inhibiteur de topoisomérase II, en association avec l'IDAC a montré un léger bénéfice en termes de survie chez les patients âgés de plus de 60 ans (67).

#### d. Thérapies ciblées

Le Vénétoclax est un inhibiteur sélectif de BCL-2, protéine anti-apoptotique pouvant participer à la chimiorésistance dans les LAM (68). Son utilisation a démontré un avantage en termes de taux et de durée de RC et de rémission hématologique incomplète (RCi) ainsi qu'en termes de survie globale (69,70). La FDA a récemment approuvé son utilisation – en association avec un agent hypométhylant ou LDAC – chez les patients de 75 ans et plus, non éligibles à une chimiothérapie intensive (63).

On compte également parmi ces thérapies ciblées le Glasdegib, qui vise à inhiber la voie de signalisation *Hedgehog*, celle-ci pouvant être surexprimée dans la LAM et ainsi participer à la chimiorésistance des cellules leucémiques (71,72).

#### Anticorps et immunothérapies

De nombreuses autres pistes sont explorées comme les anticorps monoclonaux dirigés contre les marqueurs exprimés par les blastes leucémiques ou les LSC. Ces anticorps jouent un rôle de médiateur dans le recrutement des cellules immunitaires. Ils peuvent également induire le blocage de voies de signalisation impliquées dans la croissance des cellules leucémiques, ou être utilisés pour libérer un agent cytotoxique ou radio-isotope dirigé spécifiquement contre les cellules leucémiques (73).

Le Gemtuzumab Ozogamicine (GO) est un anticorps monoclonal dirigé contre le CD33 couplé à un cytotoxique. Après liaison au CD33 exprimé par 90% des LAM, l'anticorps est internalisé et l'agent cytotoxique libéré. Des essais randomisés réalisés chez des sujets jeunes (< 60 ans) testant l'ajout de GO en thérapie d'induction, ont montré son efficacité chez les patients à risque favorable ou intermédiaire avec une survie sans rechute (RFS) augmentée dans le bras GO. Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés par l'équipe d'Amadori *et al.* chez une population de sujets âgés (> 60 ans) avec une mortalité précoce majorée dans le bras GO et un rapport bénéfice/toxicité insuffisant, la principale toxicité étant hépatique (74).

D'autres anticorps sont également étudiés dans le traitement de la LAM : anti-CD123, anti-CD47, anti-CLL1, anti-CD64 (75). L'utilisation d'anticorps a pour but de

cibler les cellules leucémiques et d'épargner le plus possible les cellules normales de l'hématopoïèse.

Par ailleurs, l'utilisation de cellules T bispécifiques (BiTE), des anticorps à double affinité (DART), ou encore des CAR-T cells dirigés contre le CD33 ou le CD123 (76) sont actuellement en cours d'essai clinique précoce (22).

Les thérapeutiques innovantes tendent vers une personnalisation des traitements des LAM, au vu de l'hétérogénéité clonale importante de cette pathologie entre les patients mais aussi au cours de l'évolution de la maladie.

## **2- La maladie résiduelle dans la leucémie aigüe myéloïde (MRD-LAM)**

### **2.1- Concept et définition**

Si environ la majorité des patients atteints de LAM obtiennent une RC après la chimiothérapie d'induction, beaucoup d'entre eux vont rechuter au cours du suivi. D'un point de vue biologique la définition de RC repose sur des critères cytologiques et ne permet pas d'affirmer l'éradication totale du clone leucémique du fait du manque de sensibilité de l'hémogramme et du myélogramme pour la détection d'évènements rares. Par ailleurs, ces techniques s'avèrent parfois d'interprétation difficile dans certaines situations : moelle de richesse variable, présence de blastes de régénération.

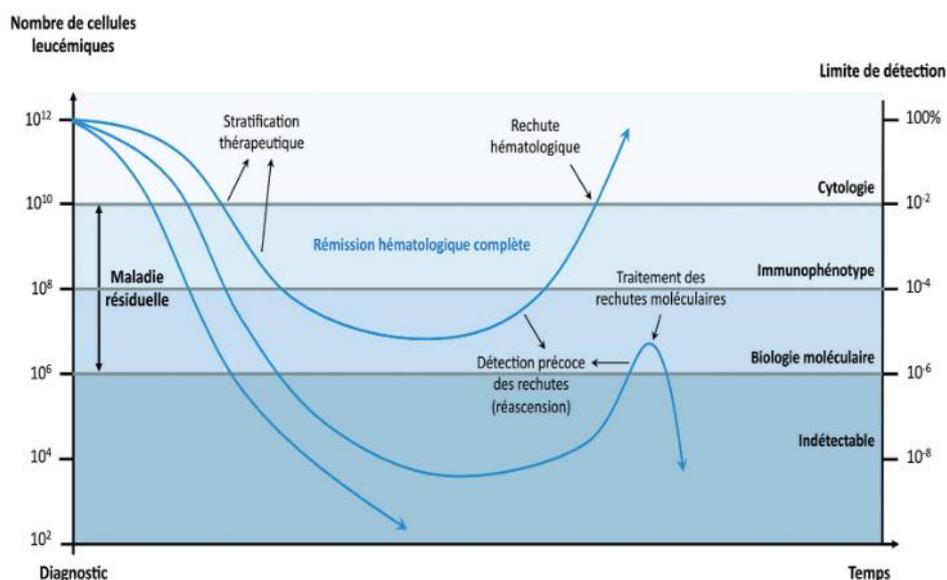
La rémission complète hématologique (RC) est définie par une normalisation de l'hémogramme et par un pourcentage de blastes médullaires < 5% (22). Cette définition correspond à une diminution de la charge leucémique d'environ  $2 \log_{10}$  entre le diagnostic et le suivi post induction, soit un passage d'environ  $10^{11}$  ou  $10^{12}$  cellules leucémiques au diagnostic à  $10^9$  ou  $10^{10}$  cellules en suivi. Si le passage en RC constitue un facteur de bon pronostic, il ne constitue pas un critère de guérison en raison de la persistance de cellules leucémiques dans l'organisme à l'origine d'une éventuelle rechute. Le but du traitement de consolidation est ainsi d'éradiquer la totalité de la masse tumorale afin d'aboutir à la guérison.

La maladie résiduelle (MRD) est définie par la persistance après traitement de cellules malignes présentes au diagnostic et non détectées par les techniques morphologiques. Dans le cas des LAM, la recherche de la maladie résiduelle consiste à mettre en évidence, la présence dans le sang ou la moelle osseuse de blastes pathologiques résistants à la chimiothérapie et potentiellement responsables de rechute (77).

À l'heure actuelle, il est possible de suivre la maladie résiduelle dans la LAM à la fois en biologie moléculaire ou en cytométrie en flux. Ces deux techniques d'évaluation de la MRD font désormais partie intégrante des critères de réponse au traitement de la LAM définis par l'ELN. Les recommandations 2017 intègrent en effet une nouvelle catégorie de critère de réponse - « RC avec MRD négative » ou ( $CR_{MRD-}$ ) – afin de confirmer ou infirmer la RC de façon plus précise que par les techniques morphologiques classiques (22). L'évaluation de la MRD-LAM permet, en outre, de prédire plus précocement la rechute : une MRD positive étant significativement associée à un taux de rechute plus élevé (78,79).

Les techniques disponibles présentent une sensibilité variable selon la méthode utilisée et selon le marqueur de suivi, et ne permettent pas de descendre en dessous de  $10^{-6}$  en biologie moléculaire et  $10^{-4}$  en cytométrie en flux (figure 8) (33).

On parle de maladie résiduelle indétectable lorsqu'il n'a pas été mis en évidence de cellules malignes par l'une de ces techniques.



**Figure 8 : La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës (33)**

La MRD peut être évaluée à différents stades du traitement pour une détection précoce des rechutes. Son évaluation après un premier cycle d'induction permettrait d'identifier plus précocement les patients mauvais répondeurs (78–81), en vue d'une éventuelle stratification thérapeutique basée essentiellement sur l'allogreffe de moelle osseuse (22). Une MRD positive après l'induction peut néanmoins, être négative après la consolidation.

D'autres applications potentielles de la MRD incluent l'évaluation de la MRD avant ou après allogreffe de HSC, à visée pronostique ou en vue d'adapter la prise en charge thérapeutique, ou dans le cadre d'essais cliniques visant à comparer un bras de traitement par rapport à un autre ou pour évaluer l'efficacité de nouvelles molécules (82).

## **2.2- Place de la biologie moléculaire pour l'évaluation la MRD-LAM**

### 2.2.1- Marqueurs de suivi et techniques de quantification

La biologie moléculaire (BM) est un outil de choix pour le suivi de la maladie résiduelle dans la prise en charge des LAM. Du fait de sa grande sensibilité (limite de détection pouvant aller jusqu'à  $10^{-6}$  pour certaines cibles), elle est réalisée en première intention en présence d'un bon marqueur de suivi (figure 9) (33,83).

Les qualités requises d'un bon marqueur sont les suivantes (82) :

- leur spécificité vis à vis des cellules tumorales recherchées
- leur stabilité dans le temps
- leur fréquence élevée dans les LAM (40 à 70% des marqueurs)
- leur recherche accessible en routine pour un coût acceptable

Les principaux marqueurs de BM utilisables en suivi de MRD-LAM sont répertoriés dans le tableau 6.

**Tableau 6 : Marqueurs de biologie moléculaire utilisables en suivi de la MRD-LAM**

Type de marqueurs de suivi en BM	Anomalies moléculaires
Transcrits de fusion	<i>PML-RARA</i> <i>RUNX1-RUNX1T1</i> <i>CBFB-MYH11</i> <i>KMT2A-MLLT3</i> <i>DEK-CAN</i> <i>RPN1-MECOM (EVI1)</i> <i>NUP98-NSD1</i> <i>MYST3-CREBBP</i>
Mutation génique	<i>NPM1</i>
Surexpression génique	<i>WT1</i>

**Les transcrits de fusion** *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*, *KMT2A-MLLT3* sont de parfaits candidats car ils répondent à la plupart des exigences citées ci-dessus. Leur suivi est réalisé par technique de RT-qPCR en temps réel (*Reverse Transcription - quantitative Polymerase Chain Reaction*) : méthode quantitative basée sur l'utilisation de l'ARN. La sensibilité des techniques est de l'ordre de  $10^{-4}$  à  $10^{-5}$ .

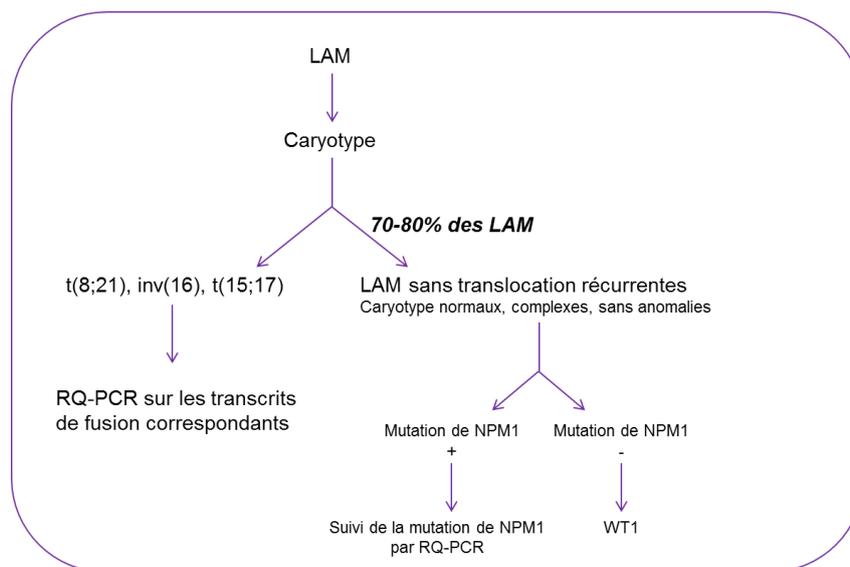
**Les mutations du gène *NPM1*** se sont rapidement révélées être de bons marqueurs de suivi de la MRD-LAM. En effet, leur fréquence élevée, la présence de mutations récurrentes (A, B et D représentant environ 90% des mutations de *NPM1*) et leur bonne stabilité au moment de la rechute permettent de suivre environ 30% des patients atteints de LAM et 50% des LAM-CN avec une bonne sensibilité de l'ordre de  $10^{-5}$  (33).

#### **Le suivi de l'expression de *WT1***

*WT1* est un gène suppresseur de tumeur physiologiquement exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques normales. Une surexpression est retrouvée dans 60 à 80% des cas de LAM (84–86). Il est moins spécifique du clone leucémique et moins sensible que les recherches des transcrits de fusion ou des mutations de *NPM1*. Son suivi n'est donc recommandé qu'en l'absence d'autre marqueur moléculaire exploitable. Cependant, il s'agit d'un marqueur relativement stable, présentant l'avantage de pouvoir être suivi dans le sang avec une meilleure sensibilité que dans la moelle, du fait de la diminution du bruit de fond causé par l'expression basale de *WT1* dans les tissus (33).

En revanche, l'intérêt de suivre d'autres mutations est plus limité. La mutation *FLT3-ITD*, par exemple, manque de stabilité entre le diagnostic et la rechute, ce qui induit un risque de résultat faussement négatif en MRD (87).

Enfin, un suivi des mutations est également envisageable par des techniques de PCR digitale (ddPCR) avec une sensibilité de l'ordre de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$  pour certaines mutations ou par NGS. Néanmoins, le développement en routine de ces techniques est actuellement limité en raison de contraintes techniques et d'un coût parfois très élevé (82).



**Figure 9 : Stratégie habituelle de suivi de la MRD-LAM en biologie moléculaire (83)**

### 2.2.2- Intérêt de la MRD-LAM en biologie moléculaire

Le suivi de la MRD en biologie moléculaire a pour premier objectif de confirmer ou infirmer la RC obtenue par les techniques cytologiques. Il semble constituer également un outil puissant de suivi de la réponse au traitement et permettrait une identification plus précoce des rechutes.

**Dans les LAP**, une étude prospective de Grimwade *et al.* réalisée en 2009, met en évidence que la surveillance séquentielle rigoureuse de la MRD par RT-qPCR amène un bénéfice significatif sur la prise en charge thérapeutique des patients. En effet, chez les patients présentant une MRD positive persistante après la fin de la consolidation, une intervention thérapeutique précoce a empêché une rechute manifeste dans la majorité des cas : le taux de survie sans rechute à un an était de

73%. La valeur pronostique de la MRD dans les LAP est désormais bien établie et la conversion d'une PCR négative en PCR positive confirmée est prédictive d'une rechute à plus ou moins court terme (88).

**Dans les LAM-CBF**, le suivi des transcrits de fusion *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11* retrouvés respectivement dans les LAM avec t(8;21) et inv(16) a montré un intérêt pronostique en termes de risque de rechute. En effet, une réduction de la MRD sur moelle inférieure à  $3 \log_{10}$  en fin d'induction ou après la première consolidation est associée à un risque de rechute plus élevé (89).

**Concernant le suivi *NPM1***, les résultats des essais AML17 du *National Cancer Research Institute* et du protocole ALFA 0702 ont montré que chez des patients jeunes mutés *NPM1*, un résultat de MRD positif sur sang par RT-qPCR en post induction était associé à un risque de rechute plus élevé et à une diminution de la survie globale (OS) – indépendamment du caryotype et du statut *FLT3-ITD* (81,90).

C'est essentiellement pour les LAM de pronostiques favorable et intermédiaire (LAP, LAM-CBF et *NPM1* mutées) et pour celles ayant accès à une thérapie ciblée que la MRD-LAM-BM serait susceptible de modifier sensiblement la prise en charge du patient grâce à une meilleure stratification thérapeutique.

Cependant, malgré la richesse de la littérature sur l'impact pronostique de l'évaluation de la MRD-LAM-BM au cours du traitement, peu de recommandations prennent en compte le résultat de celle-ci sur le plan thérapeutique (indication d'allogreffe, intensification thérapeutique, nouvelles thérapies). Une harmonisation des pratiques semble nécessaire pour une utilisation à l'échelle individuelle.

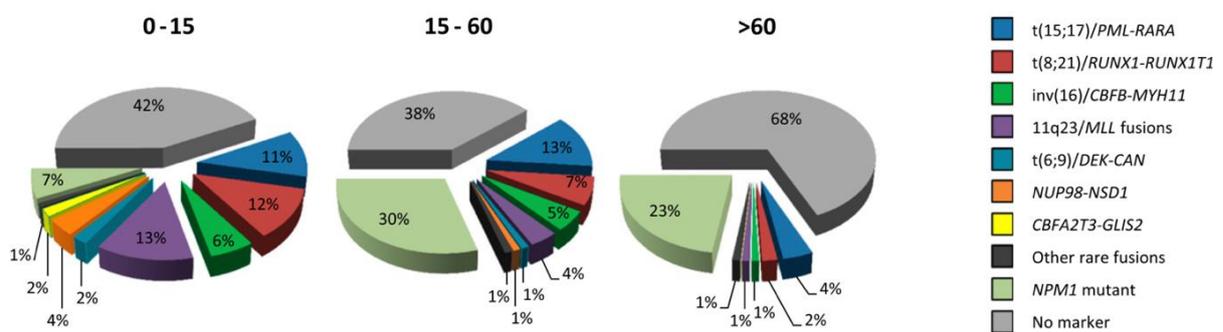
Sur une échelle collective, dans le cadre d'essais cliniques ou pour l'évaluation de nouvelles drogues, la MRD-LAM constitue en revanche un excellent critère de suivi thérapeutique (22).

### 2.2.3- Limites de la MRD-LAM en biologie moléculaire

Un travail de standardisation des pratiques semble nécessaire à la fois sur le choix des points de suivi, les marqueurs utilisés, les seuils de positivité, de progression ou de rechute, la nature de l'échantillon (sang ou moelle) et la technique utilisée - afin

de valider en pratique clinique, hors protocole thérapeutique, la MRD en BM comme marqueur de suivi et de stratification du risque.

Le suivi de la MRD-LAM grâce aux différents transcrits de fusion et aux mutations de *NPM1* permet l'utilisation de la BM chez environ 60% des patients jeunes (0-60 ans). Cependant, ces chiffres diminuent très fortement avec l'âge et ne représentent plus que 32% des patients de plus de 60 ans (figure 10) (78). Ainsi, 40 à 70% des LAM n'ont pas de marqueur sensible et spécifique pour le suivi de la MRD en biologie moléculaire, ces chiffres ne tenant pas compte du suivi de *WT1*. Pour ces patients l'étude de la MRD en CMF trouve tout son intérêt, comme le recommande l'ELN (22).



**Figure 10** : Distribution en fonction de l'âge de marqueurs moléculaires permettant un suivi MRD-LAM par RT-qPCR (78)

## 2.3- Place de la Cytométrie en flux dans la MRD-LAM

### 2.3.1- Principe de la Cytométrie en flux

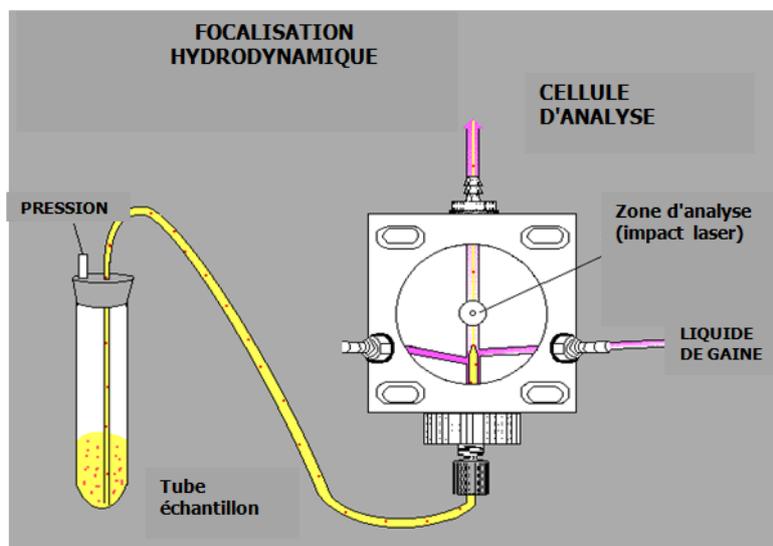
La cytométrie en flux (CMF) est une technique de mesure de cellules en suspension. Ces cellules sont entraînées par un liquide de gaine devant un rayon lumineux (une source laser le plus souvent). Cette technique présente l'avantage de pouvoir analyser en un temps réduit un nombre très important de cellules.

L'échantillon doit se présenter sous forme de suspension cellulaire. Le sang ou la moelle osseuse sont des prélèvements parfaitement adaptés pour l'analyse en CMF. Les cellules à analyser doivent être préalablement marquées à l'aide d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes, ciblant des molécules d'intérêt extra ou intracellulaires. Une étape préalable de lyse des globules rouges est réalisée avant analyse au cytomètre.

Le cytomètre se compose de trois systèmes complémentaires : un système « fluide », un système « optique » et un système « électronique ».

### **Système fluide et focalisation hydrodynamique**

Les cellules préalablement traitées sont entraînées par un liquide de gaine. Un flux laminaire est créé dans la cellule de mesure par pressurisation du liquide de gaine. La suspension cellulaire est injectée dans la cellule de mesure par pressurisation du tube échantillon. L'objectif est de séparer les cellules les unes des autres afin de les analyser individuellement. Ce phénomène est appelé focalisation hydrodynamique (figure 11).



**Figure 11 : Représentation schématique de la focalisation hydrodynamique (documentation Beckman-Coulter, Service formation – version L - juillet 2014)**

### **Système optique**

Il est constitué d'une source d'excitation lumineuse (faisceau laser le plus souvent) et d'une source d'émission lumineuse.

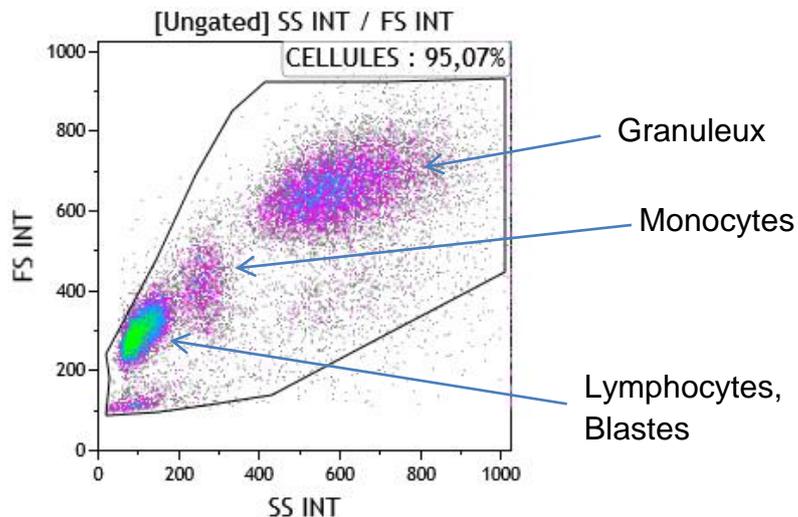
#### **- Source d'excitation lumineuse**

Exposées à une source lumineuse, les cellules émettent différents types de signaux lumineux :

Un signal de **diffusion** qui permet de discriminer les différents types cellulaires par la mesure des paramètres de taille et de structure (figure 12) :

- *Diffusion petits angles (FS)* : collecté dans l'axe du faisceau excitateur, il correspond à de la diffraction et donne une indication sur la taille des cellules

- *Diffusion grands angles (SS)* : collecté à 90° par rapport au faisceau excitateur, c'est un mélange de diffusion, réflexion et réfraction, il donne des indications sur la structure interne de la cellule telles que la granulosité et le rapport nucléo-cytoplasmique

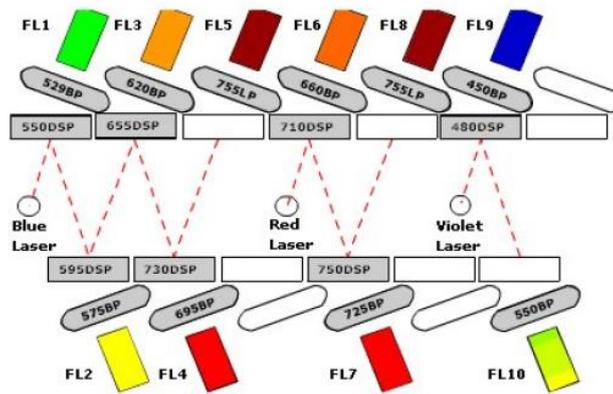


**Figure 12** : Position des différents types cellulaires selon la représentation Side Scatter/ Forward Scatter (SS/FS) (données internes CHV)

Un signal de **fluorescence** appelé « autofluorescence » auquel se rajoute le signal émis par les anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes dans le cadre de l'immunophénotypage des leucocytes. Ces anticorps sont dirigés contre des glycoprotéines membranaires ou intracytoplasmiques appelées « Cluster de Différenciation » (CD).

#### - Source d'émission lumineuse et collection des signaux lumineux

Les différentes longueurs d'ondes lumineuses émises après excitation sont triées et séparées par un système de filtres optiques et de miroirs dichroïques appelé « banc optique » (figure 13), afin d'être collectées au niveau de photo-détecteurs ou photomultiplicateurs (PMT).

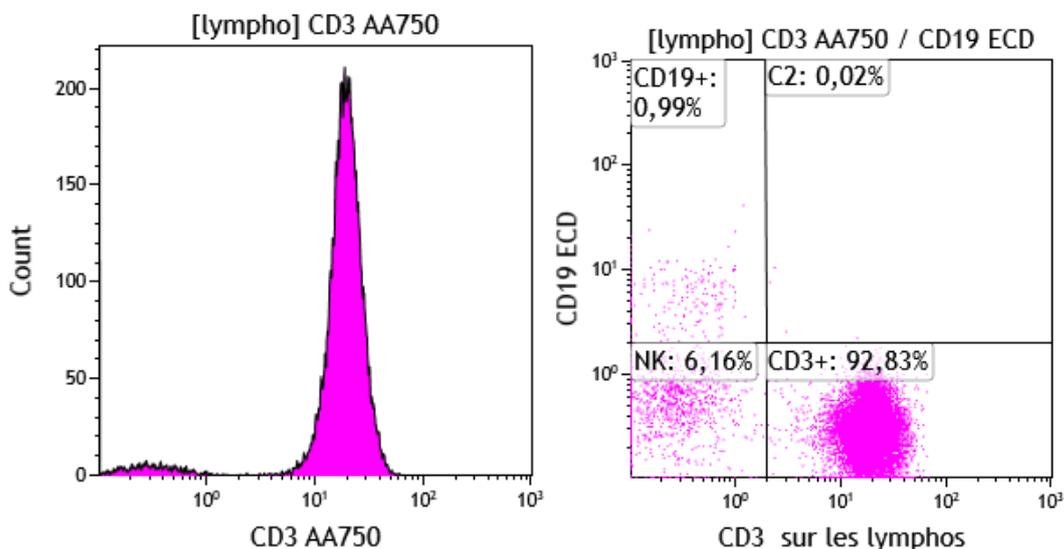


**Figure 13** : Représentation schématique d'un banc optique de cytomètre (Documentation Navios® Beckman Coulter, Service formation – version L - juillet 2014)

Cytomètre 10 couleurs (3 lasers) avec système de filtres optiques et photomultiplicateurs en « boulevard »

### Système électronique et traitement du signal

Les signaux lumineux sont ensuite convertis de façon proportionnelle en signaux électriques via des PMT afin que ces données puissent être exploitées informatiquement. Les données ainsi recueillies pourront être retranscrites sous forme de graphiques mono ou bi-paramétriques (figure 14).



**Figure 14** : Exemples de graphiques mono- et bi-paramétriques (données CHV)

A gauche histogramme monoparamétrique avec intensité d'expression du CD3-AA750 pour la population lymphocytaire en abscisse et nombre d'événements acquis dans chaque canal en ordonnée ; A droite histogramme biparamétrique de distribution étudiant l'expression du CD3-AA750 et du CD19-ECD (représentation en nuages de points) sur la population lymphocytaire.

### 2.3.2- Stratégies d'analyse de la LAM en CMF

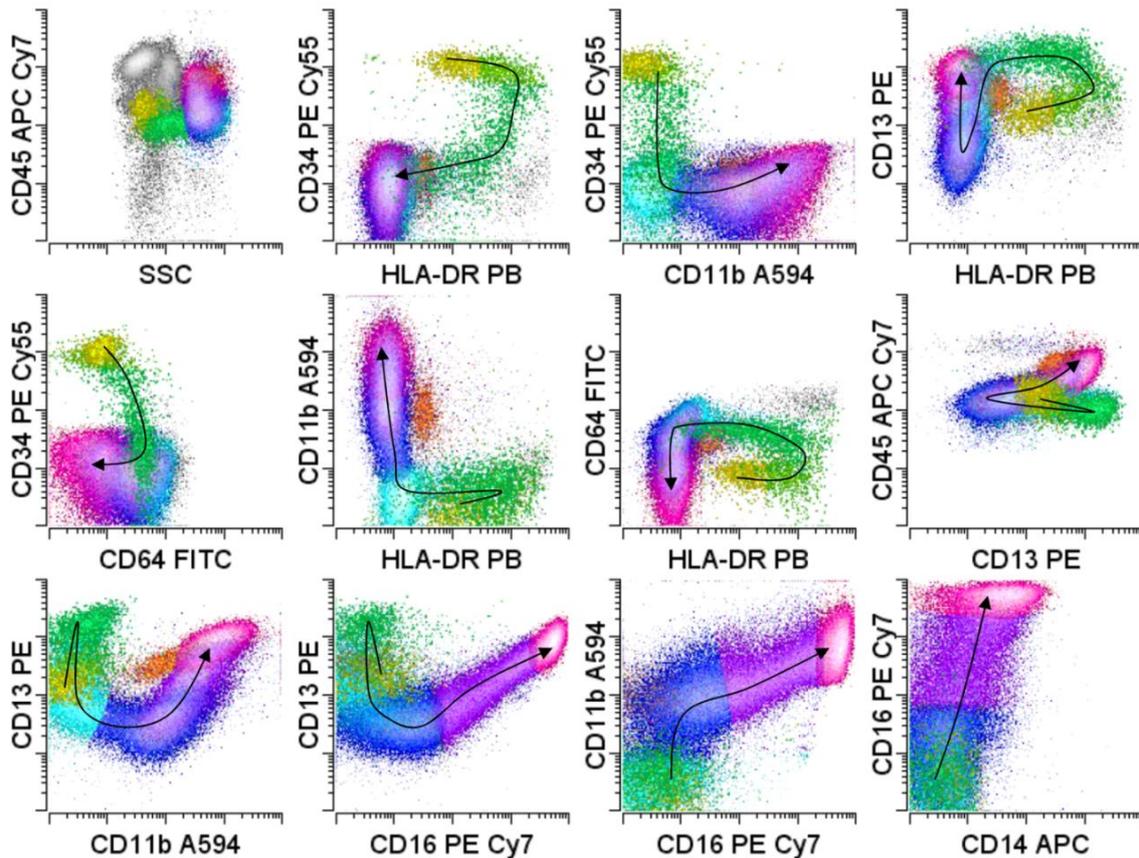
Dans la LAM, la CMF met en évidence les cellules leucémiques grâce à l'expression aberrante d'antigènes par les blastes leucémiques au diagnostic et en suivi.

#### a. Pré requis : connaissance de l'hématopoïèse normale

Une parfaite connaissance des chemins de maturation normaux est indispensable pour différencier les blastes leucémiques des cellules de l'hématopoïèse normale.

La maturation des cellules hématopoïétique est le résultat de l'expression séquentielle et régulée de gènes et de leurs produits (91). Par conséquent, l'expression des antigènes à la surface de ces cellules est prévisible et reproductible avec une maturation qui est en corrélation avec les étapes morphologiques et fonctionnelles (92). De nombreuses études se sont intéressées à l'expression normale des cellules hématopoïétiques et les schémas de différenciation de celles-ci sont à ce jour, bien connus.

Les figures 15 et 16 représentent les schémas de maturation normaux des lignées granulocytaire et monocytaire. Les flèches indiquent l'évolution de l'expression des différents antigènes leucocytaires : des stades les plus précoces aux plus différenciés.

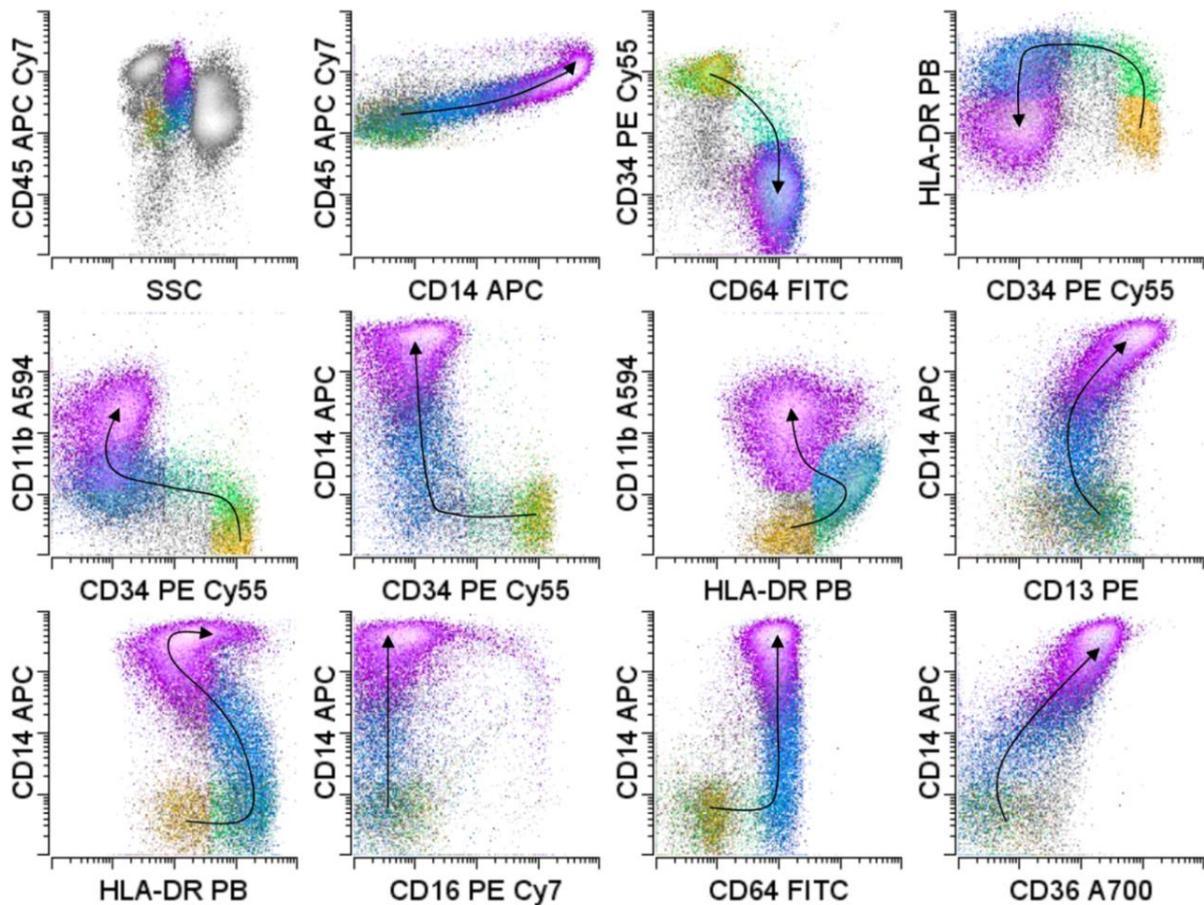


**Figure 15 : Maturation granulocytaire normale (92)**

*La maturation granulocytaire débute par les blastes précoces (jaune) puis tardifs (verts), promyélocytes (bleu clair), myélocytes (bleu foncé), métamyélocytes (violet) et enfin neutrophiles (rose). La population orange représente les polynucléaires éosinophiles*

Grâce aux combinaisons d'anticorps utilisés, il est ainsi possible d'identifier de manière précise les différents stades de maturation granulocytaire : des blastes précoces aux cellules matures (polynucléaires neutrophiles ou éosinophiles) (figure 15) (92).

Certains marqueurs sont exprimés uniquement par les précurseurs myéloïdes (CD34 et HLA-DR), d'autres marqueurs seront en revanche exprimés plus tardivement lors de la maturation granulocytaire (CD11b et CD16 par exemple).



**Figure 16 : Maturation monocytaire normale (92)**

La maturation monocytaire débute au stade monoblastique précoce (jaune) puis tardif (vert) pour aller vers le stade de promonocytes (bleu) et enfin monocytes (violet).

b. Les différentes approches dans l'évaluation de la MRD par cytométrie en flux

Deux stratégies sont principalement utilisées pour la quantification de la MRD-LAM en cytométrie : l'approche LAIP (*Leukemia-associated Aberrant ImmunoPhenotype*) et l'approche DfN (*Different from Normal*). Pour ces deux approches, l'ELN recommande l'utilisation de différents marqueurs de suivi : CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR, avec dans chacun des tubes la combinaison CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, FS/SS. Si nécessaire, il est possible d'ajouter un panel « monocytaire » incluant les marqueurs CD64, CD11b, CD14, CD4 et HLA-DR (87). Enfin, d'autres marqueurs ciblant les LSC sont en cours d'étude et de développement.

## Approche LAIP

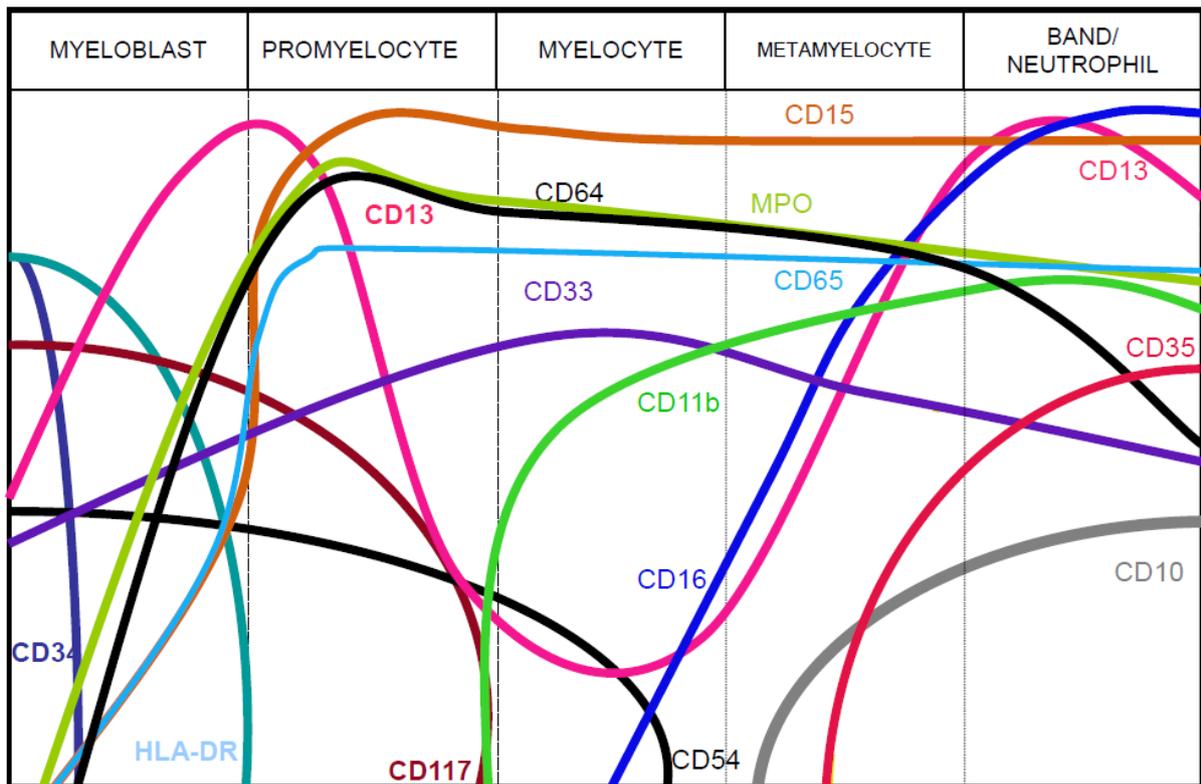
### Principe

L'approche LAIP repose sur l'identification d'un ou plusieurs immunophénotype(s) aberrant(s) associé(s) à la leucémie présents au diagnostic et leur suivi en cours de traitement. Ces anomalies, permettant de différencier les blastes leucémiques des blastes physiologiques, peuvent être classées en 3 catégories (93) :

- *Expression d'antigènes normalement non exprimés par la lignée myéloïde.* On parle d'infidélité de lignée (par exemple : l'expression du CD7, marqueur lymphoïde T à la surface d'un progéniteur myéloïde) ou expression aberrante (expression du CD56 à la surface des blastes myéloïdes)

- *Modulation de l'intensité d'expression de certains marqueurs de la lignée myéloïde* par comparaison aux progéniteurs myéloïdes physiologiques (absence, diminution ou sur-expression).

- *Asynchronisme d'expression d'antigènes* : c'est à dire une expression d'antigènes de lignée qui ne sont physiologiquement jamais co-exprimés sur une même cellule au cours de la différenciation myéloïde (exemple : co-expression de CD34 et CD65) (figure 17).



**Figure 17** : Intensité d'expression physiologique des différents marqueurs au cours de la maturation granuleuse (A. Orfao, ELNet Flow MDS 2008, Amsterdam)

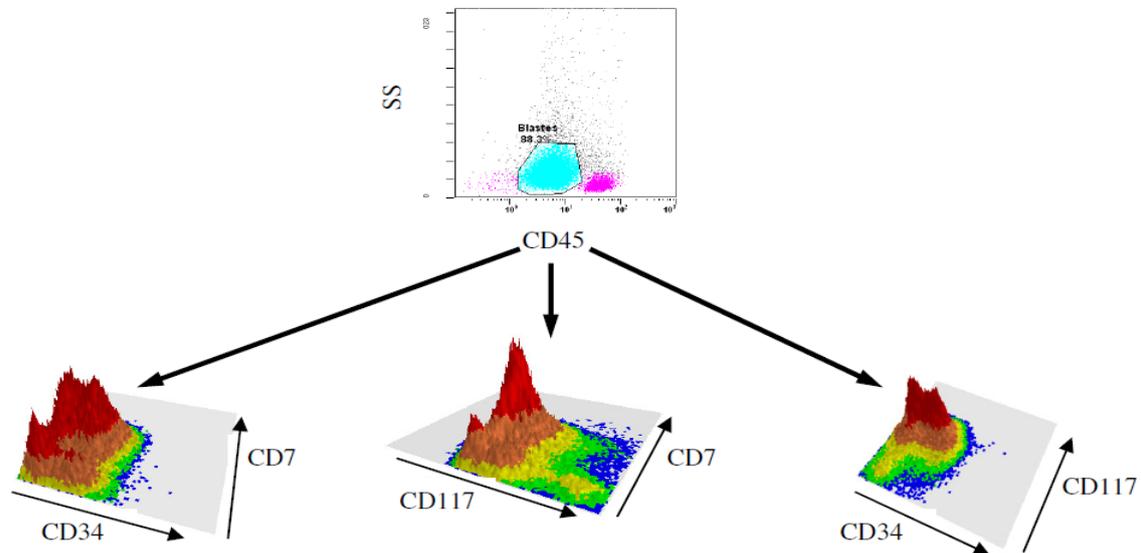
### Choix du LAIP

Un LAIP est généralement présent dans 80 à 90% des LAM. Le choix du ou des LAIP est primordial, et doit combiner à la fois des critères de sensibilité et spécificité. Le LAIP étudié ne doit pas être retrouvé dans une moelle normale ou être présent à des taux très faible, de l'ordre de  $10^{-4}$  (93). L'ELN a ainsi fixé un seuil de significativité à 0.1% à partir duquel une anomalie phénotypique permet d'affirmer la positivité de la MRD (87). En termes de sensibilité, dans une étude publiée en 2013, Feller *et al.* définissent des catégories de sensibilité distinctes en fonction de l'expression initiale des LAIP sur les blastes leucémiques. Pour être étudié en CMF, un LAIP doit représenter au moins 10% des blastes au diagnostic, avec des niveaux de sensibilité croissants selon le niveau d'expression (94).

Chez une faible proportion de patients (10 à 20% des LAM), aucune anomalie phénotypique n'est retrouvée sur les blastes leucémiques (95).

## Hétérogénéité phénotypique et glissements phénotypiques

Les LAM sont des pathologies complexes et les blastes leucémiques présentent fréquemment une importante hétérogénéité immunophénotypique, rendant parfois difficile le suivi en CMF (figure 18).



**Figure 18** : Hétérogénéité clonale au sein d'une même population blastique (Atelier de l'Association Française de Cytométrie, 5 juin 2018. Plesa et Roumier)

*Cette figure illustre l'hétérogénéité phénotypique au sein d'une population blastique de leucémie aiguë myéloïde : expression variable des antigènes de surface CD34, CD7, CD117 sur l'exemple illustré.*

Un seul LAIP ne représente pas nécessairement l'ensemble des blastes et donc plusieurs LAIP peuvent être mis en évidence pour une même LAM comme l'illustre la figure 18. En pratique, si cela est possible, il est recommandé de suivre plusieurs LAIP.

L'approche LAIP constitue une approche personnalisée, qui, en l'absence de protocole standardisé, nécessite que le suivi en CMF soit réalisé dans le même centre que celui qui a réalisé l'immunophénotypage au diagnostic. Cependant, l'interprétation de cette approche peut être délicate, en raison de la survenue de possibles « glissements phénotypiques » au cours de l'évolution de la maladie. Baer *et al.* ont mis en évidence des gains (CD4, CD13, CD33, CD34) ou pertes (CD56, CD19, CD14, CD11b) d'expression d'antigènes au sein de la population de blastes leucémiques entre le diagnostic et la rechute chez plus de 90% des patients (95). Ces glissements phénotypiques peuvent être liés au traitement et/ou à l'émergence ou la sélection d'un sous-clone, mineur et difficilement détectable au moment du

diagnostic (96). Ainsi, certains patients en rechute ne présentent pas le ou les mêmes LAIP que celui ou ceux présents au diagnostic, la MRD via l'approche LAIP risque d'être faussement négative. Cette approche seule ne peut donc suffire pour une évaluation optimale de la maladie résiduelle en CMF dans les LAM.

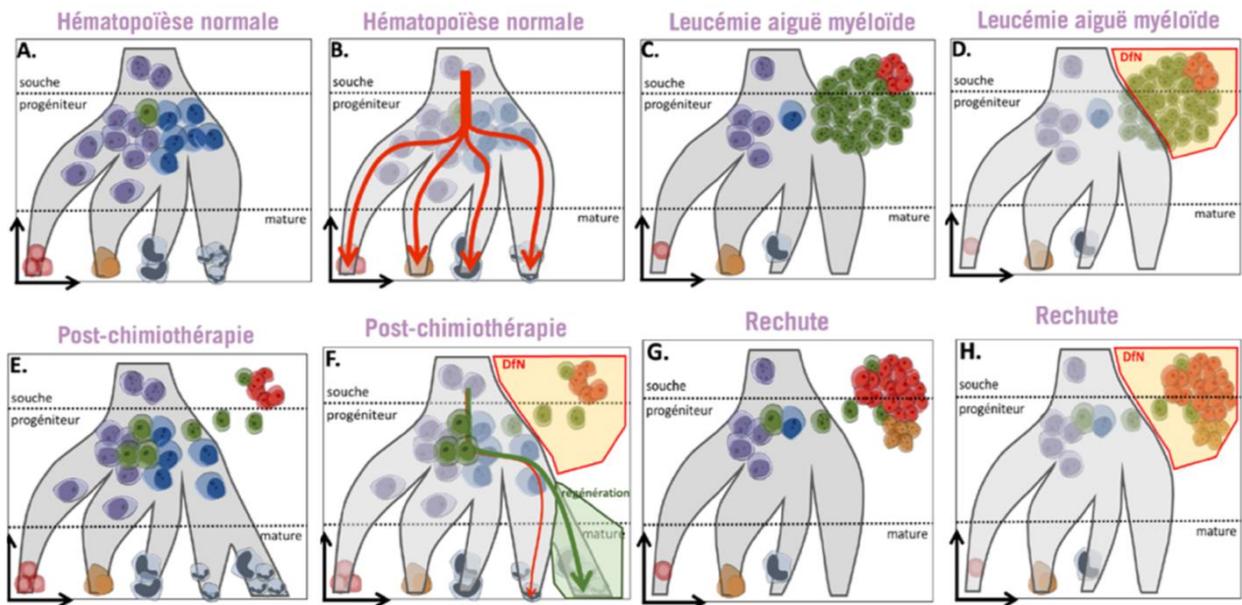
### **Approche *Different from Normal* (DfN)**

La stratégie DfN (pour *Different from Normal*), est une stratégie proche et complémentaire de la précédente. Elle consiste à distinguer les blastes leucémiques des cellules normales grâce à une combinaison d'antigènes déterminée, indépendamment du diagnostic.

Une parfaite connaissance de l'hématopoïèse normale à l'aide de moelles de référence est donc indispensable pour objectiver la présence d'une population anormale, au profil de différenciation aberrant.

Même si ces deux approches sont étroitement liées, la stratégie « différent du normal » présente l'avantage de pouvoir être appliquée en cas de glissement phénotypique, et lorsque l'immunophénotypage des blastes au diagnostic n'est pas accessible (87).

La figure 19 illustre, à l'aide d'un exemple, le principe général de ces deux approches :



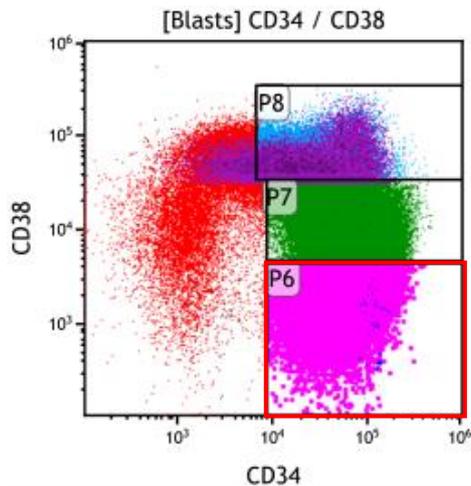
**Figure 19 : Représentation schématique : stratégies de recherche MRD-LAM en CMF (93)**

**A et B.** Représentation schématique de l'hématopoïèse normale ; **C.** Diagnostic de leucémie aiguë myéloïde avec deux clones (deux LAIP) : un majoritaire en vert, présent physiologiquement en très faible quantité (A.) mais pouvant être augmenté dans une moelle de régénération (comme en post-chimiothérapie par exemple (E. et F.)) ; un minoritaire en rouge « différent du normal » (D.) ; **G. et H.** Lors de la rechute, le LAIP rouge devient clone majoritaire, le vert est quasi absent et un nouveau clone émerge (LAIP orange)

### Approche Cellules Souches Leucémiques (LSC)

L'approche LSC vise à déterminer la proportion de cellules souches leucémiques au diagnostic et en suivi.

Au diagnostic, une fréquence élevée de cellules CD34+ CD38-, compartiment riche en LSC, constitue un facteur pronostic indépendant d'évolution péjorative (97). La figure 20 illustre un exemple de LAM avec compartiment riche en cellules CD34+ CD38- (98).



**Figure 20 : LAM au diagnostic avec fréquence élevée de cellules CD34+/CD38- (données CHV)**

*En abscisse, l'intensité d'expression du CD34 et en ordonnée, intensité du CD38. Encadrée en rouge la population CD34+/CD38-, compartiment riche en cellules souches leucémiques*

Pour une estimation précise de la fréquence des LSC, il est essentiel de bien connaître leur profil immunophénotypique afin de les séparer au mieux des HSC et autres progéniteurs hématopoïétiques normaux. De nombreuses études s'intéressant à l'expression des marqueurs à la surface des LSC ont pointé leur grande hétérogénéité, rendant difficile la classification de ces cellules.

Néanmoins, aujourd'hui, un certain nombre de marqueurs de surface critiques ou spécifiques des LSC de LAM ont été identifiés. Par exemple, il a été montré que les antigènes de surface CD90 et CD117 sont déficients sur les LSC (99,100) tandis que CD123 (101), TIM-3 (102), CLL-1 (103), CD47 (104), CD97 (105), CD45RA (98) sont plus fréquemment ou fortement exprimés à leur surface.

Les marqueurs de lignées lymphoïdes et NK CD2, CD7, CD19, CD22, CD56 peuvent également être exprimés à la surface des CSL, et sont classiquement absents des CSH (106). Le CD33 est plus fortement exprimé à la surface des LSC.

Le tableau 7 reprend les principaux marqueurs ayant un intérêt pour l'identification des LSC CD34+ CD38- (107).

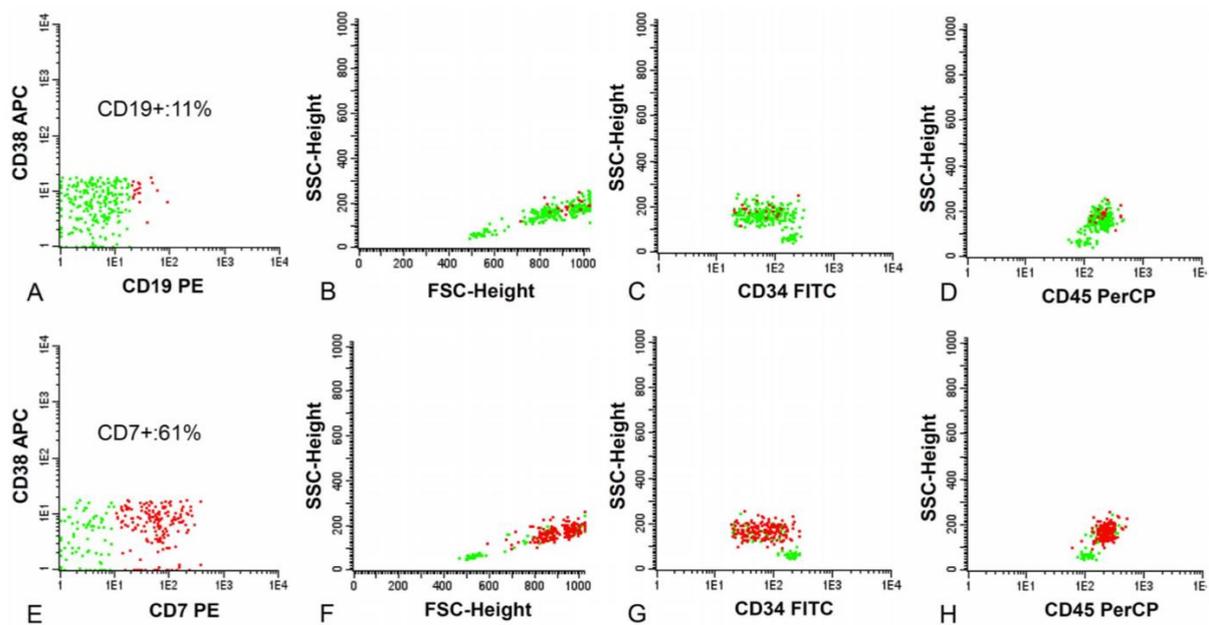
**Tableau 7 : Marqueurs d'intérêt pour l'identification des LSC (107)**

Marker	Identified as	Expression			
		Normal	In AML (%)	HSC	CD34+ CD38- LSC
IL1RAP	IL1R3	T cells	79	-	+
CLL-1	CLEC12A, MICL, DCAL-2	Myeloid cells	70	-	+
TIM-3	T-cell Ig Mucin 3	Activated T cells, NK cells	91	-	+
CD2	SRBC, LFA2, T11	T cells, NK cells	87	-	+
CD7	GP40, TP41, LEU-9	T cells	43	-	+
CD11b	Integrin alpha M, Mac-1	Myeloid cells	55	-	+
CD22	BL-CAM, Siglec-2	B cells	51	-	+
CD25	IL2RA, TAC	Activated B and T cells	25	-	+
CD33	P67, Siglec-3	Myeloid cells, NK cells	82	+	++
CD44	Adhesion molecule	Ubiquitously	100	+	++
CD45RA	Tyrosine phosphatase receptor type C	T cells, myeloid cells	65	-	+
CD47	Integrin-associated protein (IAP)	Ubiquitously	100	+	++
CD56	N-CAM, MSK39	NK cells, activated T cells	32	-	+
CD96	TACTILE	Activated T cells	33	-	+
CD99	MIC2, single-chain type-1 glycoprotein	Myeloid cells	83	-	+
CD123	IL3R	Myeloid cells	82	+	++

*AML = Acute Myeloid Leukaemia ; HSC = Hematopoietic stem cells ; LSC = Leukemia stem cells*

En plus de permettre une meilleure identification de ces cellules, ces découvertes suggèrent l'élaboration de nouvelles thérapeutiques ciblant préférentiellement les marqueurs de surface des LSC. Dans les LAM, différentes cibles potentielles sont en développement incluant CD33, CLL1, CD123, CD47 (107,108).

Outre, leur profil d'expression antigénique, les propriétés physiques de taille (FSC) et de granulosité (SSC) peuvent également différer entre les LSC et les HSC (figure 21) (50).



**Figure 21** : Variations d'expression de différents paramètres entre les LSC et les HSC (50)

Les LSC colorisées en rouge présentent un signal FSC et SSC plus intense que les HSC colorisées en vert. Les HSC et LSC peuvent également présenter des intensités d'expression différente pour le CD34 et le CD45.

Il est à noter que le suivi de la MRD par l'approche LSC est le plus souvent réalisable dans les LAM CD34+ (environ 80% des LAM), néanmoins la détection des CSL peut également être réalisée dans certaines LAM CD34- (exemple : LAM *NPM1* muté *FLT3-ITD*- CD34- pour lesquelles une fréquence élevée de LSC peut être observée (97)).

### 2.3.3- Points de suivi

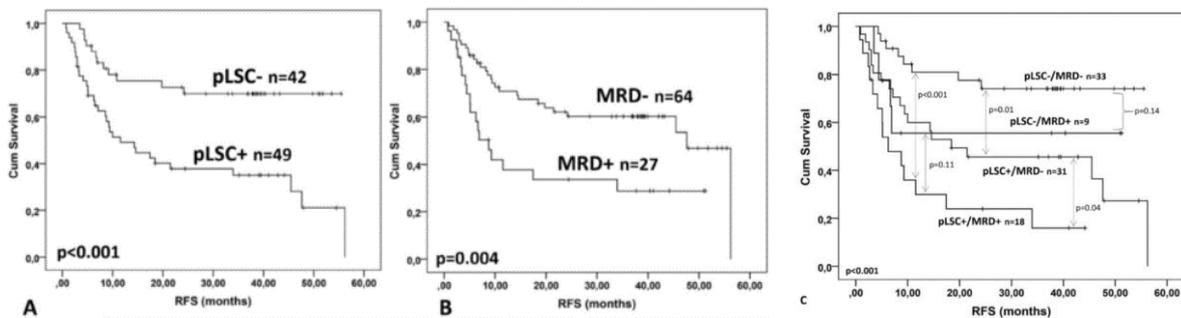
Les points de suivi les plus pertinents pour le suivi de la MRD dépendent du type de marqueur étudié, le choix des points étant par ailleurs très variable d'une étude à l'autre (87). Il semble néanmoins qu'une évaluation de la MRD sur un seul point de suivi doive être évitée compte tenu des glissements phénotypiques possibles et d'un manque de spécificité d'une telle stratégie (109). Une approche pragmatique consiste à utiliser les mêmes points de suivi quel que soit le type de LAM, incluant en particulier un suivi en post induction, post consolidation et en pré-allogreffe.

### 2.3.4- Intérêts

Tout comme la MRD en biologie moléculaire, la MRD en cytométrie en flux permet la détection de cellules leucémiques résiduelles non détectables par les techniques morphologiques. Elle constitue donc un marqueur plus sensible du statut de rémission que la cytologie et semble pouvoir constituer un marqueur pronostic intéressant pour le suivi thérapeutique et la stratification du risque dans les LAM.

De nombreuses études se sont intéressées à la valeur pronostique de la MRD en CMF. En particulier, deux grandes études prospectives multicentriques réalisées chez des sujets adultes atteints de LAM ont identifié la MRD par CMF comme facteur pronostic de survie indépendant des autres paramètres étudiés. Un résultat de MRD positif est associé dans ces deux études à un risque de rechute plus élevé et à une moins bonne survie globale (80,89).

Dans la majorité des études, l'évaluation de la MRD par cytométrie en flux a été réalisée selon l'approche LAIP/DfN. En 2014, Terwijn *et al.* ont cherché à combiner les informations apportées d'une part par la proportion de LSC et d'autre part par l'approche MRD LAIP et DfN pour une meilleure stratification pronostique. Ainsi, quatre groupes de patients ayant des survies différentes ont pu être séparés (figure 22) (50).



**Figure 22** : Valeur pronostique (impact sur la survie sans rechute) de l'approche LSC combinée à l'approche LAIP/DfN (50)

A : Survie sans rechute évaluée par l'approche LSC seule ; B : Survie sans rechute évaluée par l'approche MRD LAIP/DfN seule ; C : Survie sans rechute évaluée par la combinaison des deux approches

De la même manière que pour la MRD LAIP/DfN, la mise en évidence d'une MRD-LSC positive avant ou après transplantation allogénique de cellules souches est

associée à un risque de rechute post-transplantation plus élevé et à une moins bonne survie globale (110).

Enfin, à différents moments du traitement (induction I/II et consolidation), la survie sans rechute est systématiquement plus élevée chez les patients ayant un taux de LSC plus faible (MRD-LSC négative) (50).

L'évaluation de la MRD en CMF présente, par ailleurs, l'avantage d'être applicable dans environ 90% des LAM. Elle peut donc permettre un suivi chez des patients n'ayant aucune anomalie en biologie moléculaire ou présentant des anomalies pour lesquelles un suivi n'est pas réalisable (87,111). Elle est ainsi recommandée en suivi chez les patients n'appartenant pas aux sous-groupes *NPM1* muté, LAM CBF ou LAP (87).

Par ailleurs, la CMF est accessible dans la majorité des centres, pour un coût relativement faible. Enfin, le délai de rendu des résultats est rapide et possible en moins de 24h.

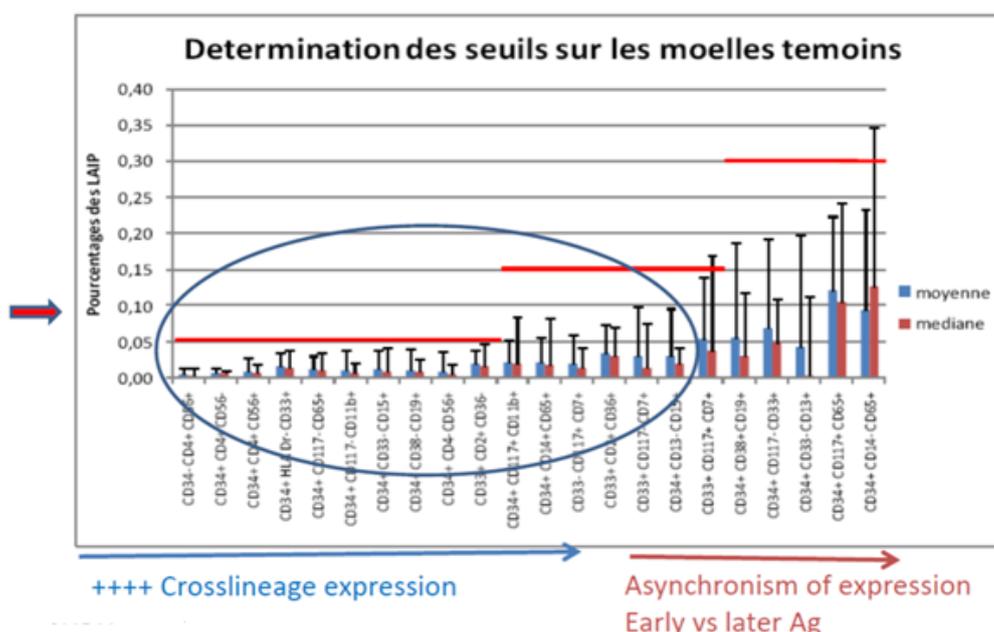
### 2.3.5- Limites de la MRD-LAM en CMF

#### *a. Sensibilité de la technique*

Les progrès réalisés en cytométrie multiparamétrique ont permis d'atteindre un seuil de sensibilité de l'ordre de  $10^{-3}$ , seuil minimal recommandé par l'ELN pour la MRD-LAM. Ce niveau de sensibilité reste modéré et inférieur aux techniques de biologie moléculaire. Des niveaux de sensibilité de l'ordre de  $10^{-4}$  sont obtenus en combinant les approches et en augmentant le nombre de fluorochromes étudiés (panel 8 ou 10 couleurs), ainsi que le nombre d'évènements acquis (87). Cependant, ces niveaux de sensibilité ne sont pas systématiquement obtenus, en raison de contraintes liées aux caractéristiques propres à la LAM ou à la qualité du prélèvement. Une évaluation de la MRD sur différents points de suivi, après chaque cycle de chimiothérapie permet de réduire le taux de faux négatifs, tout comme l'utilisation combinée de différentes approches d'évaluation de la MRD en CMF (approche LAIP/DfN/LSC) (97).

## b. Spécificité de la technique

Le choix d'un LAIP de qualité est déterminant pour l'évaluation de la sensibilité de la technique, le seuil de positivité dépendant directement de l'expression physiologique de ce LAIP au sein de moelles témoins. En 2009, Dumezy a étudié l'expression de différents LAIP sur des moelles témoins, les meilleurs LAIP correspondant aux LAIP présentant le plus faible niveau d'expression (taux < 0.05% pour les LAIP avec « infidélité de lignée ») (figure 23) (112). Pour être validé, moins de 0.1% des cellules médullaires normales doivent exprimer le LAIP.



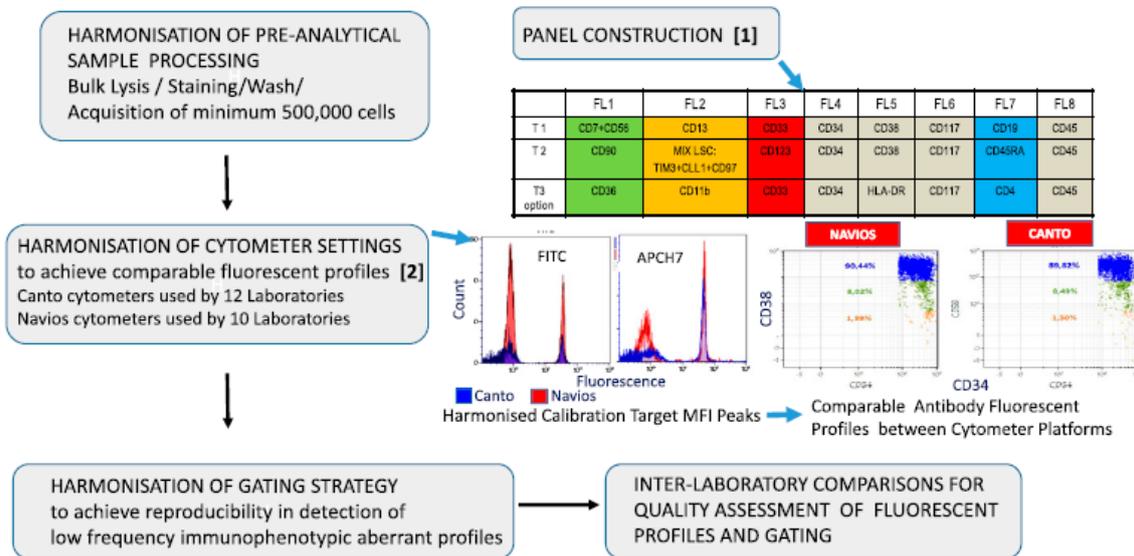
**Figure 23** : Détermination des seuils d'expression de différents LAIP sur des moelles témoins (112)

Pourcentage d'expression des LAIP étudiés sur un pool de moelles témoins. Les LAIP avec « infidélité de lignée » ont un taux d'expression généralement plus faible (fréquemment < 0.05%), par rapport aux LAIP avec perte d'expression (CD34+ CD33- CD13+) ou asynchronisme d'expression (CD34+ CD117+ CD65+).

## c. Défaut de standardisation

Il n'existe actuellement pas de protocole standardisé de suivi de la MRD-LAM en CMF sur le choix du panel d'anticorps devant être utilisé, le protocole technique et de réanalyse à adopter, le seuil de positivité, ainsi que sur la définition des différents points de suivi. Depuis 2018, l'ELN et la FDA ont émis des recommandations à ce sujet intégrant le choix des échantillons, les approches recommandées, les points de suivi et les seuils de positivité définis (87,97). L'intergroupe Français des LAM a par ailleurs réalisé un travail de standardisation dans la mise en place d'un panel de suivi

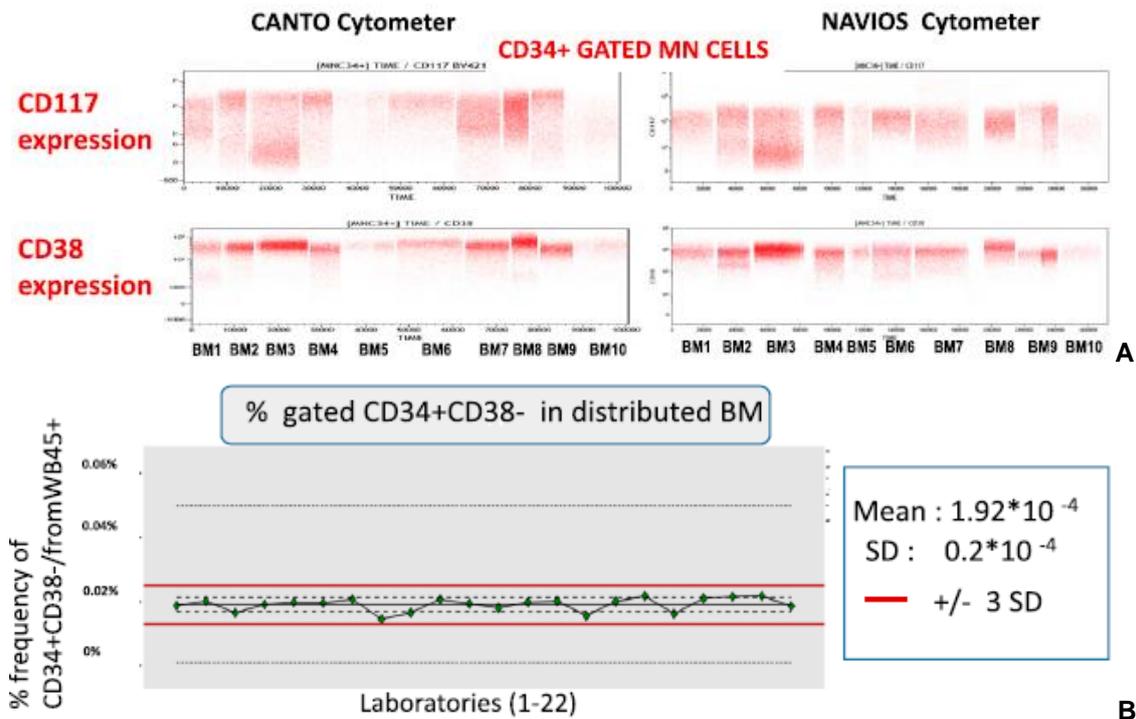
de la MRD en CMF multiparamétrique (approche conjointe LAIP/DfN et LSC) : stratégie actuellement utilisée pour le suivi de la MRD des patients LAM de deux études cliniques BIG-1 et ALFA-1200 (figure 24).



**Figure 24 : Stratégie d'harmonisation multicentrique de la MRD-LAM en cytométrie en flux, pour l'intergroupe ALFA (Plesa et Roumier, communication écrite, ASH 2019)**

Stratégie d'harmonisation mise en œuvre par l'Intergroupe ALFA concernant le choix du panel, le traitement de l'échantillon, le réglage des cytomètres, et la stratégie de gating. Une harmonisation « en miroir » des réglages des cytomètres Navios® (Beckman Coulter) et Canto® (Becton Dickinson) a été réalisée de façon à obtenir des profils de fluorescence comparables entre les différentes plateformes de cytométrie.

La figure 25 présente les résultats des contrôles de qualité inter-laboratoires obtenus au sein de l'intergroupe ALFA.



**Figure 25** : Exemples de résultats de contrôles inter-laboratoires de MRD-LAM de l'intergroupe ALFA – automates Navios® (Beckman Coulter) et Canto® (Becton Dickinson) (Plesa et Roumier, communication écrite ASH 2019)

Sont présentés les profils de fluorescence d'expression du CD117 et du CD38 à la surface des cellules CD34+ (A), et les données de reproductibilité pour la détection d'évènements rares (B) (stratégie de gating de la population CD34+CD38-). Mean = Moyenne ; SD = Déviation standard

Les résultats obtenus semblent valider la faisabilité d'une approche multicentrique standardisée d'évaluation de la MRD-LAM par cytométrie en flux. L'efficacité d'une telle stratégie d'harmonisation pour l'étude de la MRD-LAM en CMF a par ailleurs, été montrée par Lacombe *et al.* dans le cadre d'une étude prospective multicentrique française (113).

#### d. Niveau d'expertise

L'approche MRD en CMF est relativement complexe et nécessite une expertise importante. Dans l'étude de Feller *et al.*, cinq centres ont mis au point un protocole commun de suivi de la MRD-LAM. Les résultats suggèrent des performances inégales entre les centres, avec de meilleurs résultats obtenus pour le centre de référence par rapport aux autres centres. Ces disparités inter-centres ont néanmoins été significativement diminuées après une phase d'apprentissage (94).

#### e. Limites de l'approche « classique » des techniques de cytométrie en flux

L'approche immunophénotypique conventionnelle fait appel à la subjectivité du cytométriste dans la détermination des populations cibles. De plus, ces dernières années, le nombre de paramètres analysés simultanément en cytométrie en flux a considérablement augmenté. L'analyse conventionnelle des données repose sur l'analyse hiérarchique de multiples graphiques bi-paramétriques, avec le risque d'omettre certaines informations pertinentes. Il est en effet difficile et fastidieux de garder une vue d'ensemble de l'expression des marqueurs au sein des différentes populations cellulaires. L'utilisation de nouveaux logiciels d'analyse des data semble dès lors indispensable.

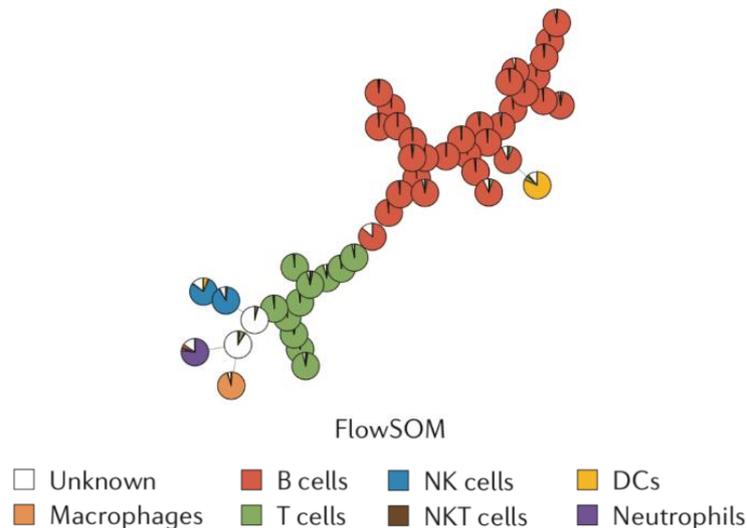
#### 2.3.6- Perspectives : Analyse non supervisée

##### a. Principe général

Récemment, de nouvelles solutions informatiques d'analyse de données ont ainsi été développées afin de réaliser une analyse multidimensionnelle des données de CMF (114,115). L'objectif est de représenter dans un espace à deux ou trois dimensions, des espaces à  $n$  dimensions. Ces représentations sont des combinaisons mathématiques d'intensité de signal pour les différents paramètres étudiés. Les populations cellulaires de l'échantillon présentant des caractéristiques proches sont représentées grâce à l'analyse mathématique.

Différents logiciels d'analyse statistique et graphique ont ainsi été développés pour pallier aux limites de l'analyse conventionnelle et permettre l'analyse de données de plus en plus complexes. Le logiciel R, librement accessible (téléchargeable sur <https://cran.r-project.org>) est un logiciel dédié à l'analyse statistique, permettant d'interagir avec les données, les visualiser et les interpréter. D'utilisation « relativement » aisée, R est muni d'un langage de programmation et constitue une interface par défaut pour l'utilisation d'outils d'analyse automatisée de données tels que l'analyse en composantes principales (PCA), t-SNE (*t-Stochastic Neighbourhood Embedding*) et FlowSOM (*Self Organizing Map*) (116).

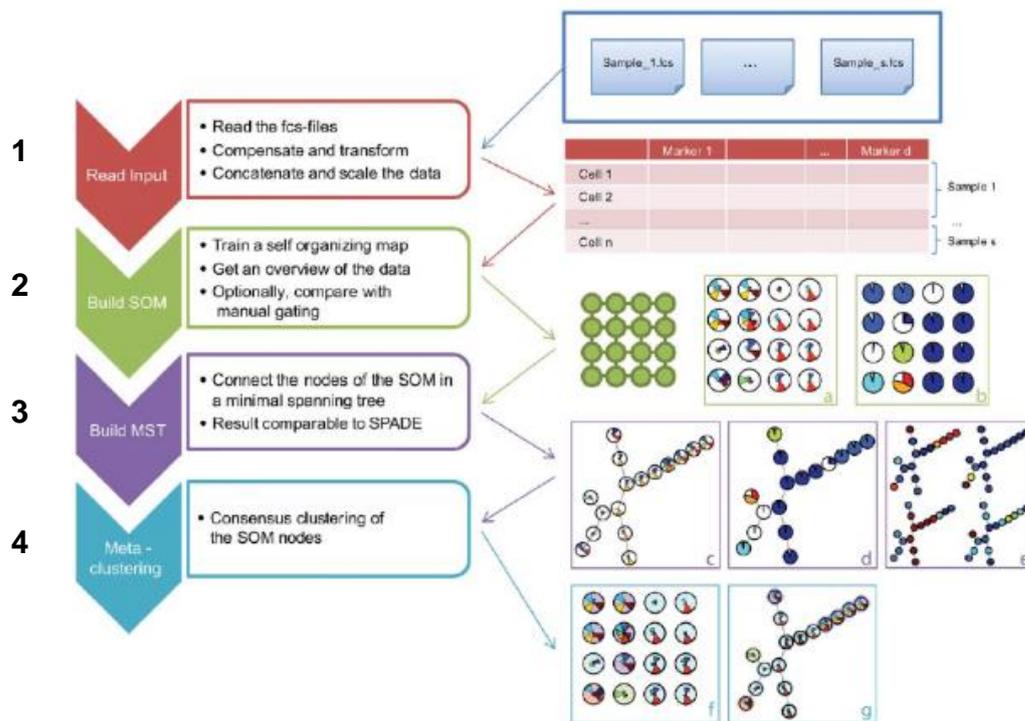
Parmi ces approches, FlowSOM est un outil de visualisation prenant en compte tous les marqueurs simultanément. Il a pour but de regrouper les sous-populations cellulaires les plus similaires en « nœuds», visualisables sous forme d'arborescence. A l'intérieur de chaque nœud, un camembert permet de donner simultanément le niveau d'expression de chacun des marqueurs (figures 26). Sa capacité à traiter rapidement un grand nombre de données et sa simplicité d'utilisation en font un outil intéressant pour l'étude des hémopathies malignes (114,115,117).



**Figure 26** : Exemple de représentation de données de CMF selon l'analyse FlowSOM (117)

*Représentation cellulaire sous forme d'arborescence : chaque nœud correspond à une sous-population cellulaire (cluster), à l'intérieur d'un nœud la représentativité de chaque marqueur peut être visualisée sous forme de camembert.*

Le processus d'analyse est composé de quatre étapes, comme décrit dans la figure 27 (114).



**Figure 27 : Stratégie d'analyse sur FlowSOM (114)**

1 : La 1<sup>ère</sup> étape de traitement des données consiste à lire les fichiers de cytométrie au format « .fcs » et à élaborer une matrice avec, pour chaque cellule analysée, les valeurs des marqueurs mesurés

2 : Une carte « auto-organisée » est alors construite à partir de la matrice de valeurs

3 : Les cellules sont réorganisées en clusters présentés sous forme d'une grille de « nœuds ». Les nœuds sont ensuite connectés sous forme d'arborescence

4 : Enfin, un « metaclustering » est réalisé, permettant l'identification de populations cellulaires aux caractéristiques similaires

#### *b. Utilisation et perspectives dans la MRD-LAM*

Plusieurs études se sont intéressées à l'utilisation d'algorithmes informatiques pour le diagnostic et la classification des LAM. Les résultats suggèrent que les méthodes automatisées peuvent atteindre une précision suffisante pour une utilisation fiable des données de CMF au diagnostic de LAM pour l'identification et la classification de la population leucémique (115,118,119).

Concernant l'utilisation de ces outils informatiques pour l'évaluation de la MRD-LAM, les analyses sont plus complexes en raison notamment de l'hétérogénéité clonale inhérente à la pathologie, de la possibilité de glissements phénotypiques, des seuils de détection recommandés pour la détection d'évènements rares (115). Une confrontation des deux approches « conventionnelle » et « non supervisée » reste à ce jour indispensable pour une bonne interprétation des résultats.

## II- Objectifs

Les objectifs de ce travail sont :

- De réaliser la mise en place, au Centre Hospitalier de Valenciennes d'un protocole d'évaluation de la MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN-LSC de l'intergroupe français des LAM, en cytométrie multiparamétrique 10 couleurs sur automate Navios® (Beckman Coulter), et disposer ainsi d'un protocole standardisé d'évaluation de la MRD-LAM avec le CHU de Lille.
- D'évaluer les performances de notre technique en termes de sensibilité et spécificité
- D'évaluer la possibilité d'utiliser des algorithmes d'analyse non supervisée en complément des techniques de cytométrie conventionnelle pour l'évaluation de la MRD-LAM.

Les moyens mis en œuvre pour arriver à ces objectifs sont :

- De procéder à une harmonisation entre le laboratoire du CHV et celui du CHU de Lille concernant le choix du panel d'anticorps, le traitement de l'échantillon, le réglage des cytomètres
- D'appliquer le masque d'analyses du groupe MRD-LAM ALFA, de définir la stratégie de réanalyse et de standardiser le mode de rendu des résultats
- D'évaluer les performances de la technique mise en place en termes de sensibilité et de spécificité
- De comparer les résultats obtenus au CHV et au CHU de Lille : protocole technique et stratégie de réanalyse
- D'établir la concordance entre les résultats de MRD-LAM obtenus en cytométrie en flux et en biologie moléculaire
- D'analyser les résultats de MRD-LAM obtenus sur FlowSOM à ceux obtenus par les techniques de cytométrie conventionnelle



### **III- Matériel et méthodes**

#### **1- Population étudiée et prélèvements**

##### **1.1- Population de l'étude**

Les patients étudiés (patients atteints de LAM ou population témoin) ont été hospitalisés ou admis en consultation entre juin 2019 et juin 2020 au CH de Valenciennes ou au CHU de Lille.

Au CH de Valenciennes, tous les patients pour lesquels une LAM a été diagnostiquée, et pour lesquels nous disposions d'un échantillon de moelle sur EDTA au diagnostic ou en suivi, ont été inclus de façon prospective - à l'exclusion des LAP, exclues de l'étude.

Au CHU de Lille, les patients atteints de LAM ont été sélectionnés selon les besoins de l'étude à disposer d'une cohorte plus importante et de différents points de MRD.

##### **1.2- Prélèvements**

Les moelles utilisées sont des échantillons prélevés sur tube EDTA BD Vacutainer® et conservés à T°C ambiante pendant une durée maximale de 48 à 72h.

La majorité des échantillons de moelles de LAM ont été traités en parallèle, de façon prospective, sur les cytomètres du CHU de Lille et du CHV : protocole technique et stratégie de réanalyse réalisés sur les 2 sites.

Des échantillons supplémentaires, traités et analysés sur le site de Lille, ont été réanalysés à posteriori par le CH de Valenciennes.

Un pool de 10 moelles témoins a été constitué au CHV afin de disposer d'un échantillonnage suffisamment représentatif. Le choix des moelles de référence s'est effectué selon plusieurs critères :

- Disponibilité d'un prélèvement médullaire prélevé sur EDTA et non utilisé pour tout autre examen nécessaire au patient
- Patients adultes âgés de 18 à 75 ans

- Analyse cytologique approfondie du myélogramme ne mettant pas en évidence d'anomalies qualitatives ou quantitatives et évoquant un aspect de moelle normale, inflammatoire ou de régénération
- Indication du myélogramme et données clinico-biologiques validant l'utilisation de l'échantillon comme moelle témoin (absence notamment d'antécédent ou de suspicion de pathologie myéloïde)

### **1.3- Recueil de données**

Les données cliniques et biologiques sont celles obtenues lors d'une consultation et/ou hospitalisation et accessibles dans le Système Informatique de Laboratoire (SIL) (DxLab® au CHV et Molis® au CHU de Lille) et à partir du logiciel de gestion des patients (Millenium® au CHV et Sillage® au CHU de Lille).

## **2- Mise en place d'un nouveau protocole LAM en CMF**

### **2.1- Matériel**

#### **2.1.1- Cytomètres**

L'ensemble des échantillons cellulaires a été acquis sur cytomètre multiparamétrique Navios® (société Beckman Coulter®), en configuration 10 couleurs (3 lasers). Le laboratoire d'hématologie du CHU de Lille dispose de deux cytomètres Navios® validés en miroirs. Le CH de Valenciennes dispose d'un seul cytomètre Navios®.

Le réglage de chacun des cytomètres est vérifié quotidiennement :

- passage de billes Flowset® permettant de vérifier les tensions des photomultiplicateurs (PMT), afin de s'assurer que la sensibilité du cytomètre reste stable tout au long de l'étude.
- passage de billes Flowcheck® permettant de contrôler la conformité optique (alignement du laser) et la fluidique du cytomètre.

Le réglage des compensations qui consiste à s'affranchir des fuites de fluorescence d'un fluorochrome dans le canal d'un autre fluorochrome dû au chevauchement de certains spectres d'émission est vérifié lors de la réanalyse des données.

### 2.1.2- Logiciel

Kaluza® (version 2.1) de la société Beckman Coulter est le logiciel utilisé sur les deux sites pour la réanalyse des données issues des cytomètres Navios®.

### 2.2- Mise en miroir des cytomètres

Sur le cytomètre Navios® du CHV, dans le cadre du protocole LAM, les voltages des PMT ont été réglés de façon à s'aligner sur les cibles des billes Flowset® du CHU de Lille (tableau 8). Un passage du même lot de billes Flowset® a ensuite été réalisé sur le site du CHV afin de valider ces réglages.

**Tableau 8 : Cibles FlowSet® du CHU de Lille**

Canal	Limites basses - 15%	Cibles FlowSet® Navios® Lille	Limites hautes + 15%
FL1	73,36	86,30	99,25
FL2	100,30	118,00	135,70
FL3	106,25	125,00	143,75
FL4	71,40	84,00	96,60
FL5	29,07	34,20	39,33
FL6	8,47	9,97	11,47
FL7	81,01	95,30	109,60
FL8	62,39	73,40	84,41
FL9	66,47	78,20	89,93
FL10	160,65	189,00	217,35

### 2.3- Évaluation de la dilution du prélèvement

Le résultat de MRD est à interpréter en fonction de la pureté du prélèvement. Afin de s'affranchir d'une éventuelle hémodilution, il est préconisé de privilégier le premier échantillon de moelle pour l'analyse de la MRD (87).

Une évaluation de la dilution du prélèvement de moelle osseuse a systématiquement été réalisée. Différentes stratégies ont été utilisées :

- Réalisation d'une formule médullaire au microscope après étalement d'un frottis réalisé à partir du prélèvement obtenu sur tube EDTA.

Un pourcentage de PNN matures supérieur à 40% et/ou d'érythroblastes inférieur à 5%, et/ou de lymphocytes >20% doit faire suspecter une hémodilution du prélèvement (120).

- Formule d'Holdrinet (121) basée sur une relation de proportionnalité entre les érythrocytes et éléments nucléés du sang et de la moelle :

$$\% \text{ pureté médullaire} = \left( 1 - \left( \frac{GR(MO)}{GR(Sg)} \times \frac{GB(Sg)}{GB(MO)} \right) \right) \times 100$$

**GR (MO)** = globules rouges médullaires, **GR (Sg)** = globules rouges sanguins, **GB (Sg)** = globules blancs sanguins, **GB (MO)** = globules blancs médullaires

Cette formule nécessite de disposer d'une numération sanguine datant du même jour que le prélèvement médullaire. Une pureté supérieure à 70% est en faveur d'un prélèvement de moelle très pur.

- Évaluation de la pureté médullaire basée sur la quantification des précurseurs hématopoïétiques CD34+ :

$$P = \left( \frac{\frac{n}{L} - s}{m - s} \right) \times 100$$

Soit **P** = Pureté (en %) ; **n** = nombre de CD34+ observés ; **L** = nombre de leucocytes CD45+ observés ; **s** = proportion de CD34+ théorique du sang (0.0005) ; **m** = proportion de CD34+ théorique médullaire (0.035)

*Formule mise au point par le Dr F. Dumezy, CHU de Lille*

Avec cette formule, pour une pureté supérieure à 10%, la majorité des cellules CD34+ étudiées sont issues de la moelle. Une analyse sur minimum 2 000 évènements CD34+ est recommandée pour une analyse optimale de la MRD.

Ces différentes techniques d'évaluation de la pureté médullaire présentent leurs avantages et limites. Une confrontation des différents résultats permet une appréciation globale de la pureté médullaire.

## 2.4- Choix du tampon de lyse

Une lyse macrovolume est recommandée (*Bulk Lyse* ou macrolyse). Différents types de lyse ont été validées par le groupe incluant notamment une lyse à base de NH<sub>4</sub>Cl comme utilisée au CHU de Lille, ou la Versalyse® commercialisée par Beckman Coulter. L'Optilyse® est une lyse à base de formaldéhyde également commercialisée par Beckman Coulter et utilisée au laboratoire de Valenciennes pour le typage des hémopathies malignes.

Nous avons réalisé une comparaison d'échantillons traités en parallèle sur les sites du CHU de Lille et du CHV avec la lyse NH<sub>4</sub>Cl, l'Optilyse® et la Versalyse®. Une lyse macrovolume ainsi qu'un ajustement de la suspension cellulaire à 10 millions de cellules/mL ont été réalisés.

## 2.5- Anticorps et fluorochromes utilisés

### 2.5.1- Choix du panel d'anticorps

Le choix du panel s'est basé sur les recommandations du groupe CMF LAM BIG ALFA (tableau 9). Il vient en remplacement de l'ancien panel utilisé au CH de Valenciennes : panel utilisé uniquement au diagnostic et non validé pour le suivi de la MRD-LAM.

Une comparaison des résultats obtenus avec l'ancien et le nouveau panel a été réalisée sur 23 échantillons au diagnostic afin de valider ce nouveau panel (données non présentées dans ce travail).

**Tableau 9 : Panel d'anticorps recommandé par le groupe CMF-LAM BIG ALFA**

Panel LAM sur moelle										
	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PB	KrO
Tube 1	CD7	CD13	HLA-DR	CD33	CD38	CD34	CD56	CD19	CD117	CD45
Tube 2	CD90	Mix*	CD19	CD123	CD38	CD34	CD36	CD45RA	CD117	CD45
Tube 3	CD65	CD4	HLA-DR	CD33	CD11b	CD34	CD36	CD14	CD117	CD45

\*Mix = TIM-3 + CLL-1 + CD97

- Le tube 1 (Orientation) est le tube le plus utilisé pour la recherche et la définition d'un LAIP

- Le tube 2 (Cellules Souches Leucémiques) permet de caractériser précisément les LSC à l'aide de marqueurs spécifiques (Mix, CD123, CD45RA, CD90...). Il est indispensable pour la quantification des LSC au diagnostic et au suivi.

-Le tube 3 (Monocytaire) est particulièrement utile pour les LAM à composante monocytaire à l'aide de marqueurs spécifiques de lignée (CD14, CD11b, CD36).

Au CHV, un 4<sup>ème</sup> tube (tableau 10) sera ajouté au panel du groupe LAM BIG ALFA, uniquement au diagnostic. Ce tube composé d'anticorps liquides Beckman Coulter intègre les marqueurs intracytoplasmiques (ic) (MPOic, CD3ic, CD79aic) et quelques autres marqueurs de surface.

**Tableau 10 : Tube 4 du panel LAM sur moelle au diagnostic (CHV)**

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	PB	KrO
Tube 4	CD64	MPOic	CD19	-	CD34	CD79aic	CD10	CD3ic	CD2	CD45

Ce panel commun « Diagnostic » a pour but de cibler rapidement l'appartenance des blastes à la lignée myéloïde ou lymphoïde et détecter les rares LA de phénotype mixte.

En suivi de MRD-LAM, les tubes 1 et 2 seront systématiquement réalisés. Le tube 3 sera essentiellement ajouté en cas de LAM à composante monocytaire et/ou LAIP informatif sur ce tube.

#### 2.5.2- Nature des anticorps utilisés

Deux types d'anticorps ont été testés : des anticorps lyophilisés et des anticorps liquides. Les anticorps lyophilisés sont commercialisés sous forme de tubes Duraclones® (Beckman Coulter®) et contiennent pour chacun des tubes la combinaison d'anticorps recommandée par le groupe MRD-LAM (mix d'anticorps lyophilisés).

Les anticorps liquides sont ceux utilisés en routine au CHU de Lille. La majorité des anticorps utilisés sont commercialisés par Beckman Coulter®, quelques anticorps spécifiques sont commercialisés par la société Becton Dickinson® (BD®) : il s'agit du CD45RA-APC-H7, CD90-FITC, CD38-PC7, CD117-BV421, CLL-1-PE, TIM-3-PE, CD97-PE. Ces trois derniers anticorps composent le mix et sont rajoutés extemporanément dans le tube 2 Duraclone®, celui-ci ne contenant aucun anticorps couplé PE (Phycoérythrine).

Les intensités de fluorescence (MFI) obtenues entre les deux sites pour les différents anticorps du panel ont été comparées grâce aux fonctions « *Composite* » et « *Overlay* » de Kaluza®. Un écart de médiane de fluorescence (*X-MedBin*) inférieur à 10% était requis pour conclure à des intensités de fluorescence équivalentes.

Le choix de la population cellulaire testée pour comparer les anticorps et fluorochromes a été défini en fonction de la cible antigénique étudiée et de son expression cellulaire :

- Pour les principaux marqueurs myéloïdes et d'immaturation (CD34, CD13, CD117, CD123) : MFI évaluées sur la population blastique ou cellules mononucléées CD34+
- Pour les marqueurs exprimés par la lignée lymphoïde (CD7, CD4, CD56, CD19, CD45RA) : MFI évaluées sur les lymphocytes
- Pour les marqueurs exprimés par la lignée monocyttaire (CD14, CD64, CD36, CD38, CD33, HLA-DR, Mix, CD11b) : MFI évaluées sur les monocytes
- Pour les marqueurs exprimés par la lignée granuleuse (CD10, CD65) : MFI évaluées sur les granuleux
- Enfin l'expression du CD90 peut être évaluée sur les HSC

## **2.6- Traitement des échantillons**

Après deux lyses successives des hématies, les cellules sont remises en suspension dans du PBS puis incubées avec le panel d'anticorps : 1 à 1,5 millions de cellules par tube sont incubées pendant 15 minutes à l'abri de la lumière et à température ambiante. Après rinçage au PBS et centrifugation 5 min à 430g, le culot cellulaire est repris dans 500µL de PBS.

## **2.7- Acquisition au cytomètre**

Conformément aux recommandations de l'ELN (87), il convient d'acquérir un minimum de 500 000 à 1 000 000 événements CD45+ (leucocytes) pour une interprétation optimale du résultat.

Afin de s'assurer qu'il n'y ait pas de contamination inter-échantillons des circuits du cytomètre un tube de PBS est passé avant chaque passage de tube de MRD.

## **2.8- Stratégie de réanalyse sur Kaluza®**

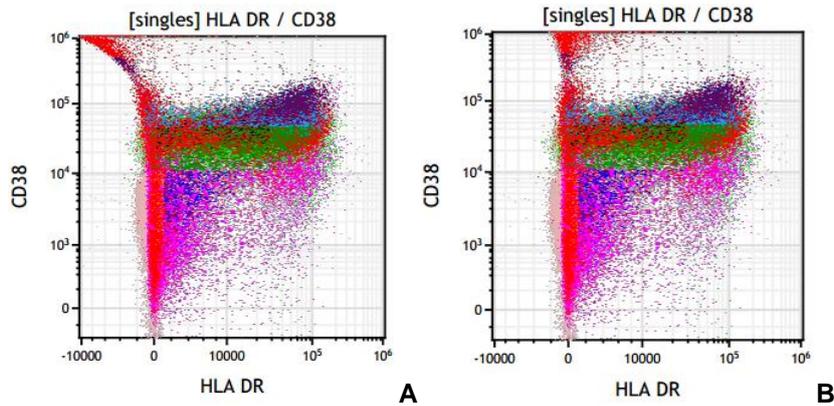
Les données brutes du cytomètre sont récupérées au format « .LMD » et sont retraitées à l'aide du logiciel Kaluza®. Des protocoles de ré-analyse pour chacun des tubes sont proposés par l'intergroupe BIG-ALFA dans un souci de standardisation.

Ils se composent chacun de plusieurs onglets :

- Un onglet « Gating » qui permet d'une part de vérifier la bonne distribution de l'ensemble des anticorps et d'autre part de définir et coloriser les différentes populations cellulaires (blastés, granuleux, monocytes, lymphocytes, hémotogones)
- Un onglet « LAIP » qui permet leur définition et quantification
- Un onglet « LSC » uniquement pour les tubes 1 et 2
- Un onglet « Compensations » contenant tous les plots de compensations
- Enfin, le dernier onglet « Statistiques » regroupe les informations importantes à retenir pour l'interprétation et le rendu de résultat

### **2.8.1- Contrôle des compensations**

Une vérification préalable des réglages de compensation est systématiquement réalisée pour chacun des tubes au niveau de l'onglet « Compensations » qui affiche tous les plots de compensations et permet de détecter et corriger d'éventuelles « fuites » de fluorescence de fluorochrome dans les canaux adjacents (figure 28).



**Figure 28 : Modification de compensation (exemple du tube 1)**

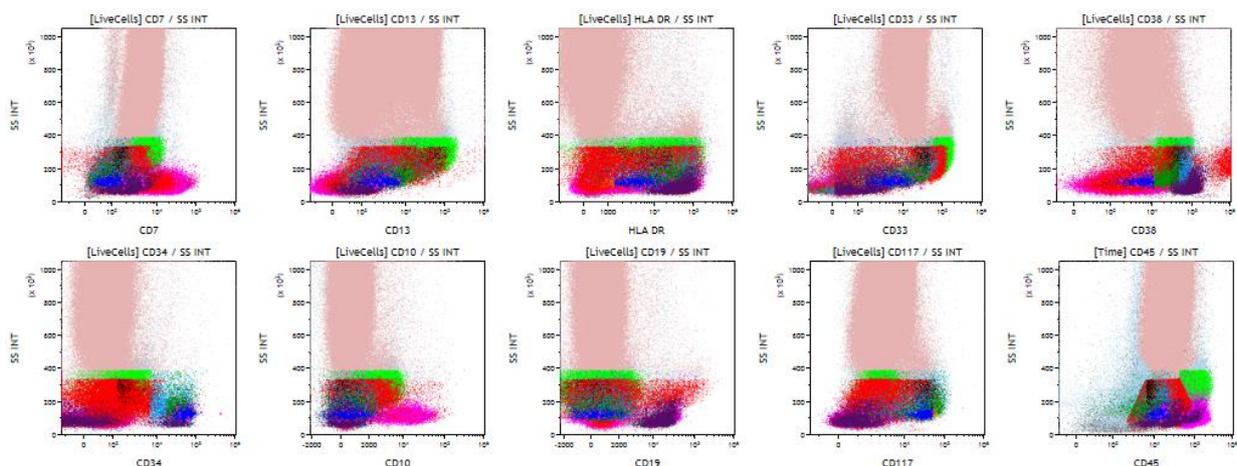
*A: Sur-compensation ; B : Compensation correcte*

### 2.8.2- Fenêtrage initial ou « Gating »

L'onglet « Gating » du protocole permet de contrôler les marquages, d'identifier les populations d'intérêt et de positionner différents seuils.

#### *a. Contrôles des marquages*

Un contrôle de marquage est réalisé en s'appuyant sur les 10 histogrammes bi-paramétriques « FLx/SS ». Pour chaque anticorps, les différentes sous-populations cellulaires servent de témoins internes. Un marquage positif permet de vérifier la bonne distribution de l'anticorps dans le tube (figure 29).

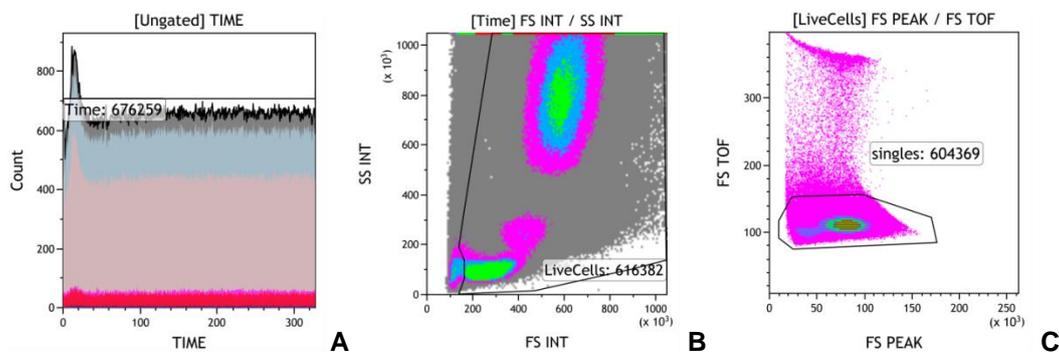


**Figure 29 : Contrôle de marquage FLx/SS (exemple du tube 1)**

*Chaque population d'intérêt est visualisée par un code couleur spécifique (granuleux en beige, monocytes en vert, hémotogones en mauve, lymphocytes en rose, blastes en rouge)*

### b. Nettoyage et vérification de l'acquisition

Le fenêtrage des cellules vivantes est réalisé au niveau de différents histogrammes présentés en figure 30 :



**Figure 30 : « Nettoyage » de l'acquisition**

- La fenêtre **Time** sélectionne l'ensemble des événements acquis et permet d'éliminer les artéfacts d'acquisition comme l'éventuelle aspiration de bulles d'air en cas de tube vidé (30A)
- La fenêtre **LiveCells** conditionnée sur Time élimine les débris comme les cellules mortes (FS faible) en prenant soin de respecter les hémotogones (FS et SS faibles) (30B)
- La fenêtre **Singles** conditionnée sur Livecells permet d'éliminer les doublets (30C)

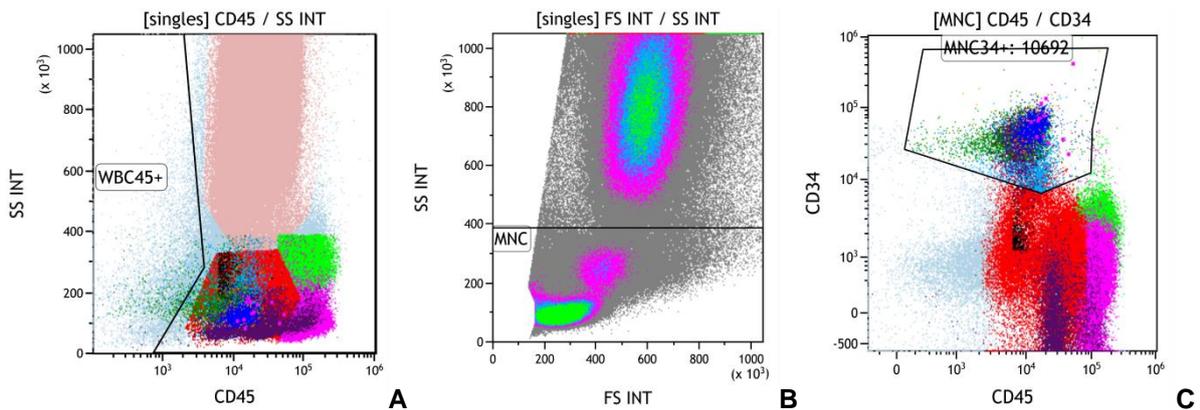
### c. Fenêtrage des différentes populations d'intérêt

#### 1<sup>ère</sup> étape : Identification des « grandes » populations

Sur l'histogramme FS INT/SS INT, la fenêtre **Singles** va permettre de sélectionner différentes populations d'intérêt (figures 31 et 32) :

- La fenêtre **WBC 45+** (31A) : cible les leucocytes après élimination des débris et des globules rouges et constitue la fenêtre de travail des blastes CD45 faible/SS faible **Blasts** et des granuleux SS variable en raison de leur structure complexe **Granulo** (32A)

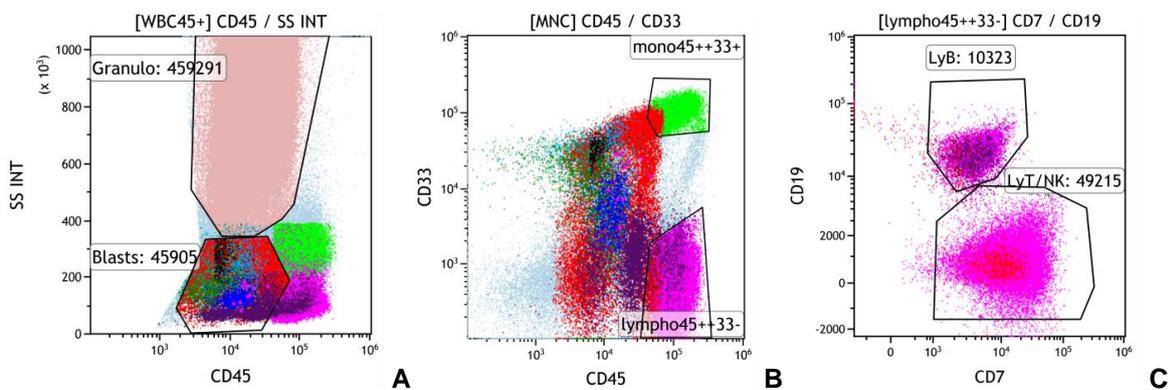
- La fenêtre **MNC** (31B) : cible les cellules mononuclées et constitue la fenêtre de travail des blastes CD34+ fort et modéré **MNC34+** (31C)



**Figure 31** : Identification des WBC45+ (A), des MNC (B) et des MNC34+ (C)

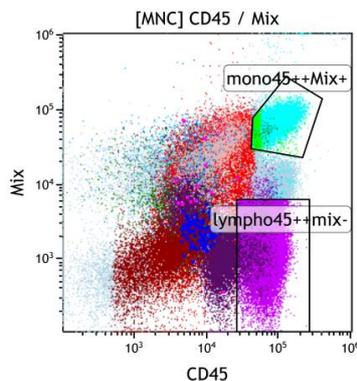
Pour les tubes 1 et 3, l'histogramme CD45/CD33 permet d'identifier les lymphocytes **lympho45++33-** et les monocytes **mono45++33+** (32B)

Pour le tube 1, l'identification des lymphocytes B (CD19+) et T (CD7+) est réalisée à partir de l'histogramme bi-paramétrique CD7/CD19 conditionné sur les lympho45++33- (32C).



**Figure 32** : Identification des granuleux en beige, blastes en rouge, monocytes en vert, et lymphocytes B et T en rose

Pour le tube 2, l'histogramme CD45/Mix permet d'identifier les lymphocytes **lympho45+Mix-** et les monocytes **mono45+Mix+** (figure 33).



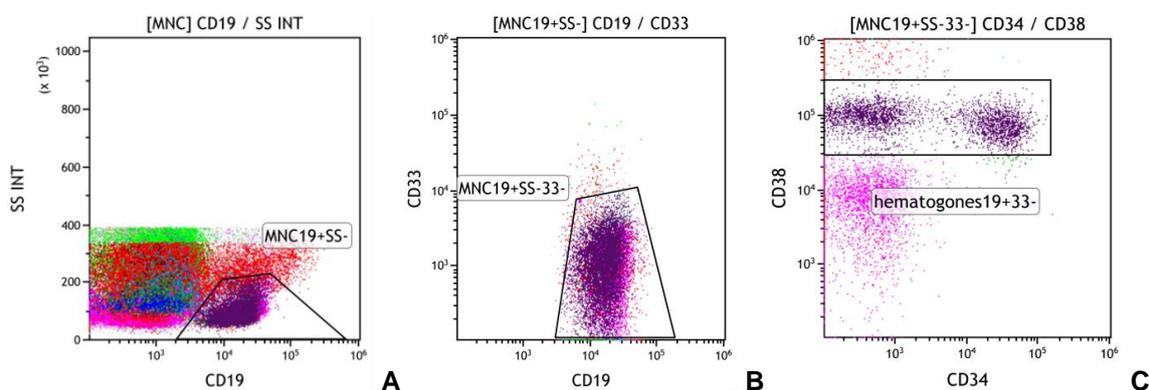
**Figure 33 : Identification des monocytes en turquoise et des lymphocytes en rose sur le tube 2**

2<sup>ème</sup> étape : Identification des hématogones (tubes 1 et 2)

L'identification des hématogones, précurseurs des cellules lymphoïdes, permet de fixer différents seuils nécessaires à l'analyse des LSC. Ils permettent en outre d'apprécier la régénération médullaire.

Pour le tube 1, l'identification des hématogones (figure 34) est réalisée suivant différentes étapes :

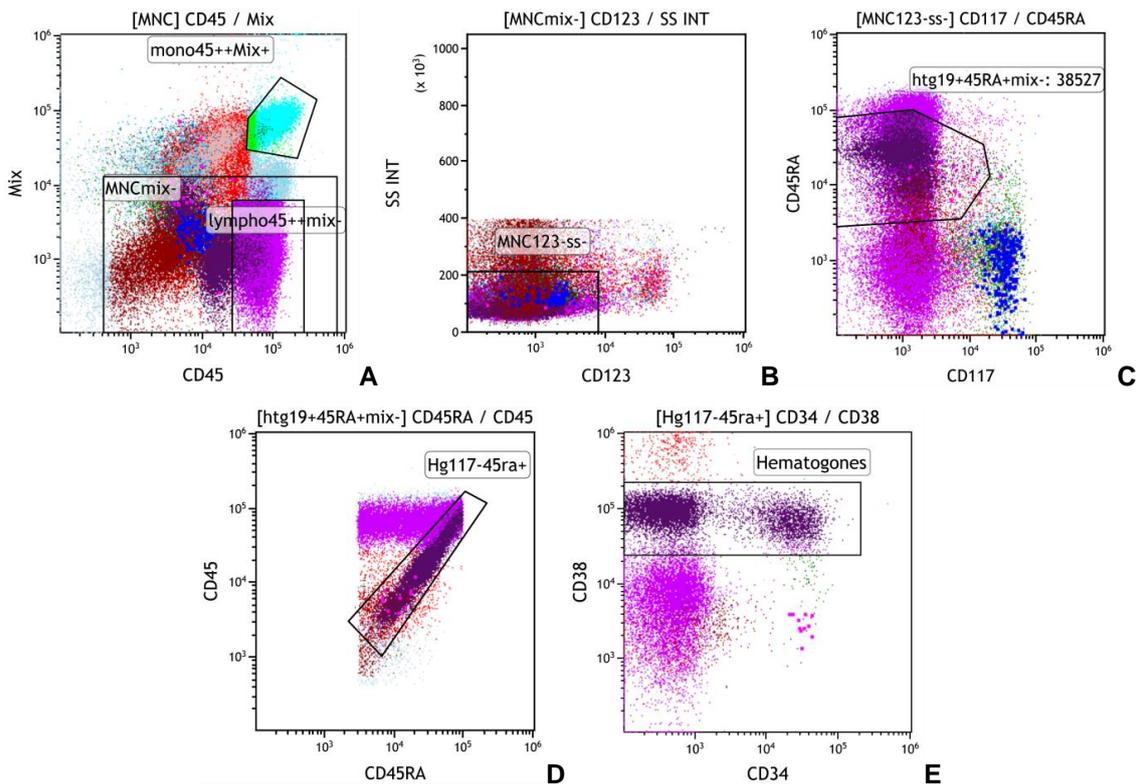
- Sélection des évènements CD19+/SS faible **CD19+SS-** parmi les MNC (34A)
- Sélection parmi les CD19+SS- des cellules CD33 négatives **CD19+SS-33-** (34B)
- Sélection et coloration des hématogones CD38+, CD34+ ou CD34- selon leur stade de différenciation (34C)



**Figure 34 : Identification des hématogones en mauve dans le tube 1**

Pour le tube 2 (figure 35) :

- L'histogramme CD45/Mix permet une pré-sélection des hématogones parmi les MNC **MNCmix-** (35A)
- Les cellules sont ensuite reportées sur un histogramme CD123/SS pour ne sélectionner que les événements CD123 négatifs **MNC123-SS-** (35B)
- L'histogramme CD117/CD45RA permet à partir de la précédente sélection de fenêtrer les cellules CD117 négatives CD45RA positives **htg19+45RA+mix-** (35C)
- L'histogramme CD45RA/CD45 permet la séparation des lymphocytes et des hématogones (35D)
- Enfin l'étape finale consiste à sélectionner et colorer les hématogones à l'aide de l'histogramme CD34/CD38 de la même manière que pour le tube 1 (35E)



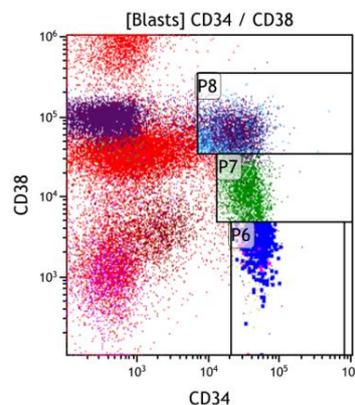
**Figure 35** : Identification « indirecte » des hématogones en mauve dans le tube 2

### 3<sup>ème</sup> étape : Mise en place des seuils P6/P7/P8 (tubes 1 et 2) pour l'approche LSC

Parmi les MNC34+ coexistent trois sous-populations en fonction du niveau d'intensité d'expression du CD38. Il en résulte une crosse de différenciation allant des cellules les plus immatures (CD38-) aux cellules les plus matures (CD38+).

Ces sous-populations correspondent aux compartiments P6, P7 et P8 (figure 36) :

- La fenêtre **P6** contient les cellules les plus immatures CD34+ CD38- : c'est cette fenêtre qui permettra d'évaluer le taux de LSC qu'il faudra distinguer des HSC
- La fenêtre **P7** regroupe les cellules intermédiaires CD34+ CD38±
- Le compartiment **P8** contient les cellules les plus matures CD34+ CD38+



**Figure 36 : Compartiments P6/P7/P8 pour l'étude des cellules souches leucémiques (LSC)**

Le seuil de négativité du CD38 (seuil P6/P7) a été défini selon l'approche FMO (*Fluorescence Minus One*) qui consiste à marquer les cellules d'une moelle osseuse normale avec l'ensemble des anticorps du panel à l'exception du CD38.

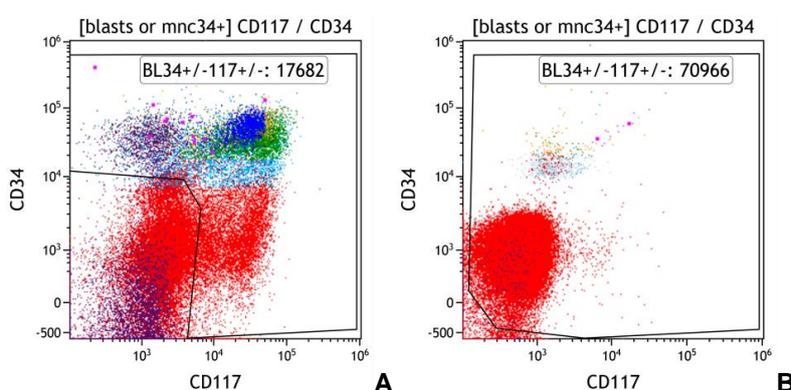
En parallèle, le seuil P7/P8 différenciant les cellules CD38 modéré des CD38 fort a été déterminé en marquant le même prélèvement de moelle avec tous les anticorps du panel y compris le CD38. Le seuil P7/P8 est fixé selon l'intensité de signal émise par les hématogones (cellules CD38 fort marquées en mauve).

Ainsi fixés, ces seuils ne doivent plus être modifiés dans le protocole de réanalyse utilisé.

### 2.8.3- Stratégie LAIP/DfN au diagnostic

L'onglet « LAIP », présent et construit de la même façon dans les tubes 1 à 3, permet de définir et de quantifier le ou les LAIP présents au diagnostic ou en suivi.

Un histogramme bi-paramétrique CD117/CD34 ciblé sur la population « **blasts ou MNC34+** » permet de sélectionner les blastes myéloïdes sur lesquels seront appliquées les différentes fenêtres LAIP du protocole (figure 37). A noter qu'en cas d'absence d'expression du CD34 et/ou du CD117, il conviendra de réajuster la fenêtre **BL34± 117±** afin d'intégrer la population blastique d'intérêt (37B).



**Figure 37 : Fenêtre CD117± CD34±**

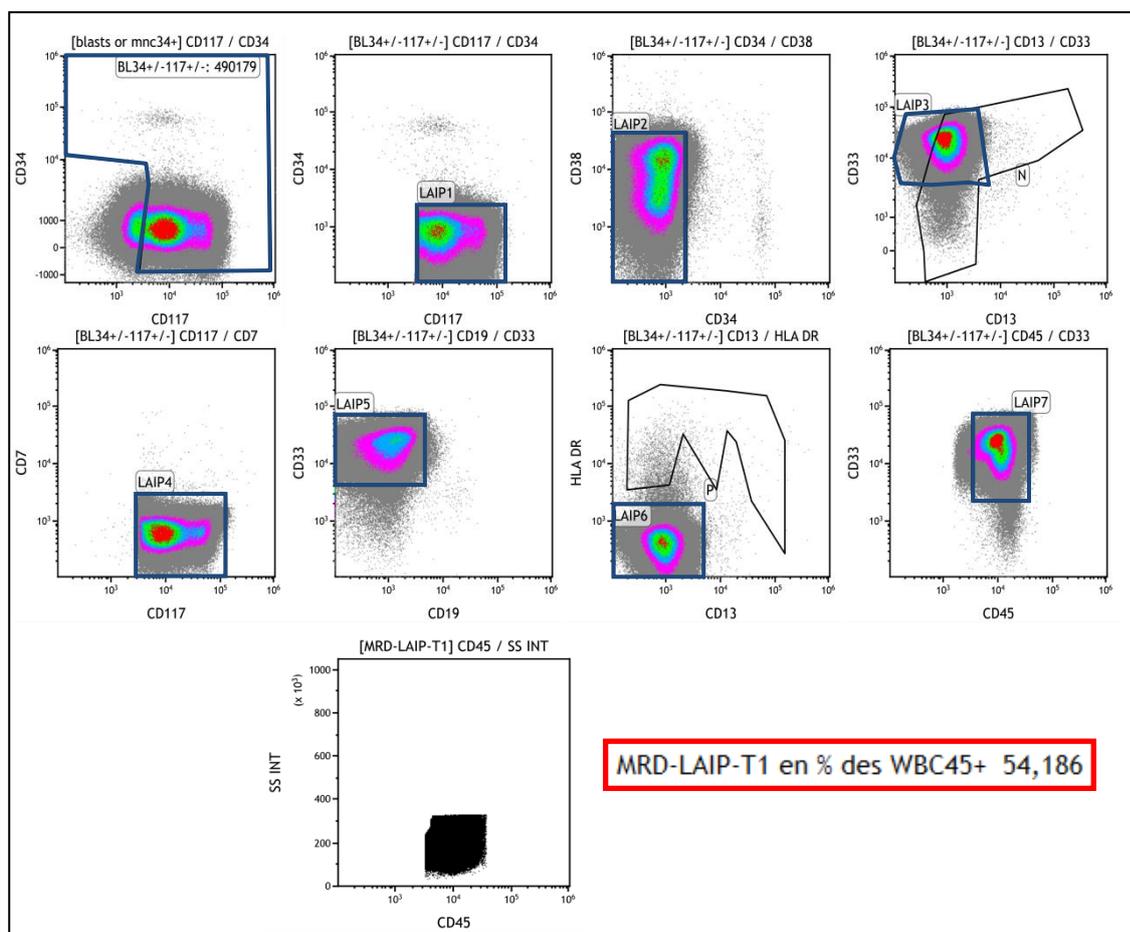
*A : moelle normale ; B : moelle de patient avec des blastes CD117-/CD34- au diagnostic*

Une succession d'histogrammes bi-paramétrique conditionnés sur la population blastique **BL34±117±** permet de définir le profil phénotypique de la population d'intérêt et identifier un phénotype aberrant par comparaison aux profils phénotypiques des blastes et cellules immatures physiologiques obtenues sur des moelles témoins. Sur chaque histogramme bi-paramétrique, une fenêtre **LAIP** permet de cibler la population d'intérêt.

Une fenêtre booléenne **MRD-LAIP** combinant les événements contenus dans chacune des fenêtres LAIP permet de visualiser et de quantifier le phénotype étudié :

**MRD-LAIP-T1 = ((((((((((Time and Livecells) and singles) and MNC) and BL34+/-117+/-) and LAIP 1) and LAIP2 ) and LAIP3) and LAIP4) and LAIP5) and LAIP6) and LAIP7**

Les blastes présentant le LAIP sont colorisés en noir, ce qui permet de visualiser par rétrocontrôle le phénotype étudié sur les différents histogrammes bi-paramétriques et vérifier la clusterisation de la population (figure 38).



**Figure 38 : Exemple de masque LAIP**

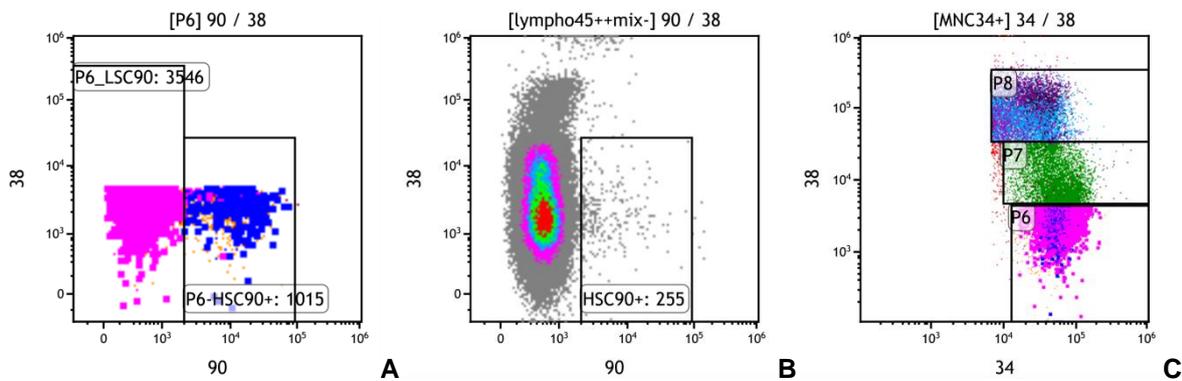
*Profil phénotypique étudié : CD34- CD117+ CD38+ CD33+ CD13- HLA-DR- CD7-*

Le choix du LAIP est réalisé en repérant pour chaque patient les éventuelles aberrations phénotypiques présentes sur les blastes leucémiques. Sur les histogrammes CD13/CD33 et CD13/HLA-DR présentés en figure 38, les fenêtres N et P (en noir) permettent de localiser les crosses de maturation normale des blastes physiologiques afin de faciliter l'identification de profils phénotypiques aberrants.

## 2.8.1- Stratégie LSC

La recherche et quantification des LSC est réalisée dans les tubes 1 et 2 à partir du compartiment P6 (cellules CD34+ CD38-) préalablement défini dans l'onglet « Gating ».

Si l'étude des LSC est possible sur ces deux tubes, le second permet une analyse plus précise de cette population car il contient des marqueurs plus spécifiques permettant de différencier les LSC des HSC physiologiques. Pour chaque marqueur d'intérêt, une population présentant un marquage positif ou négatif pour le fluorochrome d'intérêt (FLi) sert de contrôle interne afin de placer le seuil de significativité (figure 39).



**Figure 39 : Contrôle interne – seuil de significativité LSC**

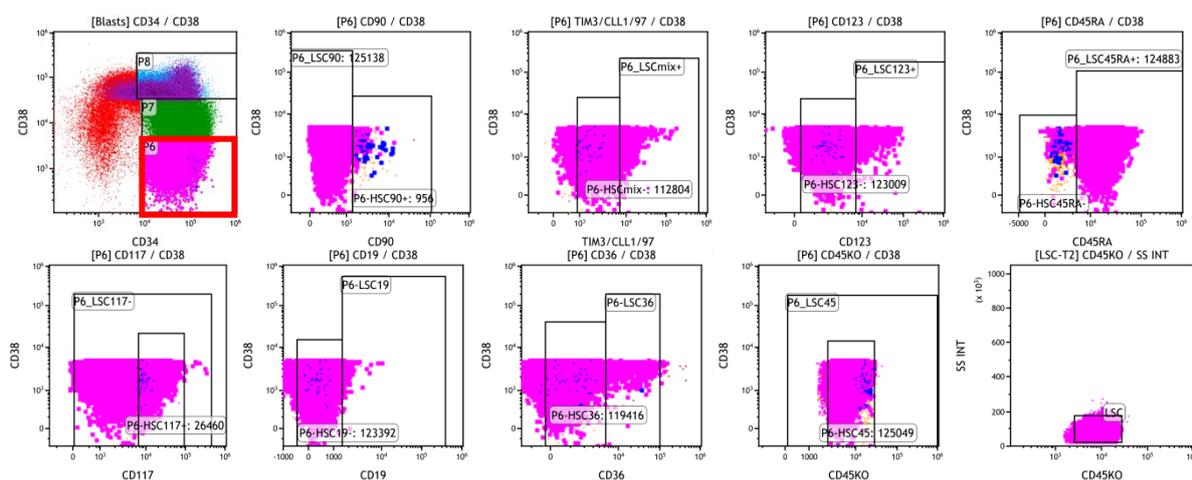
Les fenêtres HSC sont liées (A et B), sur cet exemple la limite de positivité est définie à l'aide des lymphocytes, contrôle interne négatif pour le marqueur CD90 (B). La dernière fenêtre (C) permet de visualiser les LSC sur l'histogramme CD34 CD38

Deux fenêtres booléennes d'identification **LSC-T1** pour le tube 1 et **LSC-T2** pour le tube 2 des LSC permettent de les séparer des HSC :

**LSC-T1 = (((((((time and livecells) and blasts) and singles) and mnc) and mnc34+) and P6) and P6-LSC117) and P6-LSC13) and (((P6-LSC7 or P6-LSC33) or P6-LSC19) or P6-LSC56)**

**LSC-T2 = ((((((Time and singles) and LiveCells) and mnc) and blasts) and mnc34+) and P6) and ((P6\_LSCmix+ or P6\_LSC123+) or P6\_LSC45RA+)**

Avec cette construction de booléenne, la positivité d'un seul marqueur aberrant est suffisante pour classer la population en LSC (expression aberrante de CD7, CD33, CD19 ou CD56 pour le tube 1, expression aberrante du Mix, CD123 ou CD45RA pour le tube 2). En l'absence de marqueur informatif sur un ou plusieurs histogrammes FLx/CD38, tous les éléments du ou des histogrammes concernés doivent être sélectionnés (fenêtre « large ») (figure 40).



**Figure 40 : Exemple de moelle avec phénotype LSC au diagnostic**

Les cellules sont sélectionnées à l'aide du compartiment P6 (CD34+ CD38-) (carré rouge). En rose, la population présentant le phénotype LSC. En bleu, les HSC résiduelles. Sur cet exemple, les LSC sont CD90- CD45RA+ CD117dim

### 2.8.1- Données statistiques

Les résultats sont présentés dans l'onglet « Statistiques » et intègrent les données suivantes communes aux deux approches (LAIP/DfN et LSC) :

- Le nom du cytomètre utilisé
- Le nom du fichier (identité du patient)
- La date d'acquisition
- La pureté médullaire CD34+ exprimée en pourcentage
- Le nombre de leucocytes acquis **[WBC45+]** et le nombre de blastes 34+ **[MNC34+]**
- Le nombre d'hématogones **[hematogones19+33-]** ou **[hematogones]**
- La limite de détection (LOD) en pourcentage pour 50 évènements rendus

Pour l'approche LAIP-DfN, sont précisés également :

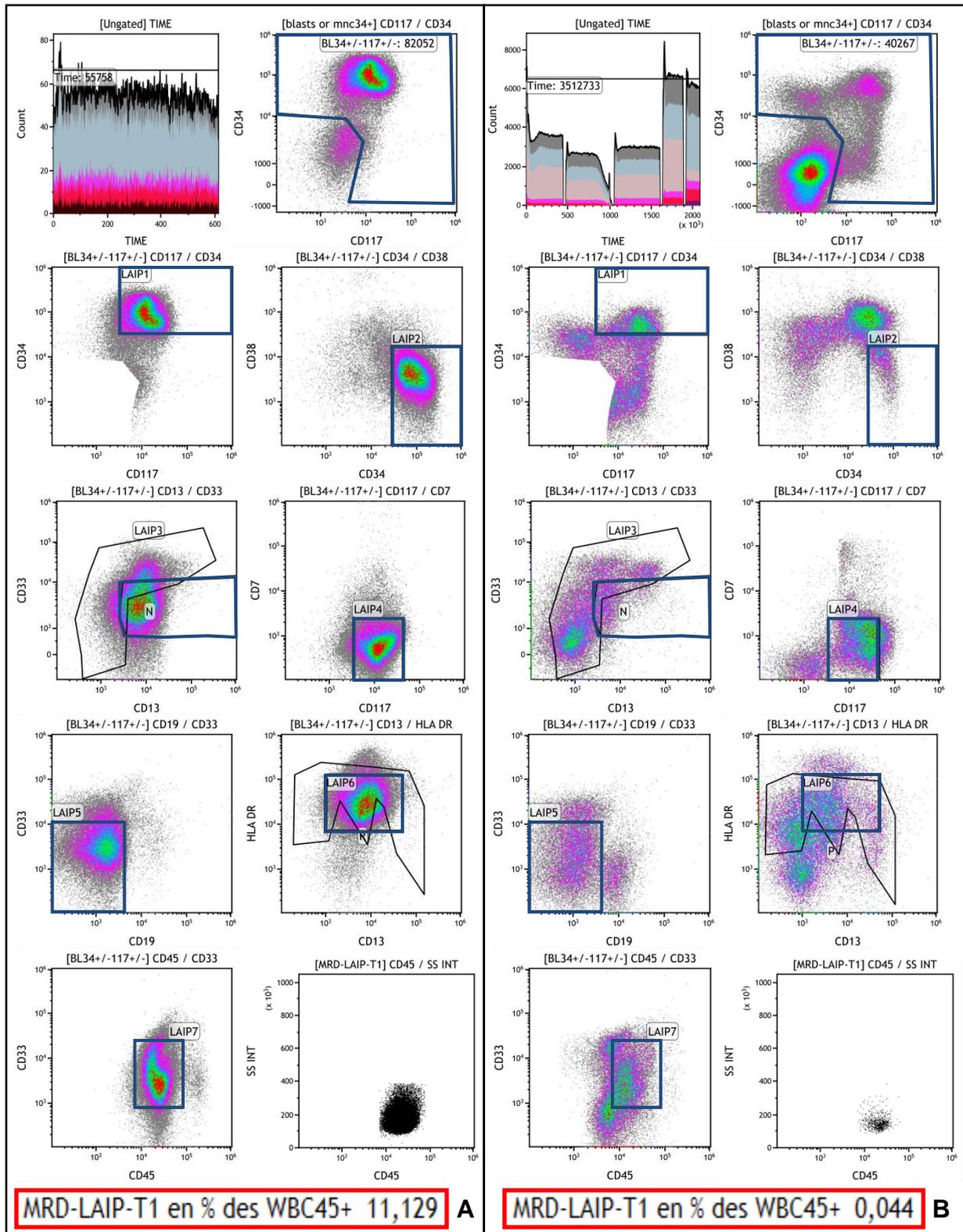
- Le nombre de cellules présentant un LAIP [**MRD-LAIP**]
- Le pourcentage de cellules présentant un LAIP par rapport aux leucocytes totaux [**MRD-LAIP-Tn en % des WBC45+**].

Pour l'approche LSC, sont précisées les données relatives aux LSC et HSC:

- Le nombre de cellules souches hématopoïétiques (HSC) [**HSC-Tn**]
- Le nombre de cellules souches leucémiques (LSC) [**LSC-Tn**]
- Le pourcentage de LSC par rapport aux leucocytes totaux, pour le suivi [**LSC-Tn MRD en % [WBC45+]**] et par rapport aux blastes totaux, pour le diagnostic [**LSC-Tn au diag en % [Blasts]**].

### **3- Constitution d'un « *merge* » de moelles normales**

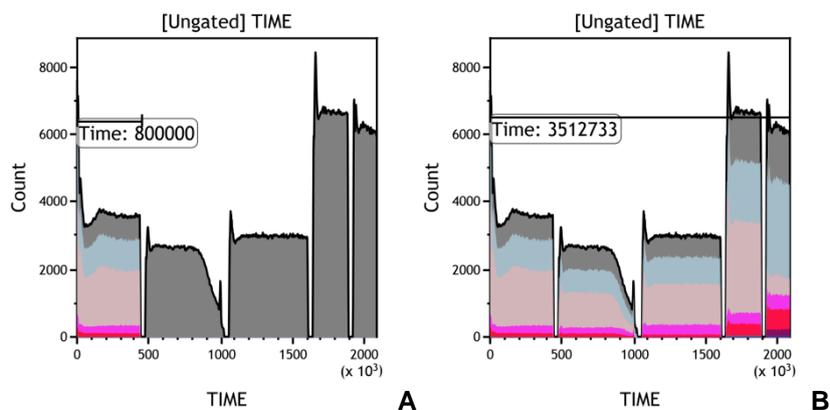
Les moelles de référence ont été analysées avec le même panel d'anticorps et selon le même protocole que celui utilisé sur les moelles de patients LAM. Pour chaque LAIP étudié, les réglages du protocole d'analyse « masque » LAIP ayant permis d'obtenir un phénotype aberrant sont appliqués aux moelles témoins afin de déterminer l'expression physiologique du LAIP étudié et donc sa spécificité. Un exemple est présenté sur la figure 41.



**Figure 41 : Expression physiologique du LAIP étudié**

*A : pourcentage du LAIP chez le patient au diagnostic ; B : pourcentage du LAIP appliqué à une moelle témoin*

La création d'un « *merge* » sur Kaluza® permet de fusionner les différents échantillons en un seul fichier. Il est ainsi possible de rechercher l'expression du LAIP sur l'ensemble des moelles témoins. Il reste cependant recommandé d'analyser chaque moelle de référence indépendamment grâce à un fenêtrage **Time** (figure 42).



**Figure 42** : Fenêtrage « *Time* » : sélection d'une (A) ou plusieurs (B) moelles de référence

Pour notre étude, nous avons répertorié pour tous les patients la proportion de cellules exprimant le phénotype des blastes au diagnostic (LAIP) dans le pool de moelles de référence.

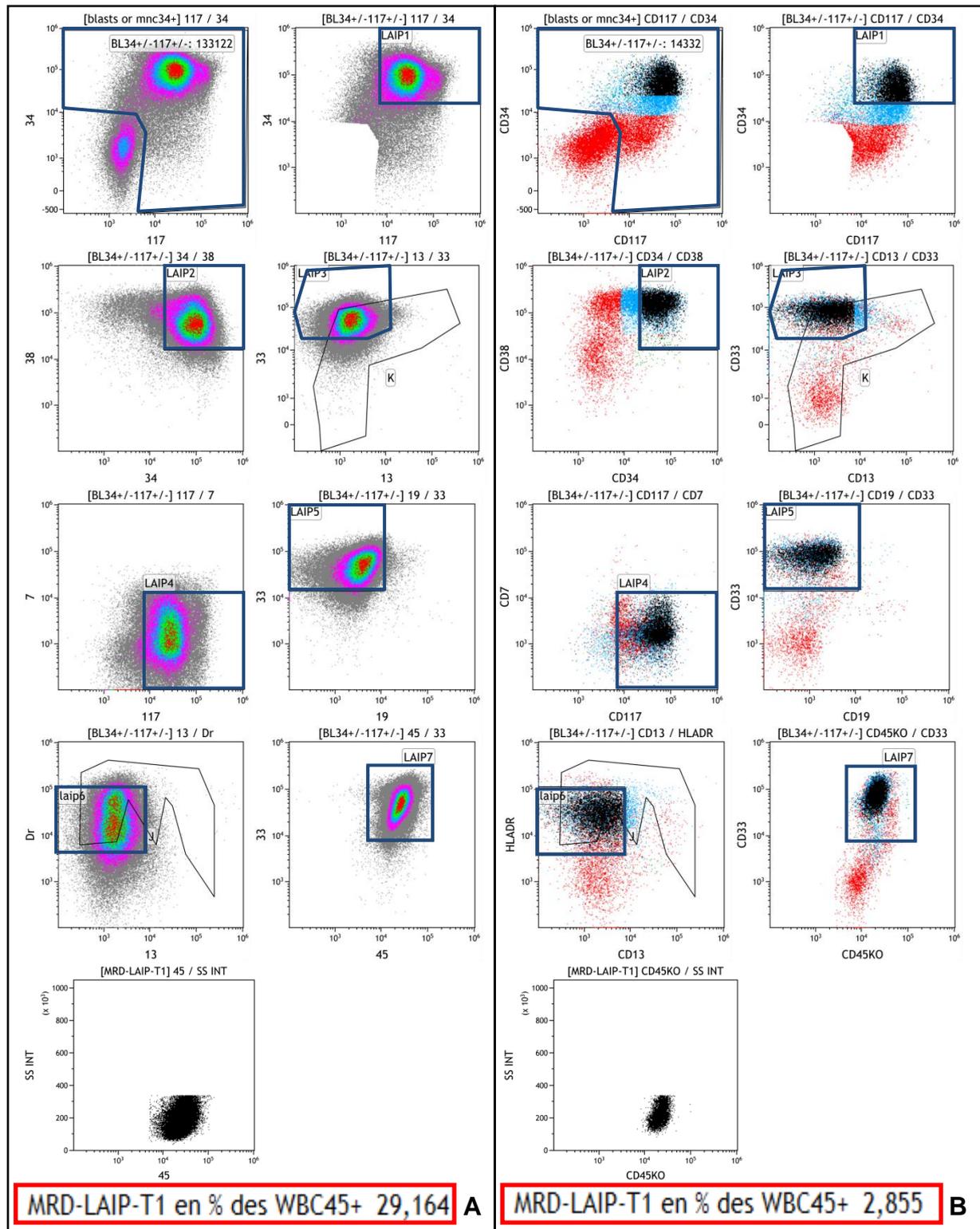
## 4- Évaluation de la MRD LAM LAIP/DfN-LSC

### 4.1- MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN

#### 4.1.1- Identification et quantification de la MRD

Dans l'onglet LAIP, le « masque LAIP » obtenu au diagnostic est appliqué sur la moelle de suivi dans le cadre de l'évaluation de la MRD. Compte tenu de l'hétérogénéité phénotypique des blastes de LAM et du risque d'émergence de sous-clone en cours de traitement, un suivi sur deux LAIP distincts est recommandé. Dans certains cas, aucun phénotype aberrant n'est cependant identifié, la stratégie LAIP/DfN n'est donc pas applicable.

Un exemple de MRD positive est présenté en figure 43.



**Figure 43 : Recherche du LAIP étudié dans la moelle de suivi**

A : tube 1 au diagnostic. Profil phénotypique étudié : CD34+ CD117+ CD38+ CD33+ CD13- HLA-Dr+  
 B : tube 1 en suivi. En noir la population leucémique correspondant au LAIP étudié

En cas de sous-clone aberrant ou glissement phénotypique, détecté en suivi via l'approche DfN, un re-fenêtrage est réalisé et le nouveau masque est appliqué aux moelles témoins afin d'être validé. Le nouveau fenêtrage est alors appliqué aux prélèvements précédents afin de suivre la cinétique d'évolution du sous clone à chaque point de suivi.

#### 4.1.2- Sensibilité et limite de détection de la technique

La sensibilité de la technique découle de la spécificité des masques LAIP testés. Le seuil de significativité est égal à la « moyenne des taux de LAIP exprimés sur un pool de moelles témoins » + « deux écarts-type ». Ce seuil de positivité devra toujours être inférieur au taux de LAIP le plus élevé mesuré sur « chacune » des moelles témoins étudiées individuellement. Un LAIP est considéré comme spécifique si cette valeur n'excède pas 0,1% des leucocytes soit  $1 \times 10^{-3}$ , seuil de sensibilité de la technique jugé pertinent pour un intérêt pronostique (87).

La sensibilité de la technique dépend également du nombre d'évènements WBC45+ acquis. S'agissant d'évènements rares, les recommandations ELN préconisent l'acquisition de minimum 500 000 à 1 000 000 de leucocytes par tube. Considérant qu'une population cellulaire phéno-identique peut être mise en évidence pour un nombre minimal de 50 évènements, la LOD de l'échantillon est inversement proportionnelle au nombre d'évènements WBC45+ acquis :

$$LOD = \frac{50 \text{ (nombre significatif d'évènements)}}{\text{Cellules vivantes WBC45 +}}$$

La LOD est considérée comme optimale si elle est inférieure ou égale à  $10^{-4}$ .

Le seuil significativité ou limite de positivité de l'analyse correspond à la valeur la moins sensible entre le seuil technique (LOD échantillon) et la valeur « physiologique » observée pour le profil LAIP étudié sur des moelles de référence.

Nous avons souhaité par ailleurs évaluer la sensibilité de notre technique en réalisant une série de dilutions de cellules leucémiques dans un échantillon de moelle témoin.

Les cellules leucémiques isolées sur gradient de Ficoll avaient été préalablement sélectionnées à partir d'une moelle de LAM au diagnostic. Dix points de dilution ont été réalisés (tableau 11).

Profil du LAIP étudié : **CD34+ CD38- CD117+ HLA-DRdim CD33dim**

Le prélèvement de moelle témoin a été traité selon le protocole technique de MRD-LAM précédemment décrit. Les différentes dilutions ont été réalisées après les deux étapes de lyse macrovolume et avant marquage selon le même protocole.

**Tableau 11** : Protocole de dilutions pour le calcul de la sensibilité - Exemple du tube 1

<b>Tube Orientation</b> (Tube 1)	<b>Moelle témoin</b> (cellules par tube)	<b>Ficoll (blastés)</b> (cellules par tube)	<b>Sensibilité attendue</b>
<b>T0</b> Tube 0 (témoin pur)	2 000 000	0	
<b>T1</b> Tube 1 (Ficoll pur)	0	1 000 000	<b>1</b>
<b>T2</b> Tube 2	2 000 000	100 000	$0,5 \times 10^{-1}$
<b>T3</b> Tube 3	2 000 000	20 000	<b><math>10^{-2}</math></b>
<b>T4</b> Tube 4	2 000 000	10 000	$0,5 \times 10^{-2}$
<b>T5</b> Tube 5	2 000 000	5 000	$0,25 \times 10^{-2}$
<b>T6</b> Tube 6	2 000 000	2 000	<b><math>10^{-3}</math></b>
<b>T7</b> Tube 7	2 000 000	1 000	$0,5 \times 10^{-3}$
<b>T8</b> Tube 8	2 000 000	500	$0,25 \times 10^{-3}$
<b>T9</b> Tube 9	2 000 000	200	<b><math>10^{-4}</math></b>
<b>T10</b> Tube 10	2 000 000	50	$0,25 \times 10^{-4}$

#### 4.1.3- Expression des résultats

Conformément aux recommandations du groupe ALFA, le compte-rendu d'analyse doit préciser :

- Le profil LAIP utilisé pour l'analyse de la MRD
- Le nombre d'évènements WBC45+ acquis
- Le seuil de sensibilité de l'analyse
- Le résultat de la MRD :
  - En cas de résultat positif ( $> 10^{-3}$ ) : préciser la valeur chiffrée estimée en pourcentage des leucocytes totaux WBC45+

- En cas de résultat négatif ( $<10^{-3}$ ) :
  - o Détectable : préciser la valeur chiffrée et le seuil de sensibilité
  - o Non détectable : rendre « inférieur au seuil de sensibilité de l'analyse »
- En cas de non détection, un commentaire doit être apporté si nécessaire sur l'origine de la non-détection (part d'hémodilution, LAIP peu robuste, seuil de sensibilité de la technique  $>10^{-3}$ )

## 4.2- Approche LSC

### 4.2.1- Identification et quantification des LSC

Comme pour le diagnostic, l'identification et la quantification des LSC sont réalisées à partir du compartiment P6 des cellules CD34+/CD38- (Onglet « *Gating* », booléennes [LSC-T1] et [LSC-T2]).

De la même façon que pour l'approche LAIP et si un suivi de MRD-LSC est possible, l'analyse consiste à rechercher sur le prélèvement médullaire de suivi, la même population que celle détectée et quantifiée au diagnostic. Cependant, à la différence de l'approche LAIP, les LSC possèdent une base phénotypique connue. Ainsi même si le prélèvement diagnostique est recommandé, il n'est pas indispensable pour la recherche de LSC en suivi.

La quantification en MRD de cette population est effectuée par rapport au nombre de leucocytes totaux WBC45+.

### 4.2.1- Sensibilité et limite de détection de la technique

Le seuil de positivité de l'analyse MRD selon l'approche LSC a été estimé à  $10^{-4}$  par le groupe LAM BIG-ALFA, sous réserve que la LOD calculée pour chaque acquisition n'excède pas cette valeur et considérant que la quantité de cellules exprimant un phénotype de LSC dans une moelle témoin est bien inférieure à ce seuil de  $10^{-4}$ .

Pour l'approche LSC le seuil de significativité est défini comme la plus grande valeur entre la LOD technique et le seuil de  $10^{-4}$ . Comme pour l'approche LAIP, nous avons

souhaité évaluer la sensibilité de notre technique en réalisant une série de dilutions de cellules souches leucémiques (LSC) dans un échantillon de moelle témoin.

#### Profil phénotypique des LSC : CD90- CD45RA+ CD117dim

Dix points de dilutions ont été réalisés à partir d'une concentration connue (au pur) de cellules leucémiques, selon le même protocole que celui décrit pour l'approche LAIP/DfN.

#### 4.2.2- Expression des résultats

Conformément aux recommandations du groupe ALFA, le compte-rendu d'analyse doit préciser :

##### Au diagnostic :

- Le profil utilisé pour identifier les LSC
- La quantification des LSC exprimée en valeur chiffrée sur les blastes totaux (%)

##### En suivi :

- Le profil utilisé pour identifier les LSC
- Le seuil de sensibilité de l'analyse
- Le résultat de la MRD-LSC :
  - En cas de résultat positif ( $> 10^{-4}$ ) : préciser la valeur chiffrée estimée en pourcentage des leucocytes totaux WBC45+
  - En cas de résultat négatif ( $<10^{-4}$ ) :
    - o Détectable : préciser la valeur chiffrée et le seuil de sensibilité
    - o Non détectable : rendre « inférieur au seuil de sensibilité de l'analyse »
  - En cas de non détection, un commentaire doit être apporté si nécessaire sur l'origine de la non-détection

*Recommandations ALFA : essai BIG-1 : Protocole technique Cytométrie MRD LSC LAM- Annexe 2  
V1 10-02-2018 A Plesa/C Roumier*

### 4.3- Approche en BM

#### 4.3.1- Marqueurs et techniques

La maladie résiduelle en BM est réalisée au CHU de Lille. Elle permet de suivre par RT-qPCR plusieurs types d'anomalies lorsqu'elles sont présentes au diagnostic :

- Transcrits de fusion : *CBFB-MYH11* (type A, B ou E), *RUNX1-RUNX1T1* (*AML1-ETO*) et *MLLT3-KMT2A* (*AF9-MLL*) (type A, B ou D)
- Mutations *NPM1* (type A, B ou D)
- Surexpression *WT1* : marqueur pouvant être utilisé en suivi en cas de surexpression au diagnostic supérieure à 10% sur prélèvement sanguin ou médullaire

#### 4.3.2- Seuils de positivité et sensibilité en MRD

Les transcrits de fusion ainsi que les mutations de *NPM1* ne sont pas retrouvés physiologiquement, la MRD est donc considérée comme positive lorsque celle-ci est détectée et est supérieure au seuil de sensibilité de la technique soit 0,001% ( $10^{-5}$ ) et 0,01% ( $10^{-4}$ ) respectivement.

En ce qui concerne la surexpression de *WT1*, les seuils de positivité sont supérieurs sur moelle (seuil de 2%) que sur sang (seuil de 0,1%) en raison de l'existence d'une expression physiologique médullaire de *WT1*.

### 4.4- Analyse des données

Les résultats de MRD-LAM traités en parallèle au CHV et au CHU de Lille ont été analysés puis comparés. Les critères d'évaluation pour juger de la concordance des résultats sont : le nombre de leucocytes CD45+ (dénominateur pour la quantification de la MRD), le résultat de MRD en % et l'interprétation finale (positif ou négatif).

La comparaison des résultats de MRD obtenus en CMF et en BM a été évaluée par un test de concordance et le calcul du coefficient kappa. La taille de la cohorte étant

insuffisante pour une analyse « statistique » précise, une simple analyse « descriptive » des discordances entre les deux techniques a été réalisée.

Ont été intégrés les patients ayant bénéficié de l'évaluation de la MRD en CMF selon l'approche LAIP/DfN et testés en parallèle en BM (sang ou MO). Ont également été inclus les patients ayant bénéficié de l'évaluation de la MRD-LAM en CMF selon l'approche LSC (au moins 1% de CSL parmi les blastes totaux, au diagnostic ou à la rechute) et pour lesquels nous disposons d'au moins 4 points de suivi.

## **5- Analyses des données de MRD-LAM sur FlowSom**

Dans ce travail, nous avons souhaité évaluer la possibilité d'utiliser des algorithmes d'analyses non supervisées (FlowSOM) en complément des techniques de cytométrie conventionnelle pour l'évaluation de la MRD-LAM. Pour cela, nous avons utilisé le script développé par F. Dumezy dans le cadre de l'intergroupe ALFA. Le logiciel d'analyse statistique et graphique « R » constitue l'interface permettant d'utiliser l'outil FlowSOM.

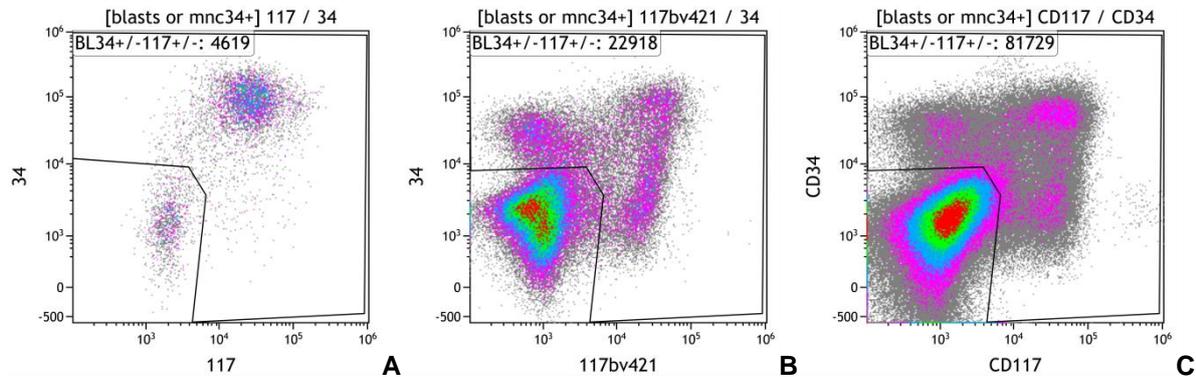
### **5.1- Script « R »**

Les données brutes du cytomètre Navios® sont récupérées au format « .LMD » puis exportées sous forme de fichier « .csv ». Au préalable, « un traitement préanalytique » des données (élimination des artéfacts, vérification des compensations, « *gating* » des populations d'intérêt) est réalisé afin de s'affranchir d'artéfacts d'acquisition.

L'évaluation de la MRD-LAM en analyse non supervisée consiste comme pour l'analyse conventionnelle, à étudier pour chaque patient les blastes au diagnostic, les blastes au suivi et les blastes physiologiques d'un « *merge* » de moelles de référence.

Trois fichiers « .csv » sont donc générés (figure 44) à partir des fichiers « .LMD » suivants (figure 44) :

- Blastos au diagnostic sélectionnés sur l'histogramme  $117 \pm 34 \pm$  (44A)
- Blastos au suivi sélectionnés sur l'histogramme  $117 \pm 34 \pm$  (44B)
- Blastos issus d'un « *merge* » de moelles témoins sélectionnés sur le même histogramme  $117 \pm 34 \pm$  (44C)



**Figure 44 : Sélection des populations cellulaires d'intérêt**

*A : Blastos au diagnostic ; B : Blastos au suivi ; C : Blastos « merge » de moelles témoins*

*Pour les blastos au diagnostic, l'exportation de 4 000 à 5 000 évènements est suffisante, en revanche pour les blastos au suivi, il est important d'exporter l'intégralité des évènements acquis dans la fenêtre  $BL34 \pm 117 \pm$  car nous recherchons des évènements rares.*

Le script « R » appliqué à ces trois fichiers réalise les actions suivantes :

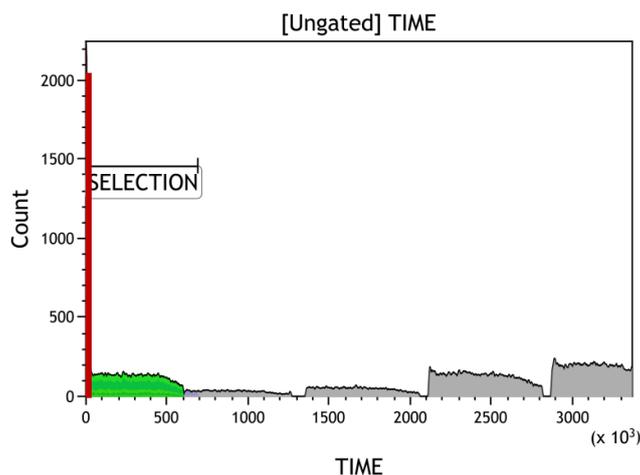
- Intégration des paramètres des trois fichiers « .csv »
- Construction des clusters et des métaclusters, leur nombre est défini au niveau du script. Pour ce travail nous avons travaillé avec 100 clusters et 30 métaclusters
- Exécution de la fonction FlowSOM
- Création d'un fichier « .fcs » avec des paramètres supplémentaires : FlowSom, size, x et y de la grille SOM, xNodes et yNodes de la *map*. Ce fichier « .fcs » regroupe les données des trois fichiers « .csv » et peut être analysé dans Kaluza® autorisant une combinaison des fenêtrages entre les nouveaux et anciens paramètres

## 5.2- Stratégie de réanalyse MRD-LAM FlowSOM

Le protocole de réanalyse utilisé se compose de deux onglets :

- Un onglet « *gating* »
- Un onglet « Compensations »

Une première fenêtre « Time » permet de visualiser et de sélectionner les différents prélèvements analysés (figure 45)

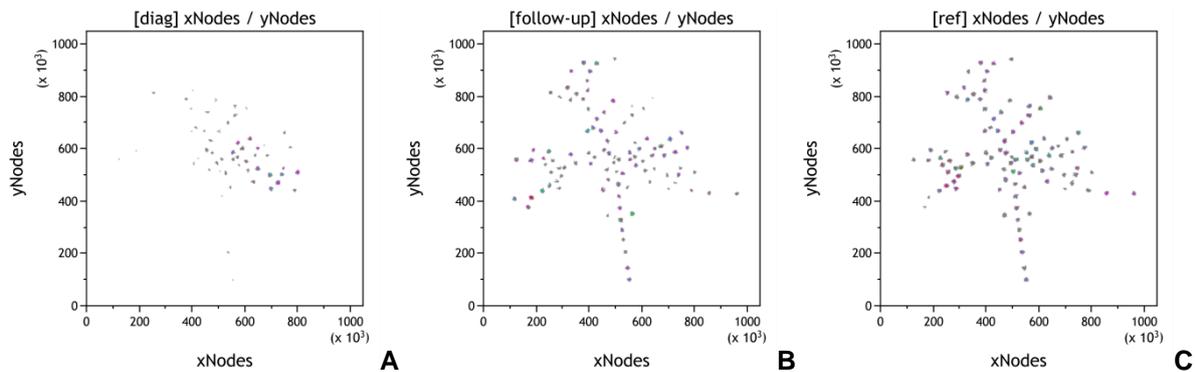


**Figure 45 : Fenêtrage « Time »**

*En rouge : les blastes au diagnostic (cellules collées à l'axe des ordonnées), en vert : les blastes dans le prélèvement de suivi, en gris : les blastes dans les différentes moelles de référence (ici, au nombre de 4)*

Les nouveaux paramètres générés permettent la réalisation de différents histogrammes que nous utiliserons pour l'analyse de la MRD-LAM :

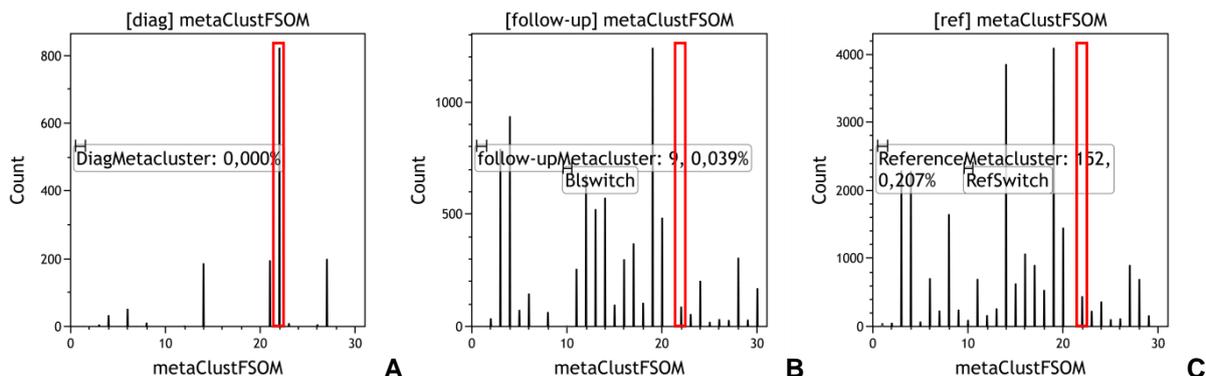
- Arborescence FlowSOM (figure 46)
- Métaclusters (figure 47)



**Figure 46** : Arborences FlowSOM de la population CD34+ CD117+

A : arborescence des blastes au diagnostic de LAM ; B : arborescence des blastes en suivi de LAM (MRD négative) ; C : arborescence des blastes des moelles de référence

La représentation en arborescence permet l'identification de nœuds correspondant à des sous populations cellulaires. Sur cet exemple, la répartition des nœuds entre le diagnostic (A) et le pool de moelles de référence (C) est significativement différente (témoin du processus leucémique)

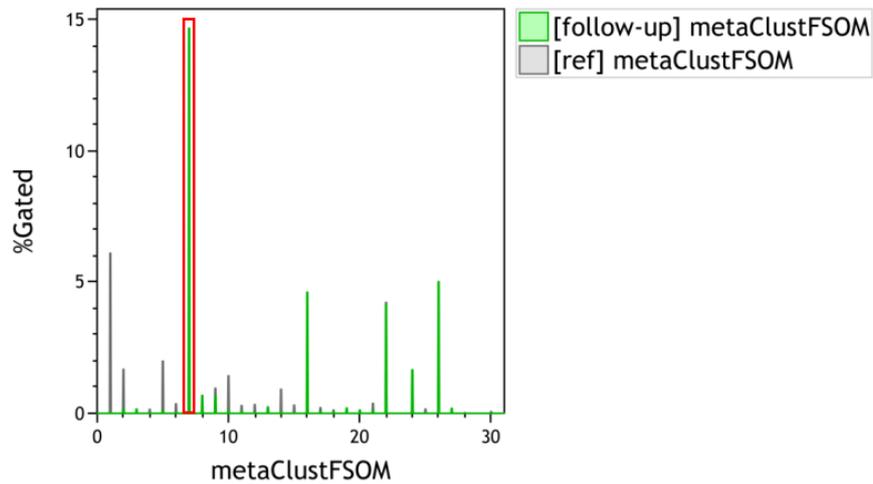


**Figure 47** : Visualisation des différents métaclusters de la population CD34+ CD117+

En abscisse : classification de la population blastique en 30 métaclusters, en ordonnée : le nombre d'éléments correspondant à chaque métacluster ; A : Blastes au diagnostic de LAM ; B : Blastes au suivi de LAM ; C : Blastes dans les moelles de référence

La classification de la population blastique en métaclusters permet de cibler le cluster majoritaire (encadré en rouge) présent au diagnostic au sein de la population blastique afin de les rechercher en suivi et d'étudier leur expression dans les moelles de référence.

Enfin, un histogramme construit à partir de la fonction « Overlay » de Kaluza® permet de superposer les métaclusters de la moelle de suivi et des moelles de référence afin d'identifier les sous populations pathologiques dans le cadre de l'évaluation de la MRD (figure 48). La quantification est réalisée en extrapolant le pourcentage du cluster étudié par rapport au nombre de blastes sélectionnés puis par rapport aux leucocytes totaux.



**Figure 48** : Distribution des métaclusters de la population CD34+ CD117+ dans une moelle de LAM en rechute par rapport à un pool de moelles de référence

*En vert : proportion des métaclusters étudiés dans la moelle en suivi, en gris : proportion des mêmes métaclusters étudiés dans un pool de moelles de référence, encadré en rouge le métacluster majoritaire retrouvé lors d'une rechute*

Les sous populations ainsi identifiées peuvent être réanalysées par « *back gating* », afin d'être interprétées avec les outils classique de CMF. La projection des clusters sur les histogrammes bi-paramétriques permet de préciser leur positionnement sur les graphes usuels.

### 5.3- Analyse des données

Pour ce travail, les résultats de MRD évalués par l'approche FlowSOM ont été comparés à ceux obtenus par l'approche conventionnelle LAIP/DfN-LSC pour quatre patients, soit un total de 10 prélèvements de MRD-LAM réanalysés selon l'approche FlowSOM.

Une analyse descriptive des résultats obtenus a été réalisée afin d'estimer le bénéfice éventuel apporté par cette double approche.

## IV- Résultats

### 1- Population étudiée et prélèvements

#### 1.1- Patients

Un total de 35 patients atteints de LAM a été inclus dans ce travail. Trois patients atteints de syndrome myélodysplasique avec excès de blastes de type II (SMD-EB-2) ayant bénéficié d'un suivi de MRD ont également été inclus dans l'étude. L'âge au diagnostic est compris entre 27 et 82 ans (moyenne = 60 ans ; médiane = 66 ans), le sex-ratio H/F est de 1.125 :

- 14 patients sont suivis au CHU de Lille
- 19 sont suivis au CHV
- 2 ont été suivis sur les 2 sites (transfert du CHV vers le CHU de Lille)

Les caractéristiques au diagnostic des patients inclus sont présentées dans le tableau 22 en annexe.

#### 1.2- Population témoin

Les principales caractéristiques de chaque moelle témoin (MT-n) sont répertoriées ci-dessous :

**Tableau 12 : Principales caractéristiques des moelles témoins (MT)**

	<b>MT-1</b>	<b>MT-2</b>	<b>MT-3</b>	<b>MT-4</b>	<b>MT-5</b>
<i>Âge/Sexe</i>	28/H	71/F	54/F	59/H	43/H
<i>Indication myélogramme</i>	MRD-LAL	Suspicion de myélome	Suspicion de mastocytose	Ré-évaluation d'une amylose	Thrombopénie
<i>NFS</i>	Ø cytopénie	Hb : 9,3 d/dL	Ø cytopénie	Ø cytopénie	Plq = 55 G/L
<i>Cytologie</i>	Absence de blastose résiduelle	Absence d'excès de plasmocytes	Absence de mastocytes sur les frottis examinés	Moelle normale Absence d'excès de plasmocytes	Moelle normale
	<b>MT-6</b>	<b>MT-7</b>	<b>MT-8</b>	<b>MT-9</b>	<b>MT-10</b>
<i>Âge/Sexe</i>	55/F	66/H	72/F	70/H	57/H
<i>Indication myélogramme</i>	MRD-LAL	Myélome en RC	Thrombopénie en réanimation	Suspicion de myélome (pic)	Suspicion de myélome (pic)
<i>NFS</i>	Ø cytopénie	Hb : 8,4 g/dL, Plq : 133 G/L	Hb : 10,0 g/dL, Plq : 29 G/L	Hb : 10,7 g/dL	Hb : 11,2 g/dL
<i>Cytologie</i>	Absence de blastose résiduelle	Aspect réactionnel	Aspect réactionnel	Absence d'excès de plasmocytes	Absence d'excès de plasmocytes

### **1.3- Échantillons**

Au total, 56 échantillons ont été testés en CMF au CHV selon le protocole MRD-LAM du groupe ALFA : 10 échantillons de moelle de référence et 46 échantillons de moelle de LAM (23 échantillons prélevés au diagnostic et 23 prélevés en suivi).

Les 23 prélèvements des échantillons de suivi de LAM étaient répartis de la façon suivante :

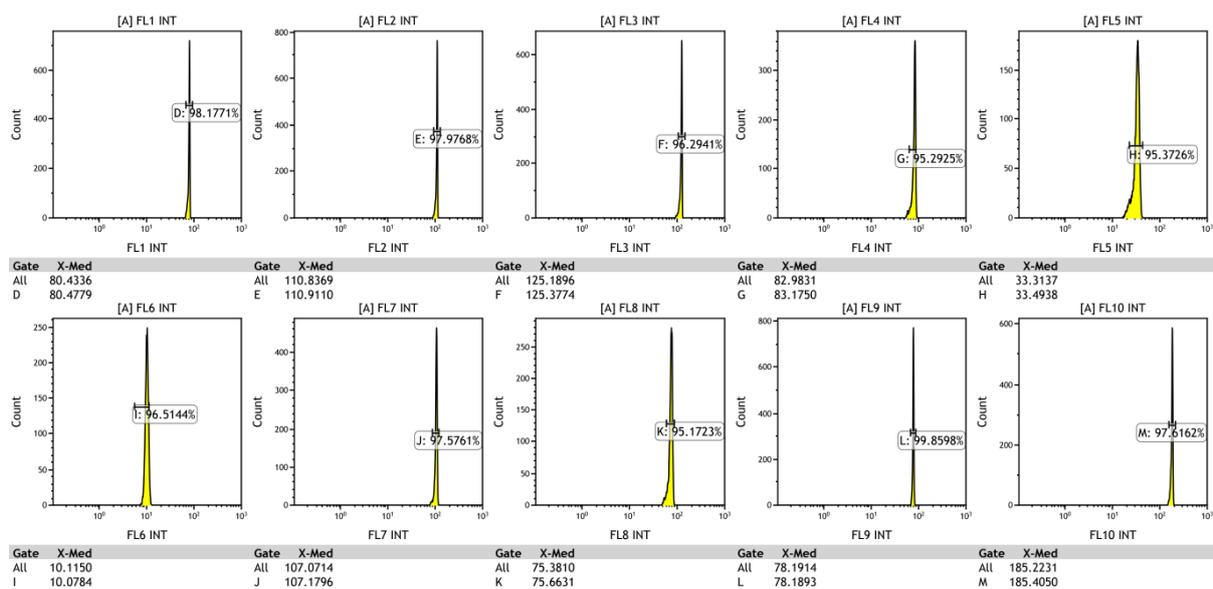
- 4 sorties d'aplasie post-induction (J15)
- 4 échantillons de MRD1 (pré-consolidation 1)
- 2 échantillons de MRD2 (pré-consolidation 2)
- 2 échantillons de MRD3 (pré consolidation 3 ou pré-allogreffe)
- 3 échantillons de MRD4 (fin de traitement ou post-allogreffe)
- 2 échantillons de rechute (ou échec de traitement)
- 6 échantillons autres (autre point de suivi, contrôle à distance...)

Parmi les 56 échantillons testés, 24 d'entre eux ont été traités en parallèle au CHV et au CHU de Lille (protocole technique et de réanalyse).

## **2- Protocole technique MRD-LAM**

### **2.1- Mise en miroir des cytomètres**

Le résultat du passage des billes FlowSet® au CHV est présenté en figure 49. Les bornes appliquées correspondent au lot de billes FlowSet® du CHU de Lille.

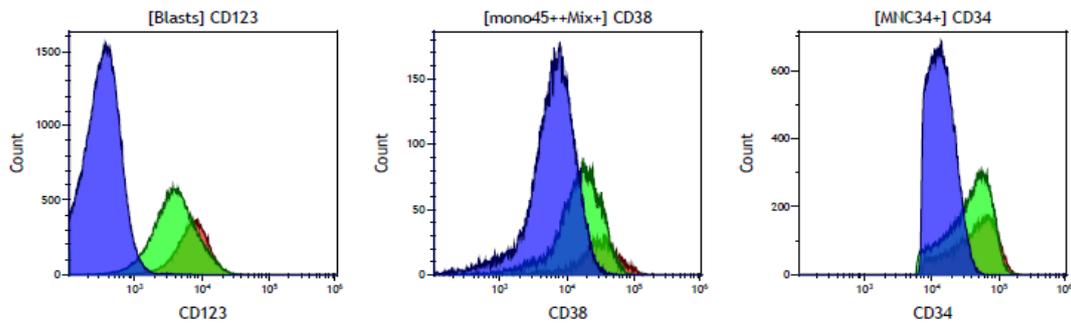


**Figure 49 : Passage des billes FlowSet® au CHV (cibles du CHU de Lille)**

Sur l'ensemble des canaux FL1 à FL10, le pic des billes se situe systématiquement dans les curseurs cibles avec un pourcentage de billes dans les régions supérieur à 95%.

## 2.2- Choix du tampon de lyse

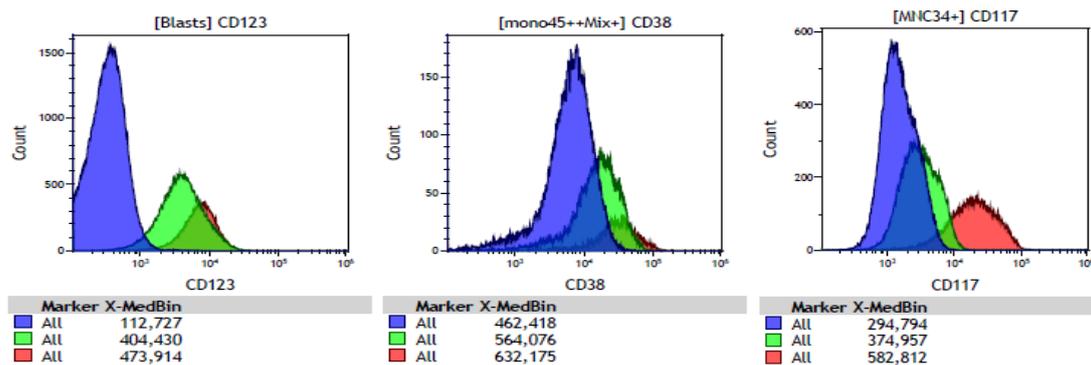
La comparaison des résultats obtenus entre les différentes lyses a été réalisée sur plusieurs échantillons via le menu « Composite » de Kaluza®. Avec la lyse macrovolume Optilyse® (bleu) et sur la majorité des anticorps du panel, on observe une perte significative d'intensité d'expression des marqueurs (non superposition des histogrammes) contre indiquant l'utilisation de l'Optilyse® pour cette technique (figure 50 illustrant les profils de fluorescence du CD123, CD34, CD38 obtenus avec le tube 2).



**Figure 50 : Comparaison des profils de fluorescence obtenus avec les différentes lyses**

En bleu : passage au CHV avec macrolyse Optilyse®, en vert : passage au CHV avec macrolyse Versalyse®, en rouge : passage au CHU de Lille avec macrolyse NH<sub>4</sub>Cl

Entre la lyse NH<sub>4</sub>Cl (rouge) et la Versalyse® (vert), nous n’observons pas de différence significative d’intensité d’expression excepté pour le CD38, le CD117, le CD123 (figure 51) et le CD90 pour lesquels une différence de MFI > 10% a été observée (<15% pour le CD38 et le CD123 et de l’ordre de 35% pour le CD117).



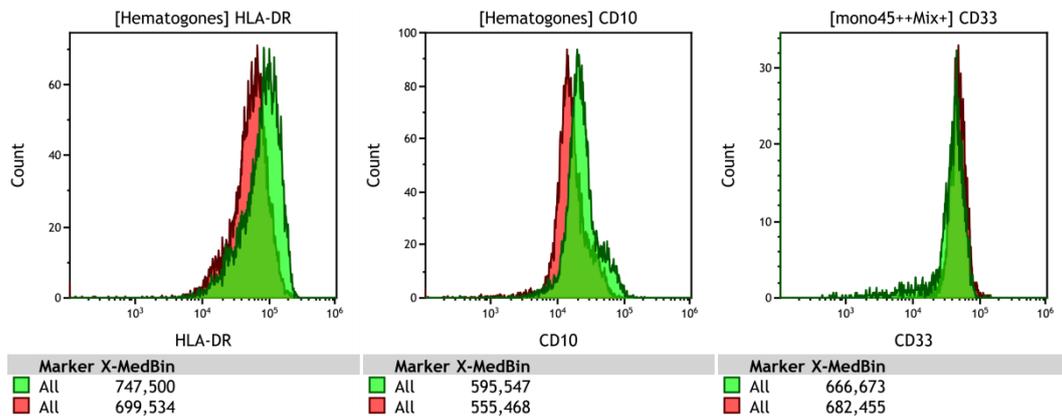
**Figure 51 : Comparaison des médianes de fluorescence obtenues avec les différentes lyses**

En bleu : passage au CHV avec macrolyse Optilyse®, en vert : passage au CHV avec macrolyse Versalyse®, en rouge : passage au CHU de Lille avec macrolyse NH<sub>4</sub>Cl

Pour le CD123, la différence de MFI observée n’a pas été retrouvée sur les autres tests effectués et était par ailleurs initialement peu significative (<15%).

### 2.3- Comparaison des anticorps utilisés

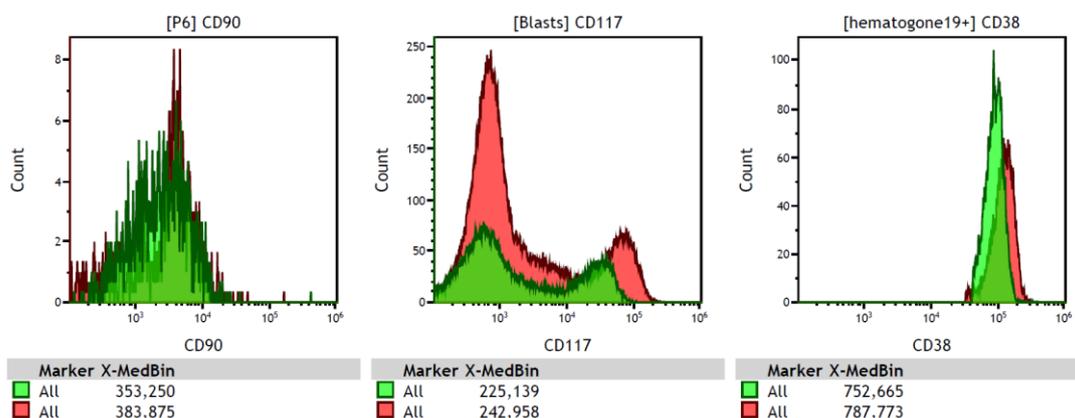
Pour un même clone d’anticorps, la nature « liquide » ou « lyophilisée » des anticorps n’impacte pas sur les profils de fluorescence obtenus, les profils de fluorescence observés étant superposables (figure 52).



**Figure 52** : Comparaison des médianes de fluorescence MFI obtenues entre les 2 sites (anticorps liquides et Duraclones®)

En vert : passage au CHV avec anticorps d'un tube Duraclone®, en rouge : passage au CHU de Lille avec anticorps liquides

Pour le CD38, le CD117 et le CD90, les clones utilisés pour les anticorps liquides (BD®) du CHU de Lille sont différents de ceux utilisés dans les Duraclones® (BC®) du CHV, ce qui explique les différences de MFI observées entre la Versalyse® et la lyse NH<sub>4</sub>Cl. En effet, ces différences ont été corrigées en travaillant avec les mêmes clones d'anticorps (anticorps liquides BD® utilisés au CHU de Lille), indépendamment du type de lyse utilisé (figure 53).



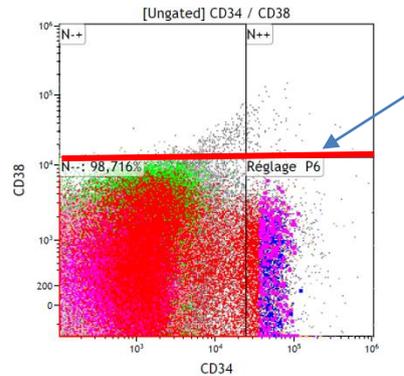
**Figure 53** : Comparaison des médianes de fluorescence MFI obtenues entre les 2 sites (anticorps liquides)

En vert : passage au CHV avec macrolyse Versalyse® et anticorps liquides, en rouge : passage au CHU de Lille avec macrolyse NH<sub>4</sub>Cl

La réalisation des tests ultérieurs sur Duraclone® a été réalisée en pré-incubant la suspension cellulaire avec 5µl de CD90 liquide (BD®) dans le tube 2 et 5 µl de CD117-BV421 liquide (BD®) dans les tubes 1, 2 et 3.

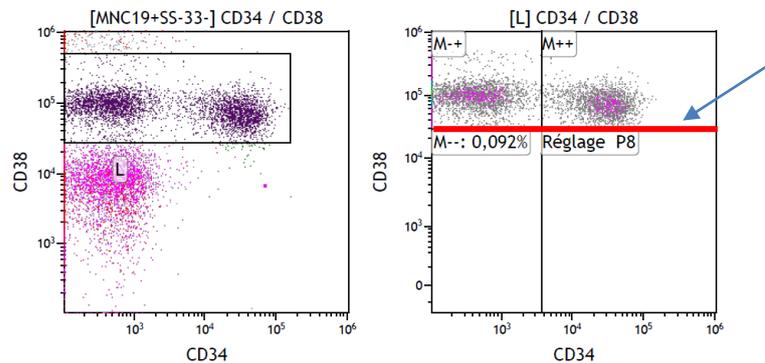
## 2.4- Détermination des seuils P6/P7/P8

La technique FMO a été réalisée sur une moelle témoin au CHV afin de valider les seuils appliqués pour P7/P8 sur le masque de ré-analyse proposé par l'intergroupe ALFA. La moelle sélectionnée, contenait par ailleurs une population importante d'hématogones nous permettant également de fixer le seuil P6/P7 (figures 54-56).



**Figure 54 : Réglage du seuil P6/P7 par l'approche FMO (*Fluorescence Minus One*)**

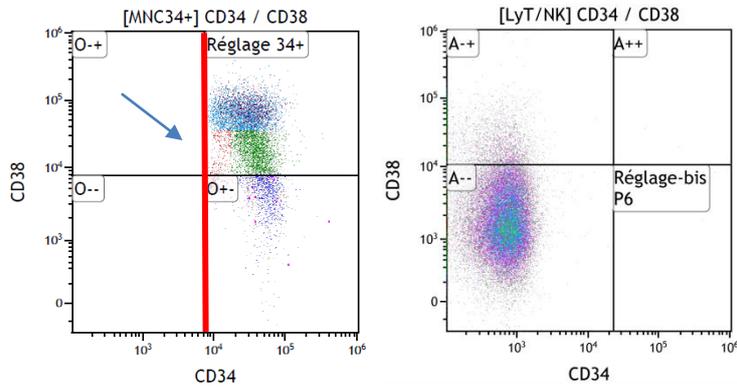
Seuil P6 (en rouge) placé juste au-dessus du signal d'auto-fluorescence des cellules (fenêtre « Ungated »)



**Figure 55 : Réglage du seuil P7/P8**

Le seuil P7/P8 est placé juste en dessous des hématogones (en mauve), les plasmocytes (en rouge) se trouvent juste au-dessus de ce compartiment

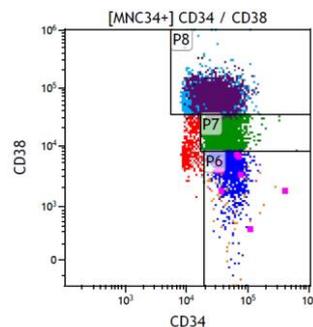
Pour le réglage du seuil de positivité du CD34, les MNC34+ servent de témoin positif, un contrôle de négativité est réalisé avec les lymphocytes T et NK .



**Figure 56** : Réglage du seuil de positivité du CD34

Les MNC34+ servent de témoin positif, un contrôle de négativité est réalisé avec les lymphocytes T et les cellules NK

Enfin, grâce à des fenêtres liées, les trois boîtes P6, P7 et P8 sont fixées et ne doivent en principe plus être modifiées (figure 57).



**Figure 57** : « Boîtes » finales P6/P7/P8 pour l'étude des cellules souches leucémiques (LSC)

La fenêtre P6 inclut les cellules souches CD34+CD38-. La fenêtre P7 inclut les CD34+CD38+ faible. La fenêtre P8 contient les cellules CD34+CD38+.

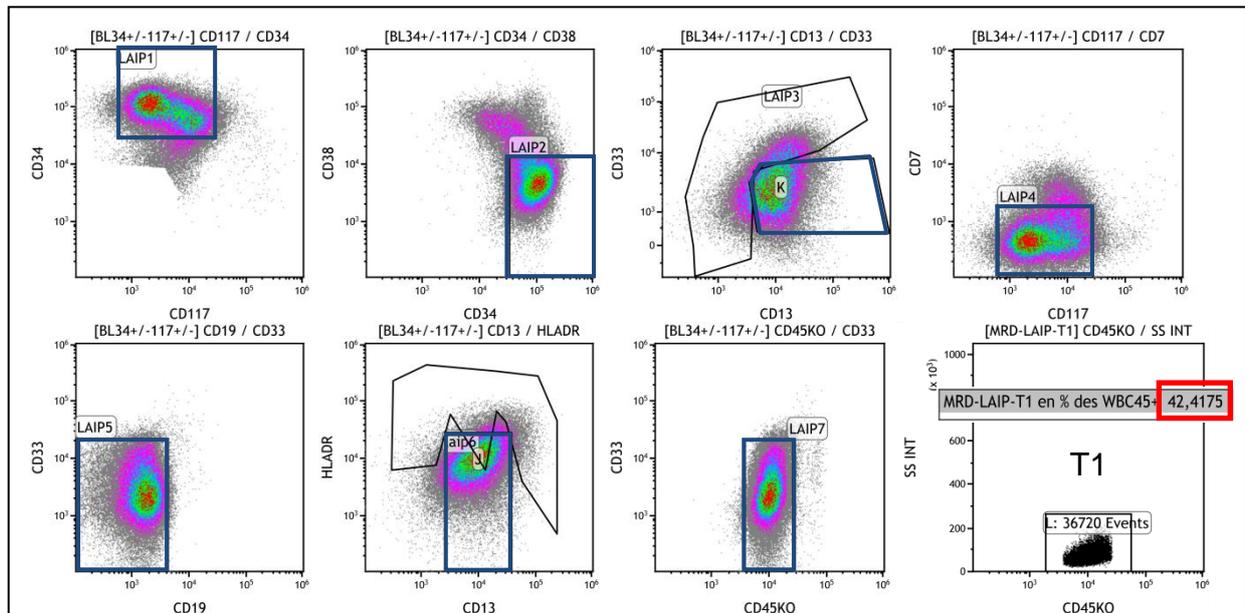
### 3- Sensibilité de la technique : épreuve de dilutions

#### 3.1- Sensibilité de la technique selon l'approche LAIP/DfN

Les résultats de l'épreuve de dilutions permettant d'évaluer la sensibilité de la technique selon l'approche LAIP sont présentés en figures 58 et 59.

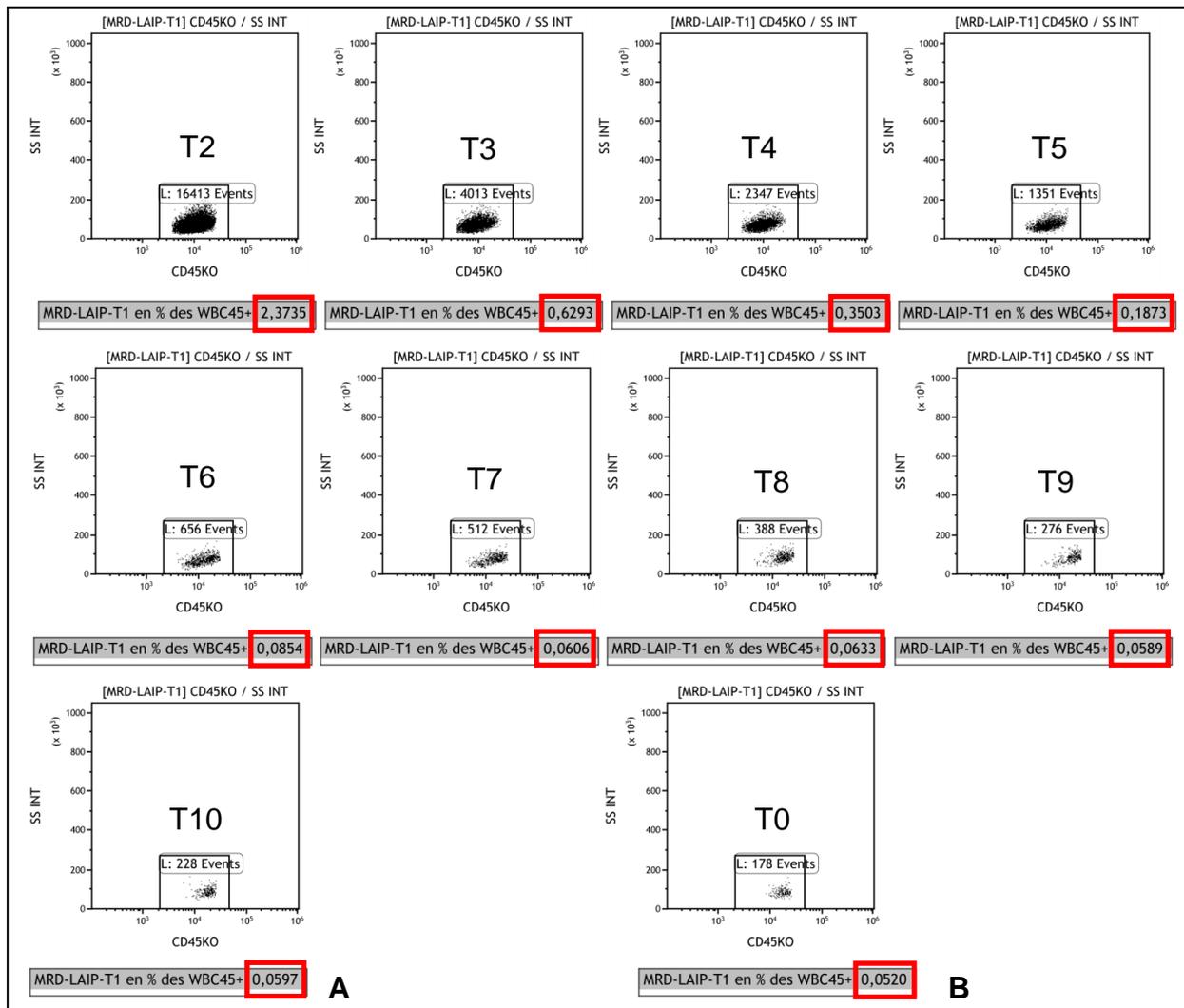
Le profil phénotypique des blastes au diagnostic, obtenu sur le tube 1 (tube orientation) est le suivant : **CD34+ CD38- HLA-DRdim CD33dim**

La proportion de cellules exprimant ce LAIP dans la moelle témoin (tube T0) ayant servi pour cette épreuve de dilutions a été quantifiée. Elle est de  $0,52 \times 10^{-3}$  (59B).



**Figure 58 : Profil phénotypique étudié pour l'épreuve de dilutions : LAIP au diagnostic**

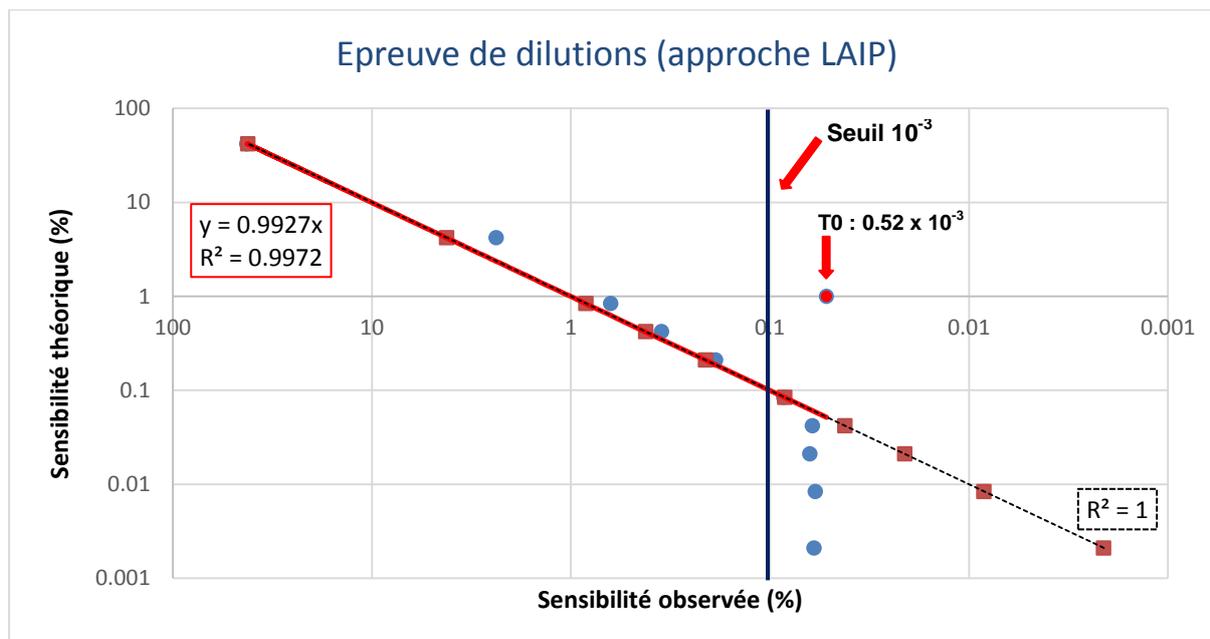
Proportion du LAIP étudié au diagnostic (T1) : 42.4% des leucocytes totaux (%WBC45+)



**Figure 59 : Résultats de l'épreuve de dilutions (approche LAIP)**

Pour chaque dilution (tubes T2 à T10), la proportion du LAIP étudié a été quantifiée (résultat encadré en rouge). Le tube T0 présente l'expression du LAIP sur une moelle témoin : 0,052% soit  $0,5 \times 10^{-3}$ .

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir des résultats obtenus (figure 60).



**Figure 60** : Courbe d'étalonnage de l'épreuve de dilutions réalisée sur le tube d'orientation (approche LAIP)

Points bleus : résultats de l'épreuve de dilutions - Carrés orange : résultats théoriques attendus  
 Droite rouge : droite de régression de l'épreuve de dilution, avec équation de la courbe et coefficient de corrélation calculé  
 Droite noire pointillée : droite de régression appliquée aux résultats théoriques attendus ( $R^2 = 1$ )  
 T0 : expression du LAIP étudié sur la moelle témoin ayant servi pour l'épreuve de dilutions

La courbe d'étalonnage est linéaire jusqu'au tube T6 de notre épreuve de dilutions, soit jusqu'à une concentration de  $0,85 \times 10^{-3}$ . Au-delà, la sensibilité de la technique est limitée par l'expression physiologique du LAIP mesurée sur une moelle témoin.

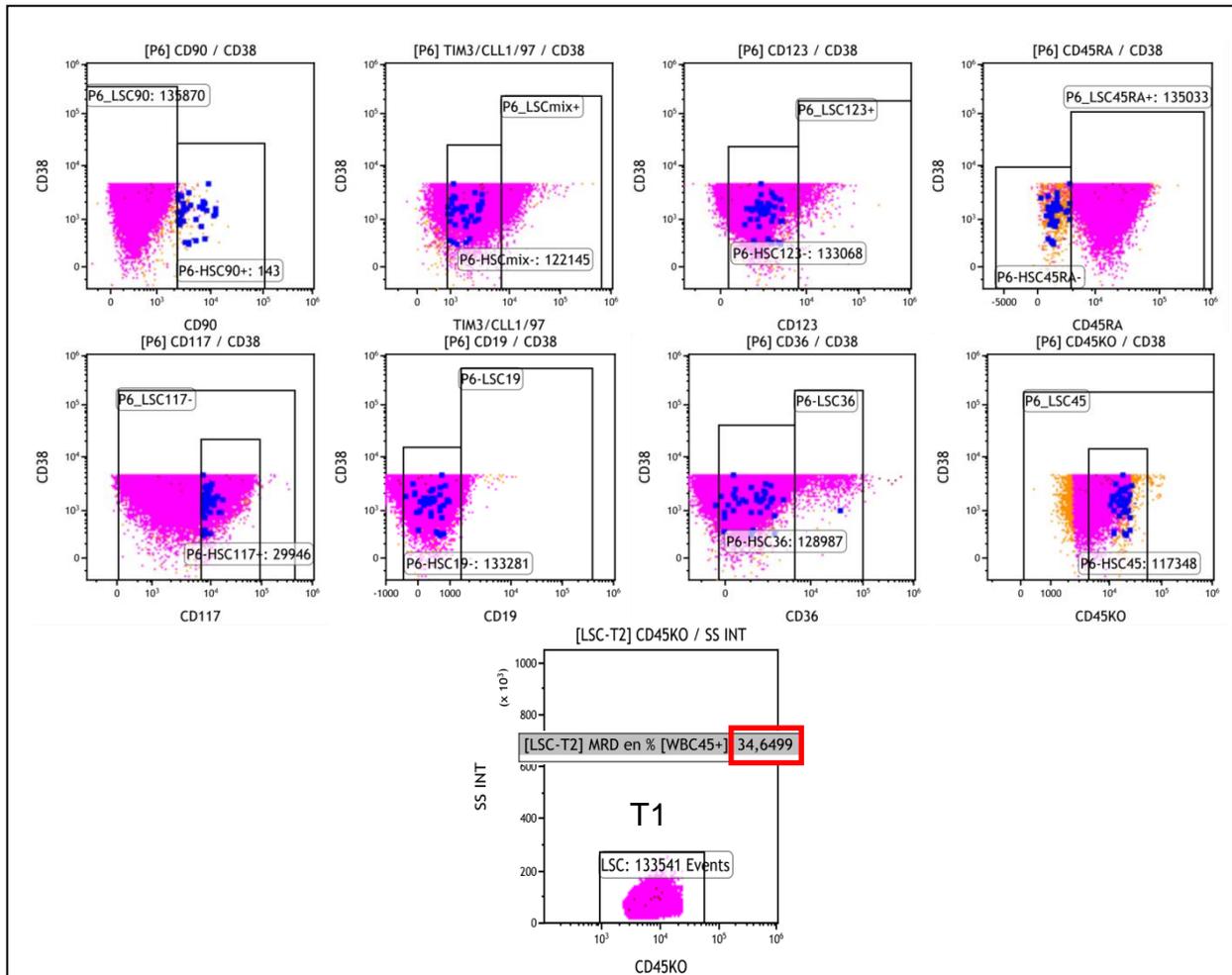
Pour chaque tube le nombre d'acquisition ( $> 500\,000$  événements) nous a permis d'atteindre une LOD bien inférieure à ce seuil de sensibilité, de l'ordre de  $0,1 \times 10^{-4}$ .

### 3.2- Sensibilité de la technique selon l'approche LSC

De la même manière, les résultats de l'épreuve de dilutions permettant d'évaluer la sensibilité de la technique selon l'approche LSC sont présentés en figures 61 et 62.

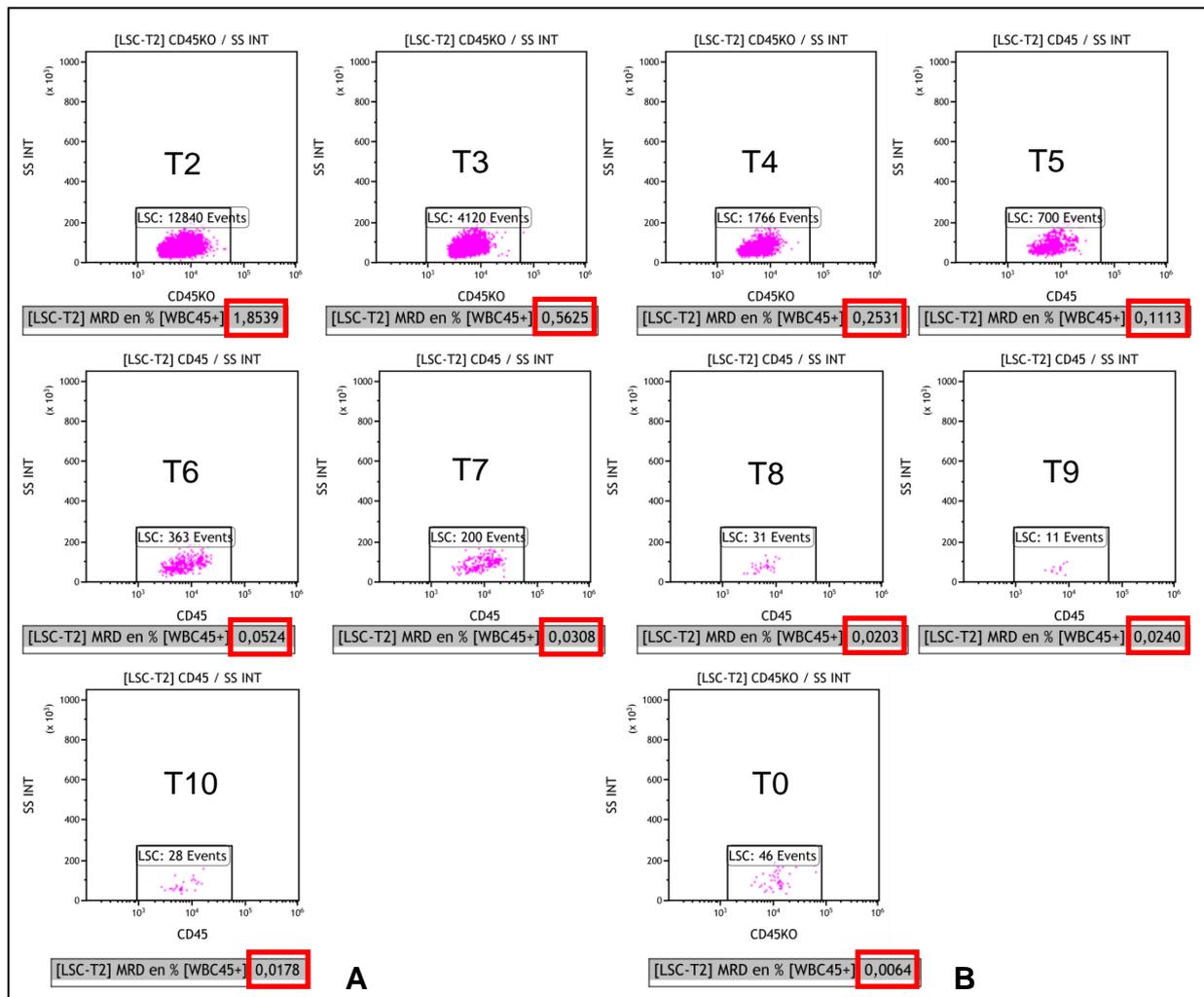
Le profil phénotypique des blastes au diagnostic, obtenu sur le tube 2 (tube LSC) est le suivant : **CD34+ CD38- CD90- Mix- CD123- CD45RA- CD117+ CD19- CD36-**

La proportion de cellules exprimant ce phénotype dans la moelle témoin ayant servi pour cette épreuve de dilutions est de  $0.6 \times 10^{-4}$  (62B).



**Figure 61** : Profil phénotypique utilisé pour l'épreuve de dilution : profil LSC au diagnostic

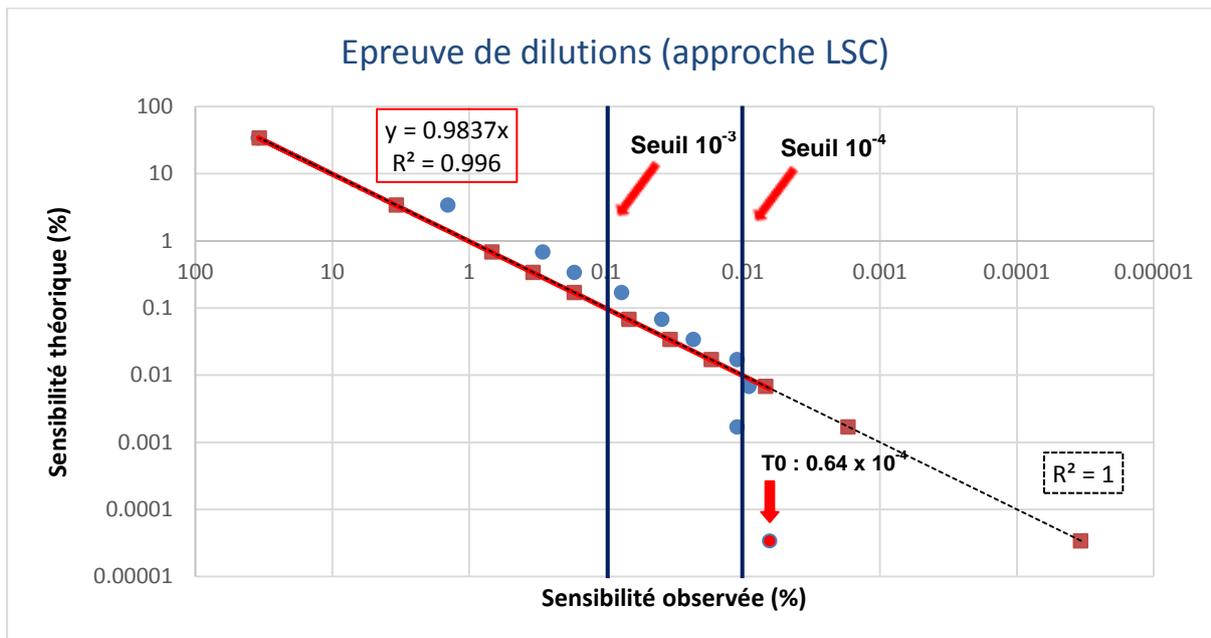
Proportion de LSC (en rose) au diagnostic (T1) : 34,6% des leucocytes totaux (%WBC45+)  
Les HSC sont représentées en bleu.



**Figure 62 : Résultats de l'épreuve de dilutions (approche LSC)**

Pour chaque dilution (tubes T2 à T10), la proportion de LSC a été représentée (résultat encadré en rouge). Le tube T0 présente l'expression du profil LSC étudié sur une moelle témoin : 0,0064 % soit  $0.6 \times 10^{-4}$

Une courbe d'étalonnage a été établie à partir des résultats obtenus (figure 63) :



**Figure 63 : Courbe d'étalonnage de l'épreuve de dilution réalisée sur le tube LSC**

Points bleus : résultats de l'épreuve de dilutions - Carrés orange : résultats théoriques attendus  
 Droite rouge : droite de régression de l'épreuve de dilution, avec équation de la courbe et coefficient de corrélation calculé  
 Droite noire pointillée : droite de régression appliquée aux résultats théoriques attendus ( $R^2 = 1$ )  
 T0 : expression du profil LSC étudié sur la moelle témoin ayant servi pour l'épreuve de dilutions

La courbe d'étalonnage est linéaire jusqu'au tube T7 de notre épreuve de dilutions, soit jusqu'à une concentration de  $0,31 \times 10^{-3}$ .

Pour les tubes T0 à T7 le nombre d'acquisition ( $> 500\,000$  évènements) nous a permis d'atteindre une LOD bien inférieure au seuil de sensibilité de la technique, de l'ordre de  $0,1 \times 10^{-4}$ . Pour les points suivants, la sensibilité de la technique est limitée par LOD (acquisition réalisée sur 200 000 à 300 000 évènements, seuil recommandé de 500 000 à 1 000 000 non atteint en raison d'un nombre insuffisant de cellules).

## 4- Résultats de la MRD-LAM LAIP/DfN-LSC

### 4.1- Caractéristiques des profils LAIP étudiés

Le tableau 13 précise les caractéristiques des profils LAIP étudiés dans notre étude. Pour chaque LAIP, nous avons mesuré l'expression physiologique du LAIP sur le pool de moelles témoin et sur chacune des moelles témoins étudiées individuellement. Les résultats sont présentés sur le tableau 13 : moyenne du pool de moelles témoins (MOY)  $\pm$  2 écarts types (ECT).

**Tableau 13 : Description des LAIP étudiés et expression physiologique**

Patient	Profil phénotypique des blastes au diagnostic	Type de LAIP	Expression MO témoins (%) (MOY $\pm$ 2 ECT)
1	CD34- CD117- CD33+ CD11bpartiel CD36+ CD4+ CD14- (phénotype promonocyte)	Perte d'expression (CD11b)	0,02 $\pm$ 0,02
2	CD34+ CD117+ CD33+ CD13-	Perte d'expression (CD13)	0,03 $\pm$ 0,06
3	CD34+ CD117+ HLADRpartiel CD33+	Perte d'expression (HLA-DR)	<i>Non fait car diagnostic réalisé avec ancien panel</i>
4	CD34- CD117- CD33fort CD4+ CD14+ CD36+ CD11b+ (phénotype monocytaire)	<b>Absence de LAIP</b>	<b>0,53 <math>\pm</math> 0,48</b>
5	CD34- CD117+ HLADR+ CD33++ CD13+	Modulation d'expression (CD33)	0,06 $\pm$ 0,04
6	CD34- CD117+ HLADR+ CD13dim CD33++	Modulation d'expression (CD13 et CD33)	0,03 $\pm$ 0,03
7	CD34+ CD117+ HLADR+ CD13+ CD33+ CD38dim	<b>Absence de LAIP robuste</b>	<b>0,18 <math>\pm</math> 0,18</b>
8	CD34+ CD117+ CD13+ CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,02 $\pm$ 0,08
9	CD34+ CD117+ HLADR partiel CD13+ CD33+ CD7+	Infidélité de lignée (CD7)	< 0,01 $\pm$ 0,01
10	CD34++ CD117+ HLADRdim CD33+ CD13++ CD38+	Modulation d'expression (CD34, HLA-DR, CD13)	0,003 $\pm$ 0,01
11	CD34+ CD117+ CD13+ CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,03 $\pm$ 0,05
12	CD34- CD117+ HLADR-CD13dimCD33+	Expression diminuée (CD13)	0,03 $\pm$ 0,03
13	CD34+ CD117+ HLADRdim CD13+ CD33+	Expression diminuée (HLA-DR)	0,08 $\pm$ 0,08
14	CD34+ CD117+ /HLADR+ CD13+ CD33++ CD117+	Surexpression (CD33)	0,04 $\pm$ 0,06
15	CD34+ CD117+ HLADR+ CD13+dim CD33++	Modulation d'expression (CD13 et CD33)	0,03 $\pm$ 0,05
16	CD34+ CD117+ HLADR- CD13partiel CD33+	Perte d'expression (HLA-DR, CD13)	< 0,01 $\pm$ 0,006
17	CD34+ CD117+ CD13+ CD33+ CD7faible	Infidélité de lignée (CD7)	0,02 $\pm$ 0,07
18	CD34- CD117partiel HLADR+ CD13- CD33+ CD38+	<b>Absence de LAIP robuste</b>	<b>0,14 <math>\pm</math> 0,24</b>
19	CD34- CD117- HLADRpartiel CD33++ CD4 $\pm$ CD14- CD11bpartiel CD36+	Perte d'expression (HLA-DR)	0,03 $\pm$ 0,05

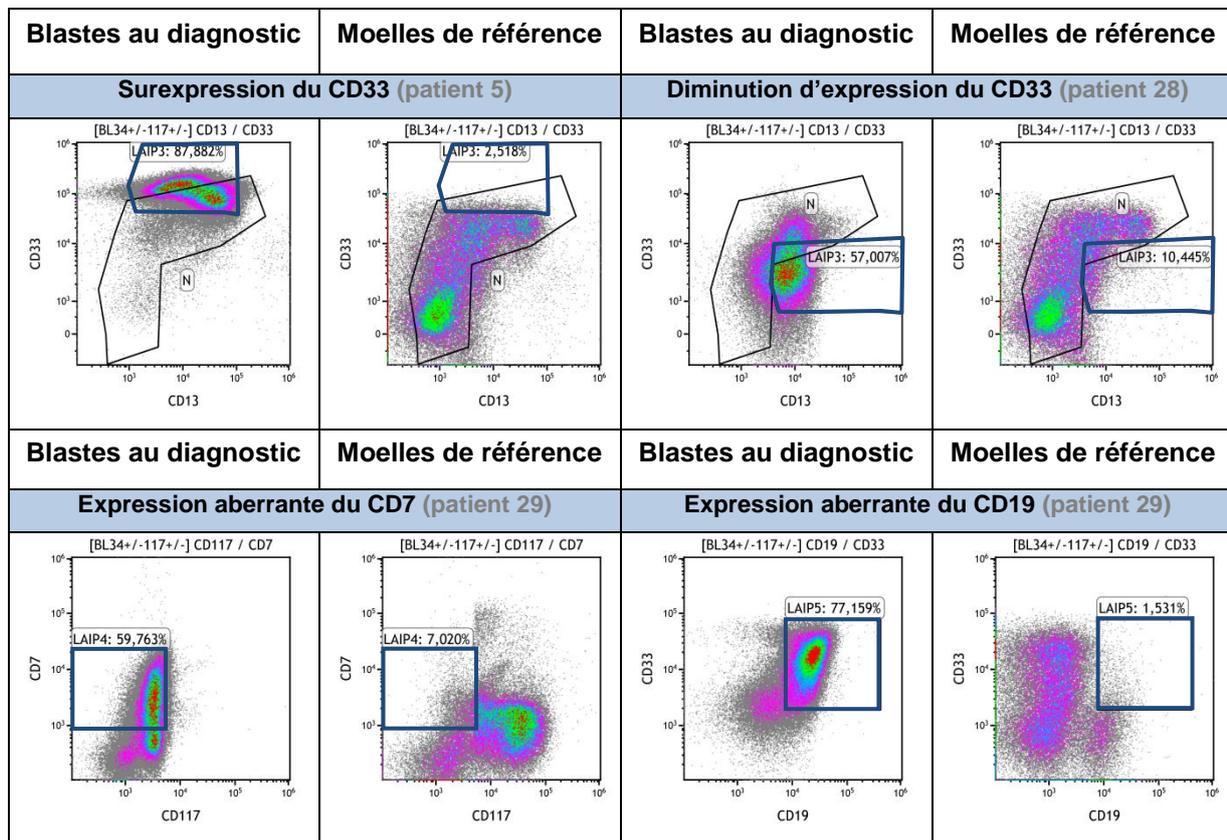
20	CD34+ CD117+ CD13+ CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,07 ± 0,09
21	CD34+ CD117+ CD13+ CD33+ CD7partiel CD56+	Infidélité de lignée / expression aberrante (CD7 et CD56)	0,02 ± 0,06
22	CD34- CD117partiel HLADR-CD13- CD33+ / -	Perte d'expression (CD13)	< 0,01 ± 0,008
23	CD34- CD117+ CD33+ CD56+	Expression aberrante (CD56)	0,02 ± 0,03
24	CD34+ CD117+ CD13+ CD33dim CD56partiel CD10+	Expression aberrante (CD56) et infidélité de lignée (CD34+ CD10+)	0,003 ± 0,01
25	CD34- CD117partiel HLADRdim CD13+ CD33+	Asynchronisme	0,007 ± 0,012
26	CD34- CD117- HLADRfaible CD13+ CD33+ CD36+ CD14+ CD4faible	<b>Absence de LAIP robuste</b>	<b>0,13 ± 0,22</b>
27	CD34+ CD117+ HLADRdim CD38+ CD13dim CD33+	Expression diminuée (HLA-DR, CD13)	0,06 ± 0,10
28	CD34+ CD117faible HLADR+ CD13+ CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,04 ± 0,06
29	CD34faible CD117- HLADR+ CD13+ CD33+ CD19+ LA à composante monocytaire avec présence de 2 populations	Expression aberrante (CD19) sur blastes myéloïde	< 0,01 ± 0,002
30	CD34+ CD117+ HLADR+ CD13+/CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,03 ± 0,1
31	LA bi clonale (M+L), absence de suivi	Non précisé	Non déterminé
32	CD34+ CD117+ CD38- CD13+ CD33+ HLADR+	Perte d'expression (CD38)	0,002 ± 0,008
33	CD34+ CD117+ CD13+ CD7+	Infidélité de lignée (CD7)	<i>Non fait car diagnostic réalisé avec ancien panel</i>
34	CD34+ CD117+ HLADR+ CD33+ CD7+	Infidélité de lignée (CD7)	< 0,01 ± 0,003
35	CD34+ CD117+ CD38- CD33dim	Expression diminuée (CD33)	0,05 ± 0,04

La classification en type de LAIP est à interpréter avec précaution. En effet, il est parfois difficile de définir le type de LAIP correspondant au profil phénotypique observé – plusieurs types de LAIP pouvant coexister (asynchronisme ± infidélité de lignée/expression aberrante ± modulation ou perte d'expression)

### Spécificité des LAIP testés

La majorité des LAIP étudiés dans ce travail présentaient une expression physiologique (pool de moelles témoins) inférieure à 0,1% soit  $10^{-3}$ , avec des niveaux de sensibilité variable selon le type de LAIP étudié. Plusieurs exemples sont présentés en figures 64.

En l'absence de LAIP robuste au diagnostic, un suivi en CMF a néanmoins été réalisé (moindre sensibilité de la technique, seuil  $< 10^{-3}$ ). Une perte d'hétérogénéité de la population CD34± CD117± a été dans ce cas recherchée dans les moelles de suivi.



**Figure 64 : Exemples de différents types de LAIP**

Pour le patient 5, il existe une surexpression du CD33. Cette anomalie constitue un bon LAIP puisqu'il est retrouvé à des taux de 0,06% dans le pool de moelles de référence.

Pour le patient 28, c'est au contraire une diminution d'expression du CD33 qui confère au LAIP une très bonne spécificité puisque son taux d'expression est retrouvé à 0,04% sur le « merge » des moelles de référence.

Pour le patient 29, les blastes présentent une expression aberrante du CD19 et du CD7 (expression partielle). L'expression de ce LAIP dans le pool de moelles de référence est retrouvée à un taux très faible : inférieur à 0,01%.

#### 4.2- Caractéristiques des profils LSC étudiés

Les caractéristiques des LSC pour chaque patient ayant bénéficié de l'approche LSC et pour lesquels nous disposons d'au moins quatre points de suivi, sont répertoriées dans le tableau 14.

**Tableau 14 : Profil des cellules souches leucémiques (LSC) étudiés**

Patient	% LSC au diagnostic ou à la rechute (/blastés totaux)	Profil LSC	Expression MO témoins (%) (MOY ± 2 ECT)
10	3,20 (rechute)	CD34+ CD38- CD90 Mix+ CD45RA+	0,002 ± 0,004
14	9,38	CD34+ CD38- CD90- Mix+ CD45RApartiel	0,001 ± 0,002
21	3,69	CD34+ CD38- CD90- Mix+ CD45RA?*	0,001 ± 0,002
35	25,85	CD34+ CD38- CD90- CD45RA+ CD117dim	0,002 ± 0,004

\*Suspicion d'oubli d'anticorps CD45RA dans le tube

### 4.3- Comparaison inter-centres des résultats

#### 4.3.1- Approche LAIP/DfN

Le tableau 15 présente la comparaison des résultats de MRD-LAM obtenus sur des prélèvements traités par les deux centres (CHU de Lille et CHV), le plus souvent à 24h d'intervalle (protocole technique et de réanalyse).

**Tableau 15 : Comparaison inter-opérateurs des résultats de MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN**

*Protocole technique et stratégie de réanalyse réalisés dans chaque centre*

Patients	Point de suivi	Approche LAIP						Concordance
		Acquisition par tube* nombre d'évènements CD45+		MRD-LAIP (%)		Interprétation finale		
		CHU	CHV	CHU	CHV	CHU	CHV	
11	MRD4	771 830	419 311	0,03	0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
12	MRD2	855 906	332 438	0,02	0,04	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
13	MRD autre	458 000	322 962	0,03	0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
14	MRD autre	788 000	398 269	0,04	0,02	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
15	MRD4	282 000	210 140	0,03	< 0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
18	MRD4	914 000	587 532	0,04	0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
	MRD autre	1 370 000	323 511	< 0,01	0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
19	MRD2	1 066 000	597 574	0,07	0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
20	MRD autre	450 000	557 887	0,03	0,02	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
21	MRD2	313 000	456 546	0,5	0,5	Positif	Positif	Oui

\*Acquisition optimale : > 500 000 évènements – Acquisition acceptable : 400 000 - 499 000  
Acquisition à interpréter : 100 000 - 399 000 évènements – Acquisition non acceptable <100 000

Les résultats montrent une excellente corrélation inter-centres sur les taux de MRD-LAM obtenus via l'approche LAIP/DfN. Ils permettent de valider le protocole technique mis en place à Valenciennes.

A noter des variations inter-sites et inter-échantillons sur le nombre d'évènements CD45+ acquis. Le nombre d'évènements acquis est dans la majorité des cas, supérieur au CHU de Lille par rapport au CHV.

Ces variations inter-sites n'ont pas eu d'impact sur l'interprétation finale de l'analyse. Néanmoins, en deçà de 400 000 évènements, en cas de MRD-négative, un commentaire accompagnant le résultat doit être signalé sur le compte rendu : l'acquisition non optimale étant susceptible d'induire une perte de sensibilité de la technique (risque de résultat « faussement » négatif).

Afin de valider la stratégie de réanalyse sur un plus grand nombre d'échantillon, une analyse conjointe des fichiers LMD a été réalisé sur le logiciel Kaluza® à la fois par un opérateur du CHU de Lille et par un opérateur du CHV (tableau 16).

**Tableau 16 : Comparaison inter-opérateurs de la stratégie de réanalyse du protocole MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN**

*Transfert de fichiers LMD inter-centres*

Patients	Point de suivi	Approche LAIP						Concordance
		WBC45+ (nombre d'évènements)		MRD-LAIP (%)		Interprétation finale		
		CHU	CHV	CHU	CHV	CHU	CHV	
3	MRD1	580 891	599 263	0,01	0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
5	Suspicion de rechute	1 192 000	1 197 825	0,27	0,27	Positif	Positif	Oui
10	MRD2	731 000	763 821	< 0,01	0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
	Suspicion de rechute	395 000	407 820	0,97	0,99	Positif	Positif	Oui
12	MRD3	1 317 000	1 297 721	0,03	0,05	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
13	MRD1	542 000	512 099	0,03	0,09	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
14	MRD3	361 413	356 178	0,18	0,18	Positif	Positif	Oui
	MRD autre	865 000	882 236	0,04	0,06	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
15	MRD3	536 000	523 703	0,09	0,09	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
	Suspicion de rechute	222 000	211 130	2,0	2,9	Positif	Positif	Oui
	MRD2	660 000	693 166	0,30	0,14	Positif	Positif	Oui
17	Absence de réponse	977 000	680 061	14,0	14,7	Positif	Positif	Oui
19	MRD2	1 066 000	1 073 792	0,07	0,06	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Oui
21	MRD1	171 980	189 719	2,8	2,8	Positif	Positif	Oui
	MRD2	313 000	324 649	0,55	0,51	Positif	Positif	Oui
24	Absence de réponse	421 000	410 573	18,00	18,13	Positif	Positif	Oui
	Absence de réponse	342 000	333 638	1,4	1,8	Positif	Positif	Oui
	Absence de réponse	866 000	878 499	6,00	3,44	Positif	Positif	Oui
	Absence de réponse	950 000	927 287	0,40	0,37	Positif	Positif	Oui
	Absence de réponse	Non précisé	409 552	3,0	2,1	Positif	Positif	Oui

Les résultats montrent une très bonne corrélation inter-opérateurs pour la stratégie de réanalyse. Aucune discordance sur l'interprétation finale n'a été retrouvée sur les 20 dossiers analysés par les deux centres.

Pour la MRD2 du patient 24, nous retrouvons un pourcentage à 3,44% contre 6% pour le CHU de Lille. Le nombre d'évènements CD45+ pris en compte pour l'analyse (dénominateur) n'était pas discordant (878 499 et 866 000 respectivement).

Plus que le taux précis, c'est dans ce cas la cinétique d'évolution du LAIP qui est importante, et elle ne diffère pas dans ce cas entre les deux sites.

Ces résultats permettent donc de valider la stratégie de réanalyse de la MRD-LAM selon l'approche LAIP/DfN entre les deux sites.

#### 4.3.2- Approche LSC

Le tableau 17 présente la comparaison inter-centre des résultats de MRD-LAM obtenus selon l'approche LSC : analyse par un opérateur du CHV des fichiers « .LMD » provenant de diagnostics réalisés au CHU de Lille.

**Tableau 17 : Comparaison inter-opérateurs de la stratégie de réanalyse du protocole MRD-LAM selon l'approche LSC**

*Transfert de fichiers LMD inter-centres*

Patient	Point de suivi / tube 2	Approche LSC						Concordance CHU de Lille / CHV
		WBC45+		MRD-LSC%		Interprétation		
		CHU	CHV	CHU	CHV	CHU	CHV	
10	Suspicion de rechute	ND	531 758	ND	0,153	ND	Positif	NA
	MRD1	ND	857 274	ND	0,016	ND	Faiblement Positif	NA
14	MRD3	ND	322 337	ND	0,098	ND	Positif	NA
	MRD4	ND	877 703	ND	0,005	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD autre	ND	811 866	ND	0,002	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD autre	ND	405 907	ND	0,003	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD autre	ND	876 563	ND	0,005	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD autre	ND	874 169	ND	0,001	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
21	MRD1	ND	176 797	ND	0,014	ND	Positif	NA
	MRD2	ND	308 006	ND	0,005	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD3	ND	324 339	ND	0,003	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD4	ND	897 820	ND	0,001	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
35	Echec	145 000	211 719	5,6	4,312	Positif	Positif	Oui
	MRD2	ND	816 856	ND	0,364	ND	Positif	NA
	MRD3	714 000	817 348	0,5	0,362	Positif	Positif	Oui
	MRD4	ND	317 227	ND	0,001	ND	Négatif < 10 <sup>-4</sup>	NA
	MRD autre	ND	492 939	ND	0,025	ND	Positif	NA
	MRD autre	Non précisé	283 216	3,4	2,615	Positif	Positif	Oui
	MRD autre	ND	28 945	ND	0,491	ND	Positif	NA

ND : Non déterminé ; NA : non applicable

Au CHU de Lille, la présence de LSC n'a été signalée qu'en cas de résultat significativement positif (patient 35) et uniquement sur certains points de suivi. Dans la majorité des cas, les résultats de la MRD obtenu selon l'approche LSC n'ont pas été signalés sur le compte rendu de résultat, l'interprétation finale tenant compte en premier lieu du résultat obtenu par l'approche LAIP/DfN. Il est donc difficile de comparer les résultats inter-sites de la MRD-LAM selon l'approche LSC.

Néanmoins, pour les points de suivi pour lesquels nous disposions de résultats de MRD-LAM-LSC inter-sites, aucune discordance de résultat n'a été observée. Des variations peuvent être observées sur le taux mesuré, mais restent modérées et sans impact sur le résultat final.

Concernant les points de suivi pour lesquels des taux de MRD-LSC supérieurs à 0,01% ont été observés à posteriori au CHV et n'ont pas été signalés au CHU de

Lille, chez la majorité d'entre eux, le fait de signaler ou non la présence de LSC ne modifiait pas l'interprétation finale du résultat de MRD-CMF, un résultat de MRD-LAM positif ayant été observé selon l'approche LAIP/DfN.

Pour seulement l'un de ces prélèvements (MRD1 post rechute du patient 10), un résultat faiblement positif en MRD-LSC (résultats CHV) était associé à un résultat négatif en MRD-LAIP/DfN. Le fait de signaler un taux de MRD-LSC positif modifiait donc l'interprétation finale de la MRD-CMF

Pour ce patient, initialement le nombre de LSC par rapport aux blastes totaux au diagnostic était de 0,15% ce qui ne permettait pas un suivi de la MRD par l'approche LSC chez ce patient. A la rechute, un nombre plus important de LSC à 3,20% parmi les blastes (0,15% des leucocytes) est mis en évidence. Le profil phénotypique observé est CD90- CD45RA+ Mix+.

La MRD1 (post rechute) par l'approche LAIP/DfN conclue à une MRD négative. Sur le tube 2, nous retrouvons une population de LSC CD34+ CD38- Mix+ CD90+ CD45RA-, quantifiée à 0,016%. Ce taux de MRD-LSC faiblement positive était associé à une MRD en BM également positive pour le transcrite de fusion *CBFB-MYH11* (MRD positive à 0,395%/plasmide soit une diminution de moins de 3 log<sub>10</sub> par rapport à la rechute).

## **5- Etude de la concordance entre les résultats de MRD en CMF et ceux de BM**

Parmi les 35 patients inclus dans cette étude :

- 2 n'ont pas bénéficié d'une recherche d'anomalies en BM au diagnostic et n'ont pas eu de suivi de MRD-LAM
- 10 n'ont pas de marqueurs positifs en BM permettant un suivi de la MRD
- 23 présentent au diagnostic un ou plusieurs marqueurs permettant un suivi de la MRD en biologie moléculaire :

\* 21 avec une surexpression de *WT1* et/ou une mutation de *NPM1*

\* 1 avec un transcrite de fusion *KMT2A-MLL* (t(9;11))

\* 1 avec un transcrite de fusion *CBFB-MYH11* (inv(16)(p13q22))

La concordance des résultats de la MRD-LAM obtenus en CMF et en BM (tous marqueurs confondus) pour un même point de suivi a été analysée de façon rétrospective sur 61 prélèvements (MRD1 à MRD4, rechute ou autres points de MRD) (tableau 18).

**Tableau 18 : Résultats de l'analyse de MRD-LAM en CMF et en BM**

	<b>Positif BM</b>	<b>Négatif BM</b>	<b>Total</b>
<b>Positif CMF</b>	16	0	16
<b>Négatif CMF</b>	15	30	45
<b>Total</b>	31	30	61

Les résultats entre les deux techniques sont concordants pour 46 prélèvements sur 61 (16 résultats positifs et 30 résultats négatifs). Une discordance est retrouvée pour 15 échantillons avec un résultat de MRD positif en BM et négatif en CMF.

Le coefficient de concordance kappa est calculé à 0,512. Ce coefficient ne tient pas compte des différences de nature de prélèvement (échantillons de sang ou moelle testés pour l'évaluation de la MRD en BM) mais uniquement du résultat final (positif ou négatif au seuil de sensibilité) dans chacune des techniques : cytométrique ou moléculaire.

Les discordances sont reprises dans le tableau 19.

**Tableau 19 : Patients présentant une MRD positive en BM et négative en CMF**

Patient	Point de suivi	LAIP en CMF	Valeur MRD-CMF (%)	Expression moelles témoins (%) (MOY ± 2ECT)	Conclusion CMF	Marqueur positif en BM	Valeur MRD-BM (%)	Conclusion en BM*	Rechute
<b>3</b>	MRD4	CD34+ CD117+ HLADRpartiel CD33+	< 0,2	0,2	Négatif < 2.10 <sup>-3</sup>	WT1	(MO) : 6,89 (Sg) : 0,452	> seuil de positivité : sang et moelle	Oui
	MRD1 (post rechute 1)	CD34partiel CD117+ HLADR-CD56+faible CD13+faible	0,003	0,001 +/- 0,002	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(MO) : 3,64 (Sg) : 0,458	> seuil de positivité : sang et moelle	Oui
						NPM1	(MO) : 5,21 (Sg) : 1,36	> seuil de sensibilité : sang et moelle	
	MRD4 (post rechute 2)	CD34partiel CD117+ HLADR-CD56+faible CD13-	0,01	0,004 +/- 0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(MO) : 5,86 (Sg) : 0,588	> seuil de positivité : sang et moelle	Non
NPM1						(MO) : 0,016 (Sg) : < 0,01	> seuil de sensibilité : moelle		
<b>10</b>	MRD1	CD34+++ CD117+ HLADRdim CD33+ CD13+++ CD38+	0,006	0,003 +/- 0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	CBFB-MYH11 (A) (valeur en % /plasmide)  Valeur du transcrit au diagnostic = 85,5%/plasmide	(MO) : 0,077	> seuil de sensibilité	Oui
	MRD2		0,002		Négatif < 10 <sup>-3</sup>		(MO) : 0,064 (Sg) : 0,228	> seuil de sensibilité : sang et moelle	
	MRD3		0,037**		Négatif < 10 <sup>-3</sup>		(MO) : 0,037	> seuil de sensibilité	
	MRD4		0,003		Négatif < 10 <sup>-3</sup>		(MO) : 0,05 (Sg) : 0,05	> seuil de sensibilité : sang et moelle	
	MRD 1 (post rechute)	HLADRdim CD34+ CD117+	0,003	0,02 +/- 0,05	Négatif < 10 <sup>-3</sup>		(MO) : 0,395	> seuil de sensibilité	
<b>12</b>	MRD3	HLADR- CD34- CD13dim CD117+	0,03	0,03 +/- 0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,133 (MO) : 1,38	> seuil de positivité : sang	Non
<b>13</b>	MRD1	CD34+ CD117+ HLADRdim CD7±	0,03	0,01 +/- 0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,267 (MO) : 0,407	> seuil de positivité : sang	Non
<b>14</b>	MRD autre	CD34+ CD117+ CD38dim CD33fort	0,04	0,04 +/- 0,06	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,185 (MO) : 0,592	> seuil de positivité : sang	Non
<b>15</b>	MRD3	HLADR+ CD34+ CD33++ CD13+faible CD117+ CD38+	0,09**	0,03 +/- 0,05	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(MO) : 2,07 (Sg) : 0,565	> seuil de positivité : sang et moelle	Oui
<b>16</b>	MRD1	CD34+ CD117+ HLADR-CD13partiel CD38dim	< 0,01	0,004 +/- 0,06	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,443 (MO) : 0,661	> seuil de positivité : sang	Non
<b>19</b>	MRD2	HLADRpartiel CD33++ CD36partiel	0,07	0,03 +/- 0,05	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,105 (MO) : 1,04	> seuil de positivité : sang	Non
<b>33</b>	MRD1	HLADRdim CD34+/CD117+	< 0,1	Non réalisé car panel de diagnostic différent	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	WT1	(Sg) : 0,153 (MO) : 0,240	> seuil de positivité : sang	Non

\*Une MRD est considérée comme positive si elle supérieure au seuil de sensibilité : 10<sup>-5</sup> pour le transcrit de fusion CBFB-MYH11 et 10<sup>-4</sup> pour les mutations de NPM1. Pour WT1, elle est rendue positive pour un seuil > 2% dans la moelle (MO) et > 0,1% dans le sang (Sg). NPM1 et WT1 sont rendues en %/100 copies d'ABL

\*\*Les valeurs en rouge correspondent aux MRD qui auraient été rendues positives si la limite de positivité était fixée par rapport à l'expression du LAIP dans les moelles de référence

Les prélèvements dont les cases sont grisées correspondent aux discordances médullaires ; en blanc : la MRD-LAM BM n'est positive que dans le sang

## Étude des discordances :

### - Patient 3

Il s'agit d'un patiente atteinte de LAM myélomonocytaire avec présence au diagnostic d'une surexpression de *WT1* et mutation *NPM1* de type A, permettant un suivi de la MRD en biologie moléculaire. Pour l'analyse en CMF, le panel d'anticorps utilisé au diagnostic en 2016 est différent de celui actuellement utilisé dans le cadre du suivi de la MRD-LAM, ne permettant pas des conditions d'analyse optimale.

Le LAIP étudié en CMF (CD34+ CD117+ CD33+ HLA-DR partiel) en MRD4 est peu robuste, car exprimé à un taux de 0.2% dans un pool de moelles de références, ce qui ne nous permet pas d'atteindre un niveau de sensibilité suffisant pour l'étude de la MRD (seuil recommandé < 0.1%). Par ailleurs, l'acquisition a été réalisée sur seulement 137 000 évènements CD45+, ce qui peut induire une perte de sensibilité de la technique à l'origine d'un éventuel résultat faussement négatif.

Lors d'une première rechute en 2018, l'analyse en CMF montre l'émergence d'un profil phénotypique non détecté au diagnostic et sur les différents points de suivi CD34 partiel CD117+ HLA-DR- CD13+ faible avec expression aberrante du CD56 (expression faible). La proportion de ce nouveau LAIP dans le pool de moelles de référence est très faible inférieure à 0,01%, attestant d'une meilleure robustesse du LAIP étudié. La MRD1 post rechute montre néanmoins une nouvelle discordance BM (*WT1/NPM1*) et CMF, avec une acquisition non optimale réalisée sur 238 000 évènements malgré une bonne pureté médullaire.

Après une seconde rechute, La MRD1 post rechute montre de nouveau une discordance BM/CMF malgré une pureté correcte du prélèvement et des conditions d'acquisition optimale (> 500 000 évènements).

### - Patient 10

Pour ce patient atteint de LAM4 (variant éosinophile) avec *inv(16)(p13q22)* et transcrite de fusion *CBFB-MYH11* de type A, le suivi de la maladie résiduelle montre une discordance CMF/BM pour l'ensemble des prélèvements (MRD1 à MRD4 et MRD1 post rechute) avec un résultat de MRD-LAM positif en BM (transcrit de fusion *CBFB-MYH11*) et indétectable en CMF. Les conditions préanalytiques pour l'analyse

en CMF étaient correctes : LAIP robuste (expression < 0,01% dans le pool de moelles de référence), bonne pureté médullaire des prélèvements et acquisition réalisée sur un nombre d'évènements CD45+ suffisant. L'analyse phénotypique des blastes au moment de la rechute montre un profil similaire à celui au diagnostic avec néanmoins quelques variations d'intensité d'expression de certains marqueurs (CD34, CD13, HLA-DR).

- Patient 12

Pour ce patient atteint de LAM1, les deux premiers points de suivi, MRD1 et MRD2 sont concordants entre la CMF (LAIP étudié CD34- HLADR- CD117+) et la BM (surexpression *WT1*) avec une MRD indétectable pour les deux techniques.

En revanche pour le point de MRD3, qui correspond chez ce patient au bilan pré-allogreffe, le résultat de MRD est positif en BM uniquement dans le sang, à un taux faible (positivité du marqueur *WT1* : 0,133% pour un seuil de positivité à 0,1%). L'analyse en CMF a été réalisée dans des conditions optimales (pureté médullaire/nombre d'évènements acquis). Le patient est actuellement en rémission.

- Patient 13

Pour ce patient atteint de LAM1 avec t(11;19), del(12p), transcrit de fusion *KMT2A-ELL* et surexpression *WT1*, une discordance est observée entre les deux techniques sur le point de suivi MRD1 avec une MRD positive en BM uniquement sur le sang (surexpression *WT1*) et négative en CMF (LAIP étudié : CD34+ CD117+ HLA-DR faible). L'analyse en CMF a été réalisée dans des conditions optimales. Les points de suivi MRD2 à MRD4 sont concordants entre les deux techniques avec une MRD indétectable. Le patient a été allogreffé et au terme de plus de deux ans de suivi n'a à ce jour pas rechuté.

- Patient 14

Ce patient atteint de SMD-EB-2 ayant acutisé en LAM a bénéficié d'une allogreffe de moelle osseuse avec suivi post-allogreffe de la MRD-LAM en BM (surexpression de *WT1*) et en CMF (LAIP étudié : CD34+ CD117+ CD33++ CD38dim). Une discordance est observée sur un point de suivi réalisé à distance : MRD positive en

BM uniquement sur le sang (positivité du marqueur *WT1* : 0,185% pour un seuil de positivité à 0,1) associée à un résultat de MRD indétectable en CMF sur moelle. L'analyse en CMF a été réalisée dans des conditions optimales (pureté médullaire/nombre d'évènements acquis). Cette discordance n'a pas été retrouvée sur le point suivi réalisé trois mois après. Le patient est à ce jour toujours suivi et n'a pas rechuté.

- Patient 15

Pour cette patiente atteinte de LAM4, le point de suivi MRD3 réalisé lors du bilan pré allogreffe montre une discordance BM/CMF. La MRD est positive en BM (surexpression *WT1* à 2,07% dans la moelle et 0,563% dans le sang). En CMF, l'analyse du LAIP CD34+ CD117+ CD33++ CD13dim conduit à une MRD3 détectable mais à un taux de 0,09%, inférieure au seuil de 0,1% de la technique. L'analyse en CMF a été réalisée dans des conditions optimales (pureté médullaire/nombre d'évènements acquis). La patiente a bénéficié d'une allogreffe de moelle osseuse puis a rechuté ultérieurement. L'analyse phénotypique des blastes à la rechute montre un léger glissement phénotypique avec une diminution d'expression du CD13. La réanalyse à posteriori des blastes du point de MRD3, avec le nouveau masque d'analyse ciblé sur la population blastique à la rechute, conduit à une MRD légèrement positive en CMF (taux 0,12%) (figure 65). Les points de suivi réalisés ensuite n'ont pas montré d'autre discordance, le patient a bénéficié d'une seconde allogreffe et est actuellement en rémission.

- Patient 16

Pour cette patiente atteinte de LAM1 avec surexpression *WT1* et mutation *IDH2*, le point de suivi MRD1 montre une discordance entre les deux techniques avec une MRD positive en BM (uniquement dans le sang) à 0,443% et une MRD indétectable en CMF (LAIP étudié CD34+ CD117+ HLA-DR- CD33 fort CD13dim) dans des conditions d'analyse optimales (pureté médullaire, nombre d'évènements acquis).

Les points de suivi ultérieurs n'ont pas été évalués simultanément par les deux techniques. La patiente a bénéficié d'une allogreffe et est actuellement toujours en rémission.

- Patient 19

Chez cette patiente atteinte de LAM à composante monocytaire avec surexpression de *WT1* et mutation *NPM1* de type B, une discordance entre les deux techniques est observée sur le point MRD2. La MRD est uniquement positive en BM sur le sang et seulement pour le marqueur *WT1* à un taux de 0,105% pour un seuil de positivité à 0,1%. En CMF (LAIP étudié HLA-DR partiel CD33 fort CD36 partiel), la MRD reste indétectable, dans des conditions d'analyse optimales (pureté médullaire, nombre d'évènements acquis > 1 000 000). Le point de MRD suivant n'a pas montré de discordance, le patient est actuellement en rémission.

- Patient 33

Chez cette patiente atteinte de LAM 2 avec surexpression de *WT1*, Le point de suivi MRD1 montre une discordance entre les deux techniques avec une MRD positive en BM, uniquement dans le sang (surexpression *WT1* à 0,153%) et un résultat de MRD indétectable en CMF (LAIP étudié CD34+ CD117+ HLA-DR- CD7+). L'analyse en CMF n'a pas été réalisée dans des conditions d'analyse optimales (nombre d'évènements CD45+ acquis < 400 000) Les points de suivi MRD2 à MRD4 sont concordants entre les deux techniques avec une MRD indétectable. Le patient est à ce jour toujours en rémission.

Deux exemples illustrant la cinétique de la MRD-LAM en CMF sont présentés et figures 65 et 66 et sont comparés aux taux de MRD en BM :

- Patient 15 (détaillé ci-dessus)
- Patient 13 : MRD négative que ce soit en CMF ou en BM

*Sont encadrées en rouge, les résultats de MRD positives et en vert, les MRD négatives (CMF et BM) et en mauve l'expression physiologique du LAIP dans le pool de moelles témoins.*

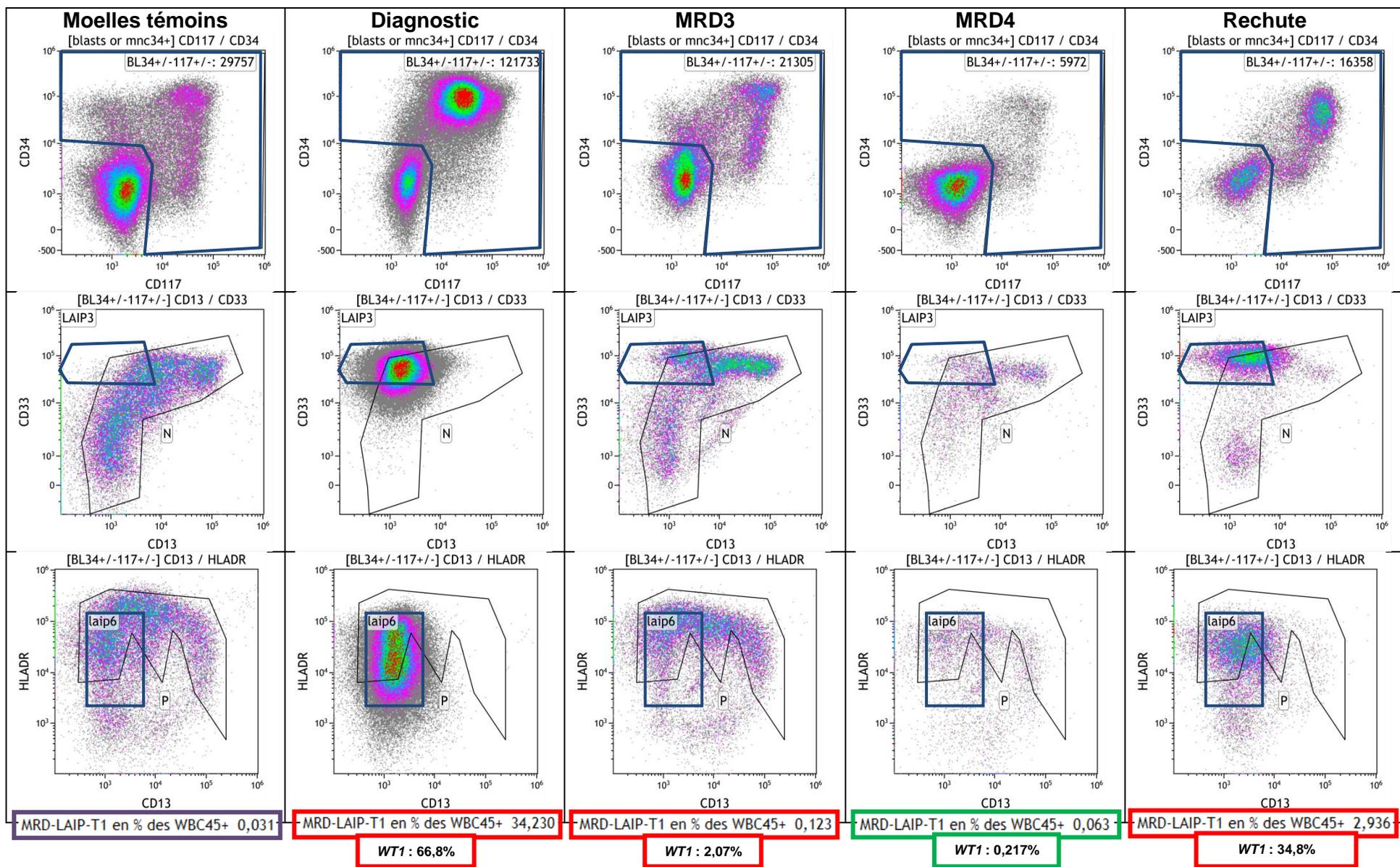


Figure 65 : Cinétique de la MRD-LAM-CMF du patient 15

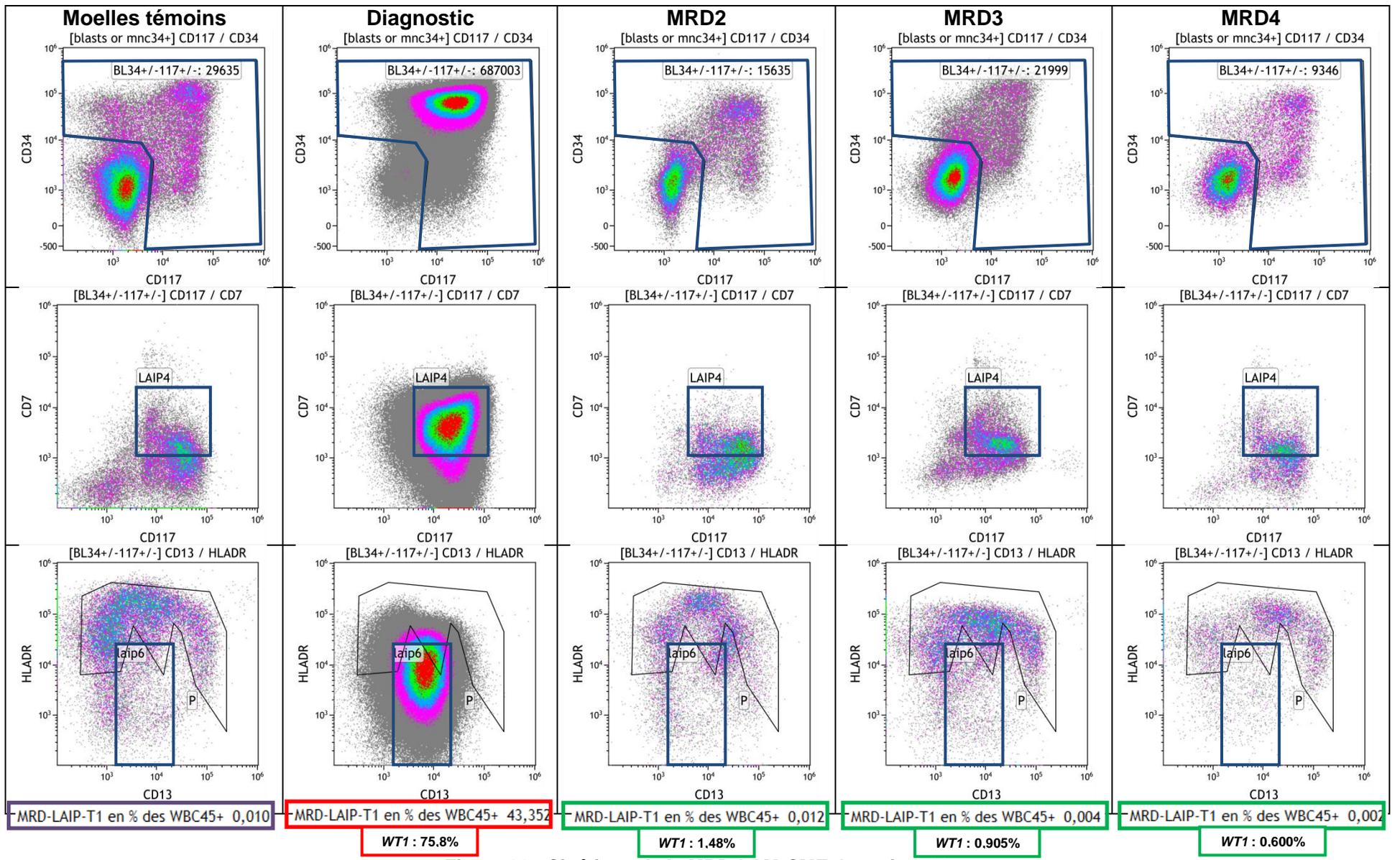


Figure 66 : Cinétique de la MRD-LAM-CMF du patient 13

## 6- Résultats de MRD-LAM sur FlowSOM

### 6.1- Sélection des échantillons

Nous avons souhaité tester l'approche FlowSOM pour le suivi de MRD-LAM de quatre patients de cette étude : les patients 10, 15, 21 et 35 ont été sélectionnés. Le choix de ces patients s'est basé sur le souhait de disposer à la fois de résultats de MRD-LAM positifs (positivité franche ou proche du seuil de sensibilité de 0,1%), négatifs ou discordants avec les résultats obtenus en biologie moléculaire.

Au total, 10 prélèvements de suivi de MRD-LAM ont été testés selon l'approche FlowSOM.

### 6.2- Comparaison des résultats selon les deux approches : conventionnelle et FlowSOM

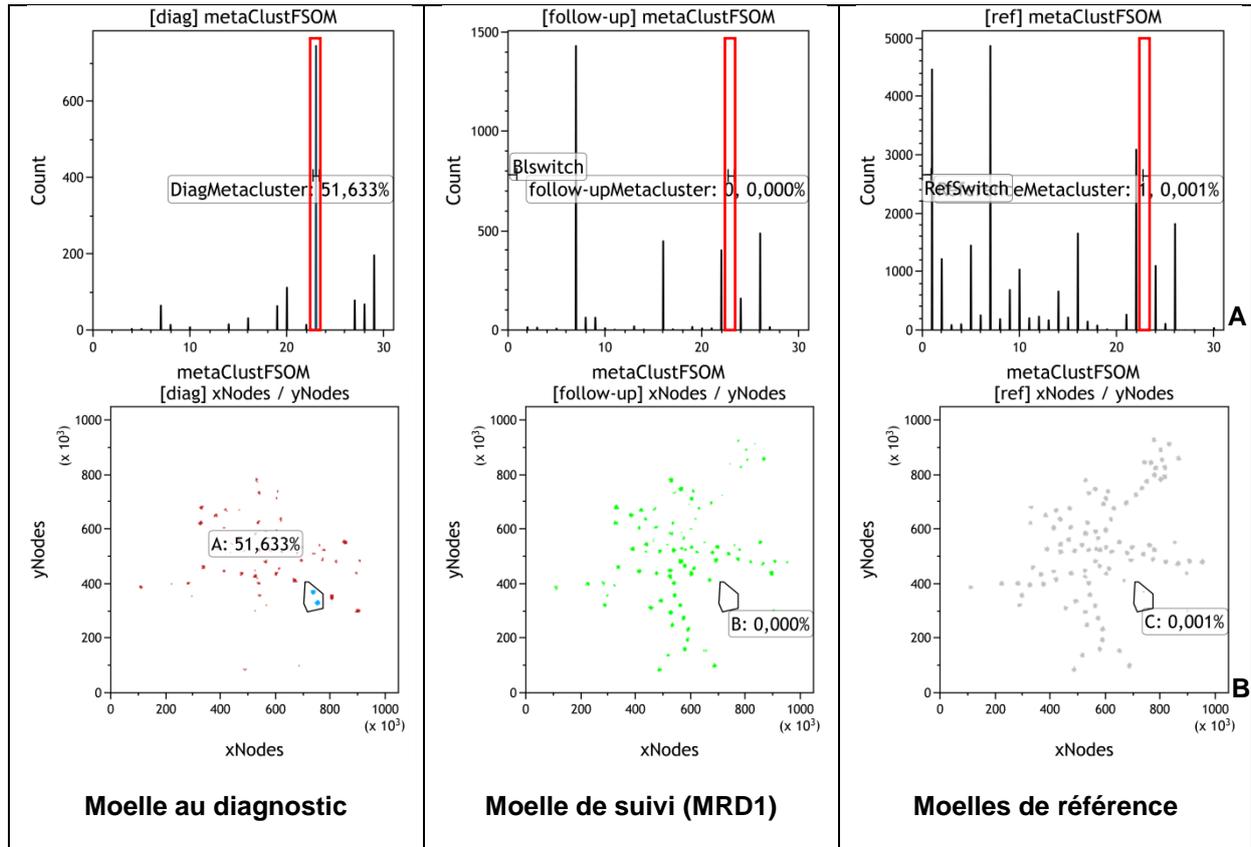
Pour les patients analysés selon l'approche FlowSOM, nous avons comparé les résultats obtenus avec ceux rendus par l'analyse conventionnelle : tableau 20.

**Tableau 20** : Évaluation de la MRD-LAM par l'approche FlowSOM et comparaison avec l'approche conventionnelle

Patient	Point de suivi	MRD (%)		Interprétation finale		Concordance (Oui/Non)
		Approche conventionnelle	Approche FlowSOM	Approche conventionnelle	Approche FlowSOM	
10	MRD1	< 0,01	< 0,01	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif	Oui
15	Rechute	2,94	1,73	Positif	Positif	Oui
	MRD2	0,14	< 0,10	Positif	Négatif	Non
21	MRD1	3,25	3,30	Positif	Positif	Oui
	MRD2	0,40	0,60	Positif	Positif	Oui
	MRD3	0,02	0,03	Négatif < 10 <sup>-3</sup>	Négatif	Oui
35	Echec	5,6	5,7	Positif	Positif	Oui
	MRD1	0,6	0,61	Positif	Positif	Oui
	MRD2	0,6	0,57	Positif	Positif	Oui
	MRD3	0,27	0,38	Positif	Positif	Oui

Trois exemples sont présentés en figures 67 à 69.

- Patient 10

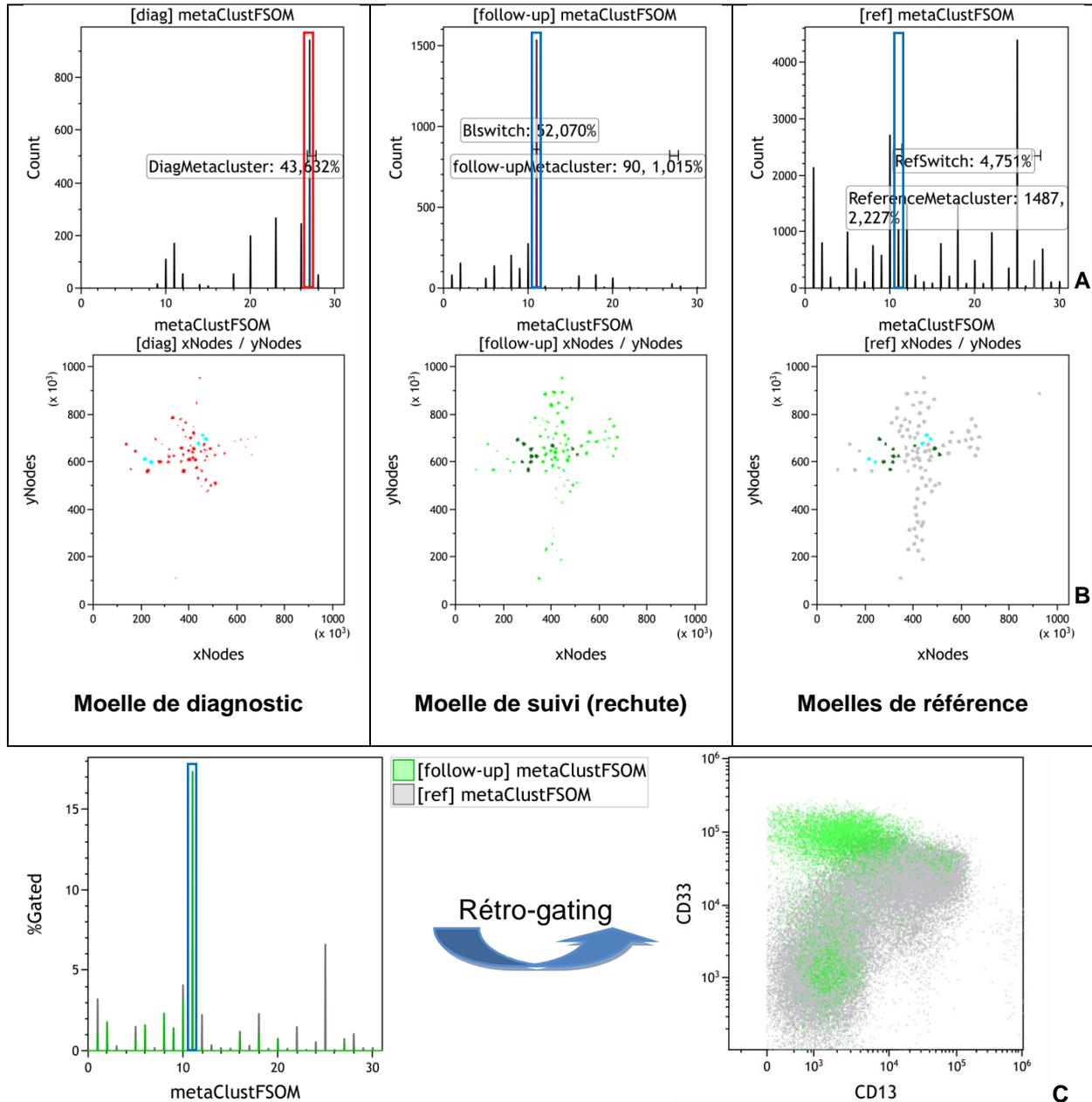


**Figure 67 : Résultat d'une MRD négative par l'approche FlowSOM (patient 10)**

**A :** Au diagnostic, ce patient présente un métacluster majoritaire en position 23 (encadré en rouge) représentant 52% des blasts. Cette sous-population n'est pas retrouvée au sein des blasts de la moelle de suivi et elle est très faiblement représentée dans les moelles de référence (0,001%)

**B :** Expression des résultats sous forme d'arborescence. L'anomalie de répartition au diagnostic témoigne du processus leucémique. Sur la moelle de suivi (MRD1), la répartition des nœuds est sensiblement équivalente à celle observée sur les moelles de référence, témoin d'une hématopoïèse normale (MRD < 0.01%)

- Patient 15



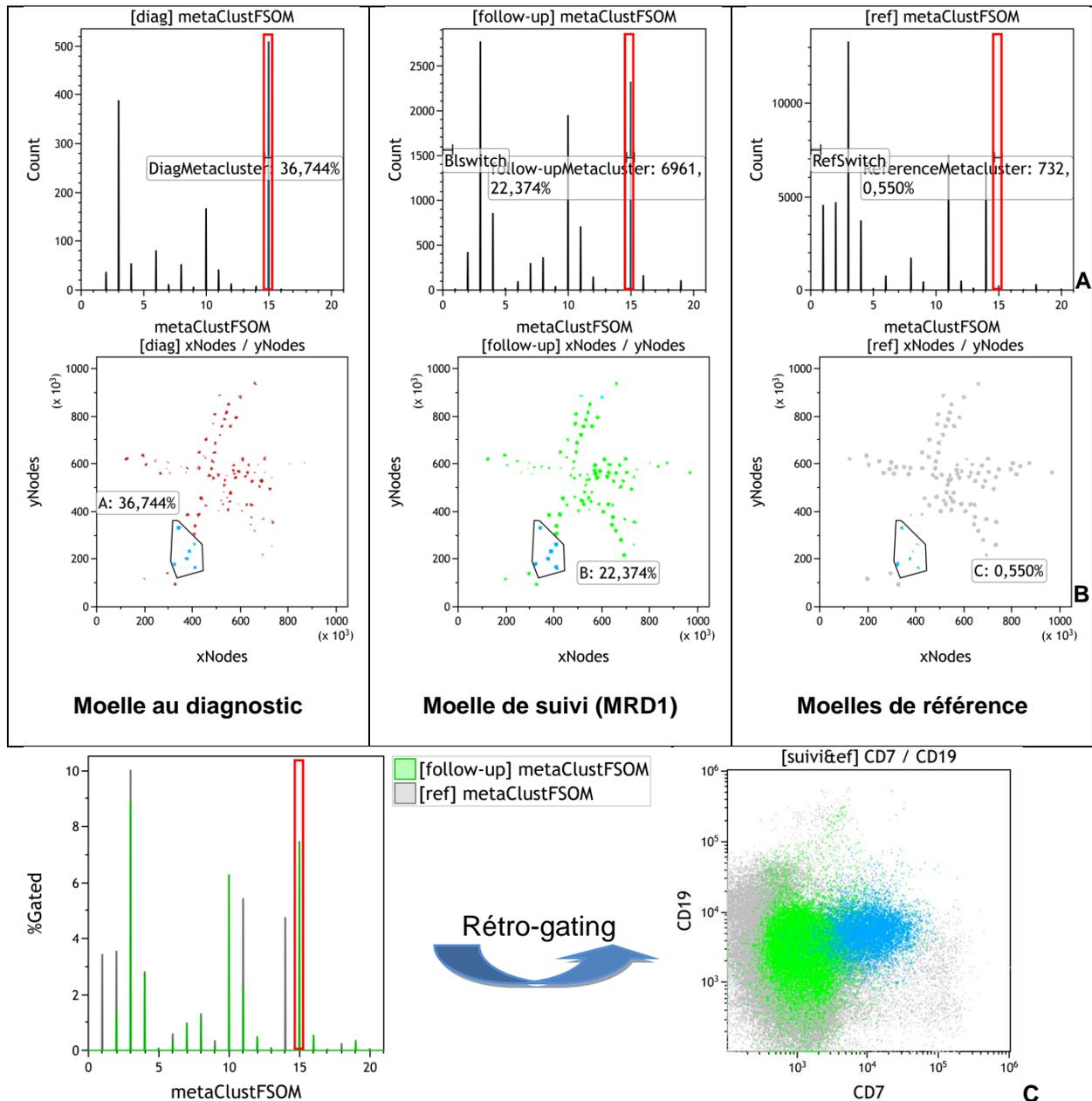
**Figure 68** : Résultat d'une MRD positive (rechute) (patient 15) par l'approche DfN (switch phénotypique) ; approche FlowSOM

**A** : Au diagnostic, ce patient présente un metacluster majoritaire en position 27 (encadré en rouge) représentant 44% des blastes étudiés. Ce metacluster représente 1% des blastes sur la moelle de suivi mais également 2.2% des blastes des moelles de référence. La faible représentativité de ce cluster dans la moelle de suivi par rapport à la moelle de référence est insuffisante pour conclure à une MRD positive. En revanche, le metacluster n°11 (encadré en bleu), présent en proportion non significative au diagnostic, est majoritaire sur la moelle de suivi et représente 52% des blastes étudiés, contre 4,8% dans les moelles de référence, soit une MRD-LAM positive estimée à 1,7%

**B** : Représentation en arborescence : anomalie de répartition des métaclusters au diagnostic et en suivi : les blastes au diagnostic sont colorés en turquoise, ceux à la rechute en vert foncé, ces métaclusters respectifs sont présents dans les moelles de référence à un plus faible taux

**C** : Sur l'histogramme bi-paramétrique CD13 CD33 nous visualisons cette population au suivi (en vert) CD33fort CD13faible, peu présente dans les moelles de référence (en gris). Cette population correspond à la population de blastes à la rechute

- Patient 21



**Figure 69** : Résultat d'une MRD positive (MRD1) par l'approche FlowSOM (patient 21)

**A** : Au diagnostic, le metacluster n°15 est majoritaire, représentant 37% des blastes de la moelle. Ce métacluster représente 22% des blastes au suivi (MRD1) et 0.55% des blastes dans les moelles de référence. La surreprésentation dans la moelle de suivi par rapport à la moelle de référence du metacluster n°15 nous permet donc de conclure à une MRD positive.

**B** : Expression des résultats sous forme d'arborescence : on retrouve le metacluster n°15 majoritaire au diagnostic, en proportion significative sur la moelle de suivi (population en bleue)

**C** : Sur l'histogramme bi-paramétrique CD7 CD19 nous visualisons cette population au suivi (en bleu) CD7+, elle se détache très nettement des moelles de référence en gris

Cette étude de faisabilité, réalisée sur un petit nombre d'échantillons montre des résultats encourageants avec une bonne corrélation entre les deux approches « conventionnelle » et « non-supervisée » (Flow-SOM). Sur les 10 échantillons analysés, 9 présentent des résultats concordants entre les deux approches, que ce soit en termes d'analyse quantitative (taux de MRD en %) que pour l'interprétation finale (résultat de MRD positif ou négatif).

Une discordance est observée sur le point de MRD2 du patient 15, avec des taux respectivement à la limite supérieure du seuil de significativité (approche conventionnelle) et à un taux indétectable via l'approche Flow-SOM. La MRD-LAM en CMF est positive ainsi qu'en BM (*WT1* dans le sang à 0,236%). Le point de suivi ultérieur (MRD3) est négatif en MRD CMF et BM, la patiente a ensuite été allogreffée, elle est actuellement en rémission.

## V- Discussion

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies clonales très hétérogènes, au pronostic péjoratif, touchant principalement le sujet âgé. Si la majorité des patients traités obtiennent une rémission cytologique complète, beaucoup d'entre eux rechuteront. Les techniques cytologiques ne sont ni sensibles, ni spécifiques pour détecter la présence de clones leucémiques minoritaires résistants à la chimiothérapie et potentiellement responsables de rechutes ultérieures. Les recommandations de l'ELN prennent ainsi désormais en compte l'évaluation de la MRD dans l'évaluation de la réponse thérapeutique des LAM. Parmi les techniques d'évaluation de la MRD-LAM, la cytométrie en flux occupe une place de choix dans le suivi thérapeutique des patients, en complément des techniques moléculaires.

Le premier volet de notre travail a consisté à mettre en place un protocole standardisé d'évaluation de la MRD-LAM en CMF selon l'approche LAIP/DfN-LSC de l'Intergroupe française des LAM (ALFA). Une harmonisation préanalytique a été réalisée avec en premier lieu la mise « en miroir » des réglages des cytomètres entre le CHU de Lille et le CHV. Le choix de cibles de MFI communes pour le passage de billes de calibration FlowSet® nous permet d'obtenir des profils de fluorescence d'anticorps comparables entre les deux centres. De plus, la participation bi-annuelle à des contrôles externes de qualité mis en place par le groupe ALFA nous permet de valider ces réglages dans le temps (97). Sur le dernier programme de juillet 2020 (en attente de rapport de résultats), une bonne corrélation a été observée en termes d'intensités de fluorescence entre le CHU de Lille et le CHV sur les différents tubes testés. Ce travail confirme ainsi les résultats obtenus au sein du groupe ALFA entre des plateformes de cytométrie différentes et des cytomètres différents (97,114). Les résultats de Plesa et Roumier avaient déjà permis d'obtenir des profils de fluorescence des anticorps comparables entre échantillons passés sur automate Canto® de la société BD® et Navios® de la société BC® (97). Ces résultats confirment la stratégie de standardisation des réglages mise en place au sein du groupe.

Le travail de standardisation préanalytique a concerné également le choix du protocole de lyse utilisé pour la détection d'évènements rares. Une lyse macrovolume (*Bulk Lyse*), non agressive, est recommandée. Les profils de

fluorescence obtenus avec les tampons de lyse NH<sub>4</sub>Cl et la Versalyse® de chez Beckman Coulter sont équivalents. L'utilisation de l'Optilyse® formulée à partir de formaldéhyde n'a pas été validée dans le cadre de la MRD-LAM. Il s'agit d'une lyse fixante qui modifie les épitopes à la surface cellulaire, en particulier les épitopes myéloïdes plus sensibles à la dénaturation. De plus elle induit une détérioration de la membrane responsable d'une lyse cellulaire et semble donc moins adaptée à la détection d'évènements rares (122). Afin de répondre plus facilement aux exigences qualités de la norme NF15189, le laboratoire du CHV a choisi de travailler avec la lyse commerciale plutôt que la lyse maison NH<sub>4</sub>Cl.

Le panel utilisé pour l'évaluation de la MRD-LAM est celui proposé par l'intergroupe ALFA, il est en accord avec les recommandations établies par l'ELN (87). Le choix du CHV s'est porté en priorité sur les tubes Duraclones® (Mix d'anticorps lyophilisés commercialisé par BC®) pour plusieurs raisons : gain de temps pour le technicien, suppression du risque d'oubli d'anticorps dans les tubes, recrutement insuffisant pour préparer des mix d'anticorps liquides « maison ». Nous avons montré qu'il n'y a avait pas de différence entre les anticorps sous forme lyophilisée et les anticorps liquides utilisés par le CHU de Lille, sous réserve qu'il s'agisse du même clone d'anticorps testé. Lorsque les clones utilisés sont différents, nous avons mis en évidence des différences de MFI significatives entre les anticorps dirigés contre les marqueurs CD90 et CD117 commercialisés par la société BD® (anticorps liquides utilisés par le CHU de Lille) et ceux présents dans les Duraclones BC®. Pour le CD38, les différences sont plus modérées mais le choix de l'anticorps utilisé est fondamental pour l'évaluation de la MRD selon l'approche LSC. Dans un souci de standardisation inter-sites, nous nous sommes harmonisés avec le CHU de Lille pour ces anticorps. Nous avons donc fait le choix d'ajouter extemporanément aux tubes Duraclones® 1 et 3 les anticorps CD38-PC7 et CD117-BV421 de la société BD®. Les Duraclones 1 et 3 seront ainsi conçus de façon à ne pas contenir d'anticorps pour les canaux concernés (absence d'anticorps marqués en PC7 et PB pour le tube 1 et absence d'anticorps marqué en PB pour le tube 3).

Pour le tube 2 (LSC), le choix de travailler avec des Duraclones® perd de son intérêt en raison du grand nombre de références d'anticorps liquides (CD97, TIM-3, CLL-1 CD38, CD90 et CD117) à ajouter extemporanément dans le Mix lyophilisé. Pour ces anticorps le choix initial consiste donc à privilégier les anticorps liquides aux tubes Duraclones®. Néanmoins, des tests complémentaires devraient nous permettre

d'utiliser le tube Lyotube® 8 couleurs de chez BD, déjà validé au sein du groupe ALFA dans lequel nous aurons la possibilité de rajouter le CD36-AA700. Le Mix (TIM-3 + CLL-1 + CD97) sera par ailleurs ajouté manuellement au Lyotube®.

Dans la stratégie DfN, la détermination des seuils P6/P7/P8 est un prérequis indispensable à l'identification et la quantification précise des LSC. Le seuil P6 correspondant au seuil de négativité du CD38 a été obtenu par l'approche FMO (*Fluorescence Minus One*) afin de tenir compte du marquage cellulaire non spécifique et des éventuels shifts de fluorescence. Le passage ponctuel de moelles « normales » nous permet de vérifier la robustesse des seuils mis en place initialement en utilisant des populations contrôles (hématogones et plasmocytes en particulier). A noter que d'autres approches telles que la technologie des *spherotech beads* peuvent être également utilisées pour la détermination du seuil P6, avec des résultats intéressants, comme présenté dans l'étude de Hanekamp *et al* (123).

L'harmonisation sur le plan analytique inclut également un protocole d'acquisition commun avec une acquisition recommandée sur minimum 500 000 à 1 000 000 d'évènements CD45+ et le choix d'un protocole d'analyse standardisé intégrant un traitement préanalytique des données (élimination des débris, doublets, artéfacts d'acquisition, réglage des compensations), et un « masque » de réanalyse commun incluant un fenêtrage des populations d'intérêt et des booléennes d'identification et de quantification des LAIP et des LSC. La stratégie d'analyse consiste ensuite à appliquer sur la moelle de suivi le masque d'analyse obtenu au diagnostic de LAM, dans le cadre de l'évaluation de la MRD. Le masque est ensuite appliqué à un pool de moelles de référence afin de déterminer l'expression physiologique du profil phénotypique étudié.

Le choix des moelles témoins est primordial pour l'interprétation finale de la MRD-LAM car il permet d'évaluer la spécificité du LAIP étudié et d'estimer la limite de détection de la technique (LOD technique). Actuellement, il n'y a pas de consensus quant à la sélection des moelles de référence. Il est cependant admis qu'il est nécessaire de disposer d'un panel représentatif de moelles témoins incluant des moelles dites « normales » et des moelles de « régénération », la fréquence des LAIP pouvant différer entre un pool de moelles « normales » et un pool de moelles de « régénération » (124,125). Les moelles de régénération peuvent notamment être obtenues à partir d'échantillons de patients atteints de LAL en rémission, sur des

moelles de LNH en rémission après greffe autologue de CSH, sur des moelles de myélome multiple MRD négative et autres moelles de régénération.

Dans ce travail, nous avons sélectionné 10 moelles de référence : 5 moelles « normales » incluant des suspicions de pathologies hématologiques non avérées et 5 moelles « de régénération » obtenues dans le cadre du soin (fonds de tube), incluant des thrombopénies réactionnelles et des pathologies hématologiques en rémission (myélome multiple, LAL post induction MRD négative)

L'un des enjeux futurs consisterait à harmoniser la constitution de ces pools de moelles de référence. Pour les moelles dites « normales », il est préconisé d'utiliser des échantillons de moelle osseuse apparié par âge, provenant de donneurs sains ou prélevés chez des patients présentant des maladies non hématologiques. Pour les moelles dites « de régénération », une harmonisation semble être plus délicate.

Le second volet de notre travail a consisté à évaluer les performances du protocole mis en place en termes de sensibilité, spécificité, comparaison des résultats inter-sites et comparaison des résultats obtenus en CMF et en BM.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux résultats obtenues via l'approche LAIP/DfN. Les seuils de sensibilité généralement proposés pour l'évaluation de la MRD-LAM en cytométrie en flux sont de l'ordre de  $10^{-3}$  (82,87,126). La sensibilité de l'analyse correspondant en théorie à la valeur la moins sensible entre la LOD de l'échantillon basée sur le nombre d'évènements CD45+ acquis et le nombre de blastes étudiés et la valeur physiologique observée pour le profil étudié sur des moelles de référence (LOD technique).

Un minimum de 20 à 50 évènements est nécessaire pour définir un cluster, avec contrôle de clusterisation par « *backgating* » sur les histogrammes FS/SS et CD45/SS (126).

Les épreuves de dilutions permettent de valider pour le LAIP étudié le seuil de  $10^{-3}$ . Pour atteindre ce seuil de sensibilité une acquisition sur 500 000 évènements est recommandée. La sensibilité de la technique étant dans ce cas limitée par l'expression physiologique du LAIP au sein des moelles de référence.

L'expression physiologique varie selon le type de LAIP étudié. Dans notre travail, nous observons des variations de fréquence allant d'un taux  $< 0.01\%$  à  $> 0.1\%$  des leucocytes CD45+, les LAIP les plus sensibles correspondant aux LAIP avec

infidélité de lignée (CD7, CD19). Il convient d'être prudent à l'égard de l'expression du CD56 notamment en situation de régénération où celui-ci peut être exprimé de manière plus importante (125) d'où l'intérêt de tester le LAIP étudié sur le pool de moelles de référence incluant des moelles « de régénération ». En 2019, Rossi *et al.* suggèrent ainsi de définir des catégories de LAIP « fort », « bon » et « faible » sur la base de leur fréquence dans le pool de moelles de référence. Les LAIP les plus sensibles (taux inférieur ou égal à 0.01% ( $10^{-4}$ ) ayant été identifié le plus souvent en présence de marqueur aberrant (CD7, CD19, CD2, CD4, CD56) (124). En revanche, les co-expressions CD33+CD4+ ou CD33+CD56+, présentent à une fréquence élevée dans les moelles de régénération, ne permettent pas à elles seules de définir un bon LAIP (125).

En fixant le seuil de positivité de la MRD-LAM-LAIP à 0,1%, 88% des patients de notre étude (30 sur 34) ont pu bénéficier d'un suivi en CMF selon l'approche LAIP. Ce pourcentage est cohérent avec les données de la littérature qui estiment entre 80 et 100% le pourcentage de LAM présentant un LAIP au diagnostic (84,93,94,111). A noter également que la capacité à mettre en évidence le ou les LAIP au diagnostic est dépendante de l'expérience de l'opérateur (94). Cette approche nécessite donc un apprentissage approfondi et doit être réservée aux centres expérimentés conformément aux recommandations de l'ELN (87). Parmi les patients pour lesquels nous n'avons pas identifié de LAIP robuste, trois correspondaient à des LA à composante monocytaire (LAM4 ou LAM5). Ces résultats confirment la difficulté à mettre en évidence un LAIP robuste dans les LAM à composante monocytaire souvent CD34-/CD117-. L'ajout d'un troisième tube composé essentiellement de marqueurs monocytaires, est dès lors utile, afin notamment de rechercher des asynchronismes ou pertes d'expression (87). Dans notre étude l'ajout de ce 3<sup>ème</sup> tube a permis un suivi LAIP pour 2 patients.

Dans ce travail, la comparaison des résultats entre le CHU de Lille et le CHV montrent de très bons résultats et valident la stratégie d'harmonisation inter-sites à la fois en terme de réglages, de protocole technique et de stratégie de réanalyse. Ces résultats ont pu être obtenus grâce au travail de formation, à l'élaboration d'un masque de réanalyse commun, à l'échange de fichiers LMD pour l'entraînement et à la participation active aux réunions de travail au sein du groupe ALFA pour acquérir l'expertise et limiter les différences inter-sites avec les centres experts.

Les différences observées sont minimales et semblent plus liées à des contraintes préanalytiques (délai de réalisation 24 à 72h après le prélèvement, cellularité et quantité de l'échantillon ne permettant pas une acquisition optimale sur les deux sites). En effet, pour la majorité des échantillons, l'analyse technique a été réalisée au CHU de Lille, l'analyse au CHV ayant été réalisée sur les « fonds de tube » 24h après le passage sur le cytomètre du CHU de Lille. Concernant la stabilité préanalytique, ces résultats permettent de valider une conservation du prélèvement à température ambiante contrôlée jusqu'à trois jours, comme précisé par l'ELN (87). Pour les conditions d'acquisition, le seuil optimal de 500 000 événements CD45+ acquis n'a le plus souvent pas été atteint au CHV (tableau 15). Si cela ne semble pas avoir eu d'impact sur l'interprétation finale de l'analyse (absence de discordance avec le CHU de Lille), ce point devra être amélioré, le nombre d'événements acquis conditionnant la sensibilité de la technique. En effet, si une LOD de 0.1% (seuil  $10^{-3}$ ) calculée pour un minimum de 50 événements peut être obtenue avec une acquisition de 100 000 leucocytes, une acquisition sur 1 000 000 événements permettrait d'améliorer la sensibilité de la technique en présence d'un bon LAIP.

En cas de résultat MRD négatif inférieur à  $10^{-3}$  en CMF, les recommandations du groupe ALFA indiquent de préciser si une population est détectable au seuil de sensibilité de la technique (valeur la moins sensible entre le seuil technique et la valeur « physiologique » observée pour le profil LAIP étudié sur les moelles de référence). Ces recommandations ne distinguent pas le seuil de LOD (limite de détection) du seuil de LOQ (limite de quantification). Plusieurs études se sont intéressées au seuil pertinent pour définir la LOD (127,128) et différencier ces deux paramètres. Ainsi, en définissant une LOD plus basse, calculée pour 20 événements détectés (128) et une LOQ calculée pour 50 événements détectés, une nouvelle catégorie de rendu de résultat pourrait être définie : MRD détectée mais non quantifiée qui pourrait être interprétée notamment en fonction d'autres paramètres (hémodilution éventuelle de l'échantillon, cellularité...).

Concernant la stratégie de réanalyse, (tableau 16), une différence significative a été observée sur le taux de MRD estimé pour un des points de suivi, avec un taux estimé à 6% au CHU contre 3.4% au CHV. Cette différence de MRD peut s'expliquer par un léger glissement phénotypique des blastes entre le diagnostic et le suivi, ayant nécessité un nouveau fenêtrage. Le fenêtrage n'a pas été réalisé strictement de la même manière entre les deux sites. Cependant, plus que le taux précis, c'est la

cinétique d'évolution du LAIP qui est importante, et elle ne diffère pas dans ce cas entre les deux sites. Aucune discordance sur l'interprétation finale n'a par ailleurs été retrouvée sur les 20 dossiers analysés par les deux centres.

Pour l'évaluation de la MRD-LAM selon l'approche LSC, une évaluation de la sensibilité de la technique a également été réalisée. Les résultats des épreuves de dilutions confirment que l'approche LSC, lorsqu'elle est applicable, permet d'obtenir une meilleure sensibilité que l'approche LAIP/DfN (seuil proche de  $10^{-4}$  pour l'approche LSC versus  $10^{-3}$  pour l'approche LAIP). Pour atteindre ce niveau de sensibilité, une acquisition de 500 000 à 1 000 000 événements est néanmoins requise, ce qui n'a pas pu être systématiquement réalisée lors de cette épreuve de dilution (cellularité insuffisante dans les derniers tubes de dilution).

Dans notre travail, nous avons évalué la MRD-LAM selon l'approche LSC pour 4 patients chez qui un taux de LSC > 1% a été observé au diagnostic ou à la rechute, et pour lesquels nous disposons de minimum quatre points de suivi. L'expression physiologique ou bruit de fond (*background*) observé sur un pool de moelles témoins est inférieur au seuil de  $10^{-4}$  attestant de la bonne spécificité de cette approche.

La stratégie LSC, complémentaire de l'approche LAIP/DfN est à l'étude dans différents centres, mais n'est pas encore complètement répandue au sein des équipes de l'Intergroupe Français des LAM. Différentes études ont montré qu'un taux de LSC CD34+ CD38- supérieur à 1% au moment du diagnostic était corrélé à une moins bonne survie globale et un taux de RC moins élevé (126,129). Par ailleurs, la persistance de LSC au cours du suivi serait associée à un risque de rechute plus élevé ainsi qu'à une moins bonne survie globale (126,129,130). Ces données soulignent l'importance de rechercher et quantifier la proportion de CSL présentes au moment du diagnostic et en suivi (82,126).

Il n'existe cependant pas de marqueur universel pour l'identification de cette population, ce qui rend l'harmonisation de cette approche plus complexe. L'équipe de Zeijlemaker *et al.* s'est intéressée à l'identification et à la quantification des LSC. Ils suggèrent l'utilisation d'un panel d'anticorps suffisamment large incluant la *backbone* de marqueurs CD34, CD38, CD45 et les antigènes CD45RA, CD123, CD33, CD44, CLL-1, TIM-3, CD7, CD11b, CD22, CD56, ces six derniers anticorps se trouvent tous dans le même canal de fluorescence PE (131). La combinaison de ces marqueurs garantit une excellente spécificité de la technique : absence en particulier

d'expression sur les HSC CD34+CD38- des 6 moelles de référence testées. Le phénotype des LSC étant par ailleurs hétérogène entre les patients et pour un même patient, l'utilisation d'un panel d'anticorps suffisamment large doit permettre la détection de populations émergentes, pendant le traitement ou l'évolution de la maladie (87). Grâce à l'utilisation d'un cocktail d'anticorps en PE, la précision de la méthode d'identification des LSC n'est pas affectée, même en cas de *shift* d'expression sur un des marqueurs de LSC. Les performances obtenues sont par ailleurs aussi bonnes que lorsque les anticorps sont étudiés individuellement (un anticorps par canal) sur un plus grand nombre de tubes (131). Cette approche s'avère également plus économique et permet un gain de temps.

Dans le protocole de l'Intergroupe Français des LAM, l'identification des LSC au sein du compartiment CD34-CD38- utilise une stratégie équivalente. Le tube 2 du panel MRD-LAM, plus spécifiquement dédié à la recherche de LSC, comprend des marqueurs liés au blocage de différenciation ou l'expression aberrante liée à la leucémogénèse tels que CD45RA, CD123, CD90. L'ajout dans le canal PE d'un Mix d'anticorps (CD97 + TIM-3 + CLL-1) permet d'étudier un plus grand nombre de marqueurs dans un seul tube. La booléenne d'identification utilisée pour les LSC permet de classer en LSC les cellules CD34+ CD38- exprimant un ou plusieurs marqueurs parmi le CD45RA, le CD123 et les anticorps composant le Mix. Le marqueur CD90, également présent dans ce tube ne rentre pas dans la booléenne d'identification mais il a été observé une perte d'expression de ce marqueur sur les LSC. A noter cependant une expression fluctuante du CD90 sur les HSC, une perte d'expression du CD90 n'est donc pas suffisante pour classer les cellules CD34+ CD38- en LSC.

Le tube 1 non spécifiquement dédié à la recherche comprend également le *backbone* de marqueurs CD34, CD38, CD45 ainsi que certains marqueurs myéloïdes (CD13, CD33) et de lignées (CD7, CD19, CD56) également intéressant pour la recherche de LSC. Enfin, une stratégie de *retrogating* permet de visualiser l'expression du CD34 et du CD45 ainsi que les propriétés de diffusion FS/SS, permettant de les différencier des CSH.

Dans notre étude, l'évaluation de la MRD selon l'approche LSC a été réalisée sur 19 points de suivi obtenus chez 4 patients pour lesquels un taux de LSC supérieur à 1% avait été observé au diagnostic ou à la rechute. Les profils phénotypiques étudiés incluent systématiquement une perte d'expression du CD90, associée à minimum

une autre aberration phénotypique évocatrice de LSC : CD45RA+ et/ou Mix+ (CD97-TIM-3-CLL-1) et/ou CD117 diminué.

La comparaison des résultats obtenus entre les deux sites montre une bonne corrélation. Une analyse sur un plus grand nombre d'échantillons devra néanmoins être réalisée pour apprécier la bonne concordance des résultats inter-opérateurs.

Pour l'un des patients, la population de LSC n'est pas présente à un taux significatif au diagnostic mais émerge à la rechute. Des glissements phénotypiques sont par ailleurs observés en suivi avec une perte d'expression du CD45RA, un gain d'expression du CD90, le Mix étant par ailleurs resté positif. Ces observations confirment les variabilités phénotypiques observées en cours de traitement. Pour ce patient, une MRD faiblement positive (taux 0,016%), non signalée initialement, a été identifiée à posteriori pour le point de MRD2 post rechute. Pour ce point de suivi, la MRD selon l'approche LAIP était négative et la MRD en BM était positive (transcrit de fusion *CBFB-MYH11* quantifié à 0.395%/plasmide). Le patient est actuellement en rémission.

Ces résultats suggèrent une complémentarité entre les différentes approches, comme démontré par l'équipe de Gerrit Schuurhuis et repris dans la stratégie de l'intergroupe français des LAM (50).

Dans notre travail, une analyse rétrospective des résultats de MRD-LAM obtenus en CMF et en BM a été réalisée pour les échantillons ayant pu bénéficier de cette double approche. Dans la cohorte étudiée, 70% des patients atteints de LAM ont pu bénéficier d'un suivi de MRD en biologie moléculaire. Ces chiffres tiennent compte du suivi de *WT1* et sont relativement conformes à ceux observés dans la littérature.

La concordance MRD-CMF/MRD-BM calculée à l'aide du coefficient kappa est modérée à 0,512. Ce résultat inclut les résultats obtenus à la fois sur sang et moelle. Il est cependant difficile de comparer les techniques car l'analyte mesuré n'est pas le même, la nature de l'échantillon peut également varier (sang versus moelle osseuse) et le nombre d'échantillons de notre étude est relativement faible. Toutefois, l'étude de concordance permet de souligner quelques points intéressants. Tout résultat de MRD-LAM positif au seuil de  $10^{-3}$  en CMF a été retrouvé positif en BM.

Les différences observées concernent uniquement des résultats positifs en BM, pour lesquels un résultat de MRD a été rendu négatif au seuil de  $10^{-3}$  en CMF. Ces

différences peuvent tout d'abord s'expliquer par une différence de sensibilité des techniques : les seuils de sensibilité des approches moléculaires étant généralement meilleurs que ceux étudiés en cytométrie. Cependant, le seuil de  $10^{-3}$  validé pour chaque patient via l'approche LAIP pourrait être abaissé à  $10^{-4}$  en cas de LAIP très robuste. Ainsi, pour deux points de MRD pour lesquels nous avons observé une discordance CMF/BM, un résultat négatif au seuil de  $10^{-3}$  en CMF aurait pu être interprété positif en tenant compte de la LOD technique basée sur l'expression physiologique du LAIP dans le pool de moelles de référence, mais ce seuil n'a pas été validé cliniquement (87). Le seuil de sensibilité de la technique est également très dépendant de la qualité de l'échantillon. L'échantillon de moelle constituant le gold standard pour l'analyse en CMF, un échantillon hémodilué ne permettra pas d'atteindre une sensibilité optimale (87).

Actuellement, il est recommandé de suivre les patients présentant une mutation de NPM1, une LAM CBF (transcrits de fusion *CBFB-MYH11* et *RUNX1-RUNX1T1*) ou une LAP (transcrit de fusion *PML-RARA*) par des techniques de BM. Pour les autres patients, l'évaluation de la MRD par les techniques de cytométrie en flux est recommandée (87).

Dans notre étude, un suivi moléculaire du transcrit de fusion *CBFB-MYH11* a été réalisé pour l'un des patients. Les résultats de MRD obtenus semblent confirmer la meilleure sensibilité des techniques moléculaires puisque des discordances seront retrouvées pour tous les points de suivi ayant précédés la rechute, avec des résultats positifs en BM (avec perte de plus de  $3 \log_{10}$  entre le diagnostic et le point de MRD1) et négatifs en CMF. Le patient est actuellement en rémission.

De fréquentes discordances ont été observées entre les deux approches en cas de suivi de l'expression de *WT1* par technique moléculaire, en tenant compte du résultat de MRD-BM sur sang (le résultat étant négatif sur moelle). En effet, le suivi de l'expression de *WT1* sur le sang est privilégié en raison de sa meilleure spécificité. Pour les patients ayant rechuté, différentes conditions peuvent expliquer une moindre sensibilité de l'approche en CMF : stratégie DfN privilégiée en l'absence d'immunophénotypage au diagnostic réalisé avec le panel de suivi, LAIP peu robuste, acquisition non optimale, glissement phénotypique entre le diagnostic et la rechute. Pour les autres patients (suivi de l'expression de *WT1* positif uniquement sur sang), nous ne disposons pas de recul suffisant pour discuter un défaut de spécificité de l'approche moléculaire ou un manque de sensibilité des techniques de

cytométrie en flux. Il apparaît cependant que les résultats positifs obtenus en BM étaient systématiquement proches de la limite de positivité (taux compris entre 0,1 et 0,2%) et n'ont pas été confirmés sur le point de MRD ultérieur. Les patients n'ont à ce jour pas rechuté. Ces résultats confortent les recommandations de l'ELN : la conversion d'un résultat négatif en un résultat positif doit être confirmée quatre semaines plus tard sur un deuxième échantillon. La rechute moléculaire est confirmée si l'augmentation de la MRD dans le deuxième échantillon est supérieure à  $1 \log_{10}$  (87).

Au total, nos résultats confirment qu'un résultat positif en CMF est très en faveur d'une MRD positive en BM et est associé à une moins bonne survie globale et un risque de rechute augmenté (80,89). En revanche, une MRD négative en CMF n'exclue pas un résultat de MRD positif en BM. Les différentes approches sont complémentaires, la CMF présentant l'avantage d'être une technique accessible dans de nombreux laboratoires, avec un délai de rendu des résultats possible en théorie en 24-48h.

Enfin, le troisième volet de notre travail a consisté à évaluer l'utilisation d'algorithmes de clusterisation non supervisé sur « R » associés à FlowSOM, pour la détermination de la MRD-LAM en CMF. L'étude réalisée sur un petit nombre d'échantillons a permis de montrer des résultats encourageants puisque que nous avons retrouvé une bonne corrélation avec les résultats obtenus par l'approche conventionnelle. Nous n'avons cependant pas observé de gain de sensibilité par rapport aux techniques classiques de cytométrie. Néanmoins, l'échantillonnage étudié est ici insuffisant pour permettre une évaluation précise des performances de cette approche.

L'analyse non supervisée permet de s'affranchir de la subjectivité de l'opérateur, notamment dans le choix des clusters à étudier. Cependant, comme pour les techniques de CMF conventionnelles, les mêmes difficultés semblent persister en cas de LAIP peu robuste ou de résultats de MRD proches du seuil de significativité. Un traitement préanalytique des data (élimination des débris, artefacts d'acquisition, correction des compensations...) semble par ailleurs indispensable pour éviter de conduire à des non-sens biologiques.

Cette approche très prometteuse nécessite également d'être validée dans le cadre d'études prospectives multicentriques pour permettre son application en clinique, ce

qui implique un travail de standardisation entre les plateformes de cytométrie amenées à travailler ensemble.

## VI- Conclusion

Dans les leucémies aiguës myéloïdes, l'étude de la maladie résiduelle constitue un marqueur pronostic, puissant et indépendant, du risque de rechute et de la survie globale. Son applicabilité en clinique reste cependant limitée en raison notamment du manque de standardisation des techniques utilisées, limitant la réalisation d'études prospectives multicentriques. De gros efforts de standardisation ont ainsi été réalisés ces dernières années au sein de l'intergroupe français des LAM dans l'évaluation de la MRD en cytométrie en flux, avec la mise en place d'un protocole technique commun combinant les approches LAIP/DfN et LSC, comme recommandé par l'ELN.

C'est cette approche que nous avons souhaité mettre en place au laboratoire de Valenciennes. Le travail d'harmonisation réalisé avec le laboratoire d'Hématologie du CHU de Lille nous a permis d'obtenir une excellente concordance de résultats entre les deux sites, validant ainsi le protocole technique et la stratégie de réanalyse mises en place. Les performances de sensibilité sont conformes à celles recommandées par l'ELN avec un seuil de  $10^{-3}$  pour l'approche combinée LAIP/DfN et un seuil de  $10^{-4}$  pour l'approche LSC.

La mise en place de cette technique nous a permis par ailleurs d'approfondir nos connaissances sur les caractéristiques immunologiques des sous populations médullaires, et ceci à chaque stade de différenciation hématopoïétique, la connaissance des chemins de maturation normaux étant un prérequis indispensable à l'analyse en CMF.

L'utilisation de différentes approches complémentaires devrait permettre à la maladie résiduelle de constituer à l'avenir un outil robuste et sensible pour une stratification « personnalisée » dans les LAM, ainsi qu'un marqueur puissant de l'évaluation thérapeutique de nouvelles molécules. Néanmoins certaines difficultés persistent, liées notamment à l'absence de standardisation sur le plan international, et à la subjectivité du cytométriste dans le choix des populations cibles. Pour ce dernier point, l'apport de l'intelligence artificielle et le développement de nouveaux outils de représentation des données tels que FlowSOM, s'avère dès lors incontournable.



## Annexe

**Tableau 21 : Anticorps utilisés pour la mise en place de la MRD-LAM-CMF**

Anticorps	Clone	Duraclone®	Anticorps liquide	Tube 1	Tube 2	Tube 3	Tube 4
CD7 FITC	8H8.1	X		X			
CD13 PE	SJ1D1	X		X			
HLA-DR ECD	Immu-357	X		X		X	
CD33 PC5.5	D3HL60.251	X		X		X	
CD38 PC7	HB7		X	X	X		
CD34 APC	581	X		X	X	X	
CD56 AA700	N901	X		X			
CD19 AA750	J3-119	X		X			
CD117 BV421	104D2		X	X	X	X	
CD45 KrO	J33	X	X	X	X	X	X
CD90 FITC	5E10		X		X		
CD97 PE	VIM3b		X		X		
CLL-1 PE	50C1		X		X		
TIM3 PE	50C1		X		X		
CD19 ECD	J3-119	X	X		X		X
CD123 PC5.5	SSDCLY107D2	X			X		
CD36 AA700	FA6.152	X			X	X	
CD45RA AA750	2H4	X			X		
CD65 FITC	88H7	X				X	
CD4 PE	13B8 2	X				X	
CD11b PC7	BEARL	X				X	
CD14 AA750	RMO52	X				X	
CD64 FITC	22		X				X
MPOic PE	CLB-MPO-1		X				X
CD34 PC7	581		X				X
CD79a APC	HM47		X				X
CD10 AA700	ALB1		X				X
CD3ic AA750	UCHT1		X				X
CD2 PB	39C1.5		X				X

**Tableau 22 : Caractéristiques au diagnostic des patients inclus dans ce travail**

Patient	Âge	Sexe	NFS	Type LAM	BM	Caryotype
1	69	F	GB : 2,48 ; Hb : 11,8 ; Plq : 39	LAM 5a	Absence d'anomalies	+8
2	71	F	GB : 30,60 ; Hb : 11,1 ; Plq : 28	LAM 1	<i>AF9-MLL</i> , surexpression <i>EVI1</i> et <i>WT1</i>	t(9;11)
3	70	H	GB : 3,66 ; Hb : 12,4 ; Plq : 99	LAM 4	<i>NPM1</i> (A), <i>TET2</i> , surexpression <i>WT1</i>	Normal
4	79	F	GB : 194,08 ; Hb : 10,4 ; Plq : 90	LAM 5	Absence d'anomalies	+8
5	31	F	GB : 3,60 ; Hb : 11,6 ; Plq : 145	Non précisé au diagnostic	<i>NPM1</i> (D), surexpression <i>WT1</i>	Normal
6	59	F	GB : 48,47 ; Hb : 11,8 ; Plq : 118	LAM 2	<i>NPM1</i> (A), surexpression <i>WT1</i>	Normal
7	66	H	GB : 2,59 ; Hb : 13,0 ; Plq : 134	LAM 4	<i>IDH2</i> , surexpression <i>WT1</i>	+8
8	82	H	GB : 1,04 ; Hb : 9,3 ; Plq : 80	LAM 2	Non réalisé au diagnostic	Clone tétradipléide caractérisé par une del(5)(q31q35)
9	51	H	GB : 2,35 ; Hb : 12,9 ; Plq : 89	LAM 1	<i>CEBPA</i> , <i>RUNX1</i> , <i>BCOR</i> , <i>TET2</i>	Normal
10	71	H	GB : 103,59 ; Hb : 9,0 ; Plq : 42	LAM 4 éosino	<i>CBFB-MYH11</i> (A), <i>KIT</i> , <i>NRAS</i> , surexpression <i>WT1</i>	inv(16)(p13q22)
11	35	H	GB : 2,97 ; Hb : 8,9 ; Plq : 867	LAM secondaire post SMD	Absence d'anomalies	Normal
12	49	H	GB : 47,14 ; Hb : 11,0 ; Plq : 121	LAM 1	<i>FLT3-ITD</i> , <i>NPM1</i> (A), <i>IDH2</i> , surexpression <i>WT1</i>	Normal
13	32	H	GB : 109,82 ; Hb : 4,9 ; Plq : 13	LAM 1	<i>KMT2A-ELL</i> , <i>FLT3-TKD</i> , <i>CEBPA</i> , <i>STAG2</i> , surexpression <i>EVI1</i> et <i>WT1</i>	t(11;19), del((12p)
14	44	H	GB : 1,41 ; Hb : 6,9 ; Plq : 60	SMD-EB-2	<i>TP53</i> , surexpression <i>WT1</i>	-5,-7,-14,-16, add(12)(p12), add(17)(p11), add(21)(p11)
15	39	F	GB : 102,76 ; Hb : 6,4 ; Plq : 84	LAM 4	<i>NUP98-NSD1</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-TKD</i> , <i>CEBPA</i> , <i>ETV6</i> , <i>RAD21</i> , surexpression <i>WT1</i>	Normal
16	45	F	GB : 12,69 ; Hb : 6,6 ; Plq : 260	LAM 1	<i>IDH2</i> , surexpression <i>WT1</i>	+11, del(9)(q22) (sous-clone)
17	78	H	GB : 2,97 ; Hb : 8,8 ; Plq : 599	LAM 2	<i>NRAS</i> , surexpression <i>EVI1</i> et <i>WT1</i>	t(3;3)(q21;q26), -7
18	53	H	Non renseigné	Non précisé au diagnostic	Absence d'anomalies	Normal
19	71	F	Non renseigné	LAM5a	<i>NPM1</i> (B), <i>NRAS</i> , surexpression <i>WT1</i>	Non renseigné
20	66	F	GB : 1,60 ; Hb : 8,2 ; Plq : 31	LAM secondaire post SMD	<i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>TET2</i>	Normal
21	58	H	GB : 11,32 ; Hb : 11,0 ; Plq : 13	SMD-EB-2	Surexpression <i>EVI1</i> (positif faible) et <i>WT1</i>	-7
22	66	F	GB : 61,27 ; Hb : 8,8 ; Plq : 71	Non précisé au diagnostic	<i>NPM1</i> (A), <i>IDH2</i> , surexpression <i>WT1</i>	Normal
23	74	F	GB : 167,52 ; Hb : 7,1 ; Plq : 86	LAM 1	<i>DNMT3A</i> , <i>NPM1</i> (mutation non précisée), <i>TET2</i>	Normal
24	52	H	GB : 4,74 ; Hb : 12,7 ; Plq : 79	LAM 1	<i>FLT3-ITD</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>IDH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SMC1A</i> , <i>U2AF1</i> , surexpression <i>WT1</i>	+14
25	27	H	GB : 1,58 ; Hb : 8,0 ; Plq : 30	SMD-EB-2 *	Surexpression <i>WT1</i>	Normal
26	82	F	GB : 3,27 ; Hb : 6,3 ; Plq : 61	LAM composante monocytaire	<i>ASXL1</i> , <i>RUNX1</i> , <i>STAG2</i>	Normal
27	74	H	GB : 181,44 ; Hb : 6,4 ; Plq : 16	LAM 0	Surexpression <i>EVI1</i> (positif faible)	Perte du chromosome Y
28	79	H	GB : 3,01 ; Hb : 10,5 ; Plq : 106	Non précisé au diagnostic	Non réalisé au diagnostic	Clone complexe monosomal

<b>29</b>	45	F	GB : 3,79 ; Hb : 9,1 ; Plq : 200	LAM composante monocyttaire	<i>FLT3-ITD, BCORL1, RUNX1, surexpression WT1</i>	Normal
<b>30</b>	85	F	GB : 0,89 ; Hb : 10,0 ; Plq : 61	Non précisé au diagnostic	Absence d'anomalies	Normal
<b>31</b>	67	H	GB : 0,73 ; Hb : 4,8 ; Plq : 67	LA bi-clonale	Surexpression <i>WT1</i>	Normal
<b>32</b>	58	H	GB : 2,43 ; Hb : 9,9 ; Plq : 30	LAM 0	Surexpression <i>WT1</i>	Clone hypodiploïde incluant -5, -7 et -17
<b>33</b>	42	F	GB : 5,71 ; Hb : 13,7 ; Plq : 130	LAM 2	<i>CEBPA, surexpression WT1</i>	Normal
<b>34</b>	71	F	GB : 4,63 ; Hb : 8,3 ; Plq : 148	Non précisé au diagnostic	<i>CEBPA, IDH2</i>	Normal
<b>35</b>	60	F	GB : 27,18 ; Hb : 8,7 ; Plq : 107	LAM4	<i>FLT3-TKD, surexpression WT1</i>	2 clones dont 1 monosomal

*GB = globules blancs (leucocytes) en G/L ; Hb = hémoglobine en g/dL ; Plq = plaquettes en G/L*

\* *LAM6 selon la classification OMS 2008.*



## **Bibliographie**

1. Estey E, Döhner H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet*. 25 nov 2006;368(9550):1894-907.
2. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remontet L, Colonna M, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Résultats préliminaires. Saint-Maurice: Santé Publique France; 2019. 20 p.
3. Rafei H, DiNardo CD. Hereditary myeloid malignancies. *Best Pract Res Clin Haematol*. juin 2019;32(2):163-76.
4. Hasle H, Clemmensen IH, Mikkelsen M. Risks of leukaemia and solid tumours in individuals with Down's syndrome. *The Lancet*. 15 janv 2000;355(9199):165-9.
5. Myers KC, Furutani E, Weller E, Siegele B, Galvin A, Arsenault V, et al. Clinical features and outcomes of patients with Shwachman-Diamond syndrome and myelodysplastic syndrome or acute myeloid leukaemia: a multicentre, retrospective, cohort study. *Lancet Haematol*. 23 déc 2019;
6. Shi H, Shao X, Hong Y. Association between cigarette smoking and the susceptibility of acute myeloid leukemia: a systematic review and meta-analysis. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. nov 2019;23(22):10049-57.
7. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.
8. Duployez N, Goursaud L, Fenwarth L, Bories C, Marceau-Renaut A, Boyer T, et al. Familial myeloid malignancies with germline TET2 mutation. *Leukemia*. mai 2020;34(5):1450-3.
9. West AH, Godley LA, Churpek JE. Familial myelodysplastic syndrome/acute leukemia syndromes: a review and utility for translational investigations. *Ann N Y Acad Sci*. mars 2014;1310(1):111-8.
10. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
11. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of Flt3+ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell*. 22 avr 2005;121(2):295-306.
12. Nardi NB, Alfonso ZC. The hematopoietic stroma. *Braz J Med Biol Res*. mai 1999;32(5):601-9.
13. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 1 sept 2002;100(5):1532-42.
14. Olombel G. Impact de l'expression du CD33 sur la réponse au gemtuzumab ozogamicin dans les leucémies aiguës myéloïdes : nouveau protocole de cytométrie en flux pour une détermination standardisée de l'expression du CD33 dans les leucémies aiguës myéloïdes. Limoges; 2013.
15. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*. 15 déc 2008;112(13):4793-807.
16. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 17 févr 1994;367(645-8).

17. Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut J-A, et al. Human Acute Myeloid Leukemia CD34+/CD38- Progenitor Cells Have Decreased Sensitivity to Chemotherapy and Fas-induced Apoptosis, Reduced Immunogenicity, and Impaired Dendritic Cell Transformation Capacities. :10.
18. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of Therapeutic Targets for Quiescent, Chemotherapy-Resistant Human Leukemia Stem Cells. *Sci Transl Med.* 3 févr 2010;2(17):17ra9.
19. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like Leukemia Stem Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell.* janv 2011;19(1):138-52.
20. Sarry J-E, Murphy K, Perry R, Sanchez PV, Secreto A, Keefer C, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rγc-deficient mice. 4 janv 2011;
21. Wang A, Zhong H. Roles of the bone marrow niche in hematopoiesis, leukemogenesis, and chemotherapy resistance in acute myeloid leukemia. *Hematology.* 26 nov 2018;23(10):729-39.
22. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 26 janv 2017;129(4):424-47.
23. Imbert M, Ballon OW-. Place du biologiste dans la prise en charge des leucémies aiguës : de l'hémogramme à la classification OMS. *Rev Francoph Lab.* avr 2015;2015(471):83-90.
24. Franchini M, Dario Di Minno M, Coppola A. Disseminated Intravascular Coagulation in Hematologic Malignancies. *Semin Thromb Hemost.* juin 2010;36(04):388-403.
25. Dutcher JP, Schiffer CA, Wiernik PH. Hyperleukocytosis in adult acute nonlymphocytic leukemia: impact on remission rate and duration, and survival. *J Clin Oncol.* sept 1987;5(9):1364-72.
26. Greenwood MJ, Seftel MD, Richardson C, Barbaric D, Barnett MJ, Bruyere H, et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* janv 2006;47(7):1245-52.
27. 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) Co-operative Group. *Br J Haematol.* août 1976;33(4):451-8.
28. Bennett JM. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med.* 1 oct 1985;103(4):620.
29. Béné M-C, Lacombe F. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab.* avr 2015;2015(471):35-41.
30. Olombel G, Guerin E, Guy J, Perrot J-Y, Dumezy F, de Labarthe A, et al. The level of blast CD33 expression positively impacts the effect of gemtuzumab ozogamicin in patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 28 avr 2016;127(17):2157-60.
31. 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.* 22 juill 2010;116(3):354-65.

32. Bories C. 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. Lille; 2016.
33. Duployez N, Preudhomme C. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab.* avr 2015;2015(471):51-64.
34. Luquet I. Place de la cytogénétique dans le diagnostic des leucémies aiguës myéloïdes. *Rev Francoph Lab.* avr 2015;2015(471):43-9.
35. Luquet I, Bidet A, Cuccuini W, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci M-J, Terré C. Cytogenetics in the management of acute myeloid leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* sept 2016;74(5):535-46.
36. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 30 juill 2009;114(5):937-51.
37. Howlader M, Noone A, Krapcho M. SEER Cancer Statistics Review 1975-2015 - Disponible sur: [https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975\\_2015/results\\_merged/sect\\_13\\_leukemia.pdf](https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2015/results_merged/sect_13_leukemia.pdf)
38. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood.* 1 mai 2006;107(9):3481-5.
39. Vaughan WP, Kimball AW, Karp JE, Dragon LH, Burke PJ. Factors affecting survival of patients with acute myelocytic leukemia presenting with high wbc counts. *Cancer Treat Rep.* déc 1981;65(11-12):1007-13.
40. Estey E, Smith TL, Keating MJ, McCredie KB, Gehan EA, Freireich EJ. Prediction of survival during induction therapy in patients with newly diagnosed acute myeloblastic leukemia. *Leukemia.* avr 1989;3(4):257-63.
41. 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.* 24 févr 2011;117(8):2469-75.
42. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and Treatment Outcome in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* mai 2008;358(18):1909-18.
43. Falini B, Alcalay M, Starza RL, Santucci A, Pucciarini A, Fazi P, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med.* 2005;13.
44. 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. *J Clin Oncol.* 20 déc 2012;30(36):4515-23.
45. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood.* 21 janv 2010;115(3):453-74.
46. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 22 mars 2012;366(12):1079-89.

47. 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*. 1 déc 2005;106(12):3740-6.
48. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 1 mars 2008;111(5):2776-84.
49. van Rhenen A. High Stem Cell Frequency in Acute Myeloid Leukemia at Diagnosis Predicts High Minimal Residual Disease and Poor Survival. *Clin Cancer Res*. 15 sept 2005;11(18):6520-7.
50. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, et al. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Bunting KD, éditeur. PLoS ONE*. 22 sept 2014;9(9):e107587.
51. 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*. 11 juill 2013;369(2):111-21.
52. Burnett AK. Optimal induction and post-remission therapy for acute myeloid leukemia. *Leuk Suppl*. août 2012;1(Suppl 2):S14-5.
53. Juliusson G, Karlsson K, Lazarevic VL, Wahlin A, Brune M, Antunovic P, et al. Hematopoietic stem cell transplantation rates and long-term survival in acute myeloid and lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 2011;117(18):4238-46.
54. Cornelissen JJ, Versluis J, Passweg JR, van Putten WLJ, Manz MG, Maertens J, et al. Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40–60 years. *Leukemia*. mai 2015;29(5):1041-50.
55. Buyse M, Squifflet P, Lange BJ, Alonzo TA, Larson RA, Kolitz JE, et al. Individual patient data meta-analysis of randomized trials evaluating IL-2 monotherapy as remission maintenance therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 30 juin 2011;117(26):7007-13.
56. Löwenberg B, Beck J, Graux C, van Putten W, Schouten HC, Verdonck LF, et al. Gemtuzumab ozogamicin as postremission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. *Blood*. 1 avr 2010;115(13):2586-91.
57. 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.
58. 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*. 16 juill 2015;126(3):291-9.
59. 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. *J Clin Oncol*. 20 juill 2012;30(21):2670-7.
60. Stone RM, Mandrekar SJ, Laumann C, et al. Midostaurin, a multi-targeted kinase inhibitor, improves overall survival when added to standard chemotherapy in adults age 18 – 60 with FLT3 mutant acute myeloid leukemia (AML): results from a randomized, prospective, placebo-controlled, double-blind trial, CALGB 10603/RATIFY [abstract]. *Blood*. 2015;126(23).

61. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, et al. Sorafenib in Combination With Intensive Chemotherapy in Elderly Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Randomized, Placebo-Controlled Trial. *J Clin Oncol.* 1 sept 2013;31(25):3110-8.
62. 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-Soramil Trial. *Blood.* 6 déc 2014;124(21):6-6.
63. Mukherjee S, Sekeres MA. Novel Therapies in Acute Myeloid Leukemia. *Semin Oncol Nurs.* déc 2019;35(6):150955.
64. Burnett A, Stone R. AML: New Drugs but New Challenges. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk.* févr 2020;
65. Issa J-PJ, Roboz G, Rizzieri D, Jabbour E, Stock W, O'Connell C, et al. Safety and tolerability of guadecitabine (SGI-110) in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia: a multicentre, randomized, dose-escalation phase 1 study. *Lancet Oncol.* sept 2015;16(9):1099-110.
66. Lancet JE, Cortes JE, Hogge DE, Tallman MS, Kovacsovics TJ, Damon LE, et al. Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML. *Blood.* 22 mai 2014;123(21):3239-46.
67. Ravandi F, Ritchie EK, Sayar H, Lancet JE, Craig MD, Vey N, et al. Vosaroxin plus cytarabine versus placebo plus cytarabine in patients with first relapsed or refractory acute myeloid leukaemia (VALOR): a randomised, controlled, double-blind, multinational, phase 3 study. *Lancet Oncol.* sept 2015;16(9):1025-36.
68. Andreeff M, Jiang S, Zhang X, Konopleva M, Estrov Z, Snell VE, et al. Expression of Bcl-2-related genes in normal and AML progenitors: changes induced by chemotherapy and retinoic acid. *Leukemia.* nov 1999;13(11):1881-92.
69. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naïve, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 3 janv 2019;133(1):7-17.
70. Wei AH, Strickland SA, Hou J-Z, Fiedler W, Lin TL, Walter RB, et al. Venetoclax Combined With Low-Dose Cytarabine for Previously Untreated Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results From a Phase Ib/II Study. *J Clin Oncol.* 20 mars 2019;37(15):1277-84.
71. Queiroz KCS, Ruela-de-Sousa RR, Fuhler GM, Aberson HL, Ferreira CV, Peppelenbosch MP, et al. Hedgehog signaling maintains chemoresistance in myeloid leukemic cells. *Oncogene.* déc 2010;29(48):6314-22.
72. Fukushima N, Minami Y, Kakiuchi S, Kuwatsuka Y, Hayakawa F, Jamieson C, et al. Small-molecule Hedgehog inhibitor attenuates the leukemia-initiation potential of acute myeloid leukemia cells. *Cancer Sci.* oct 2016;107(10):1422.
73. Acheampong DO, Adokoh CK, Asante D-B, Asiamah EA, Barnie PA, Bonsu DOM, et al. Immunotherapy for acute myeloid leukemia (AML): a potent alternative therapy. *Biomed Pharmacother.* janv 2018;97:225-32.
74. Amadori S, Suciù S, Stasi R, Salih HR, Selleslag D, Muus P, et al. Sequential Combination of Gemtuzumab Ozogamicin and Standard Chemotherapy in Older Patients With Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia: Results of a Randomized Phase III Trial by the EORTC and GIMEMA Consortium (AML-17). *J Clin Oncol.* 10 déc 2013;31(35):4424-30.

75. Buckley SA, Walter RB. Update on Antigen-Specific Immunotherapy of Acute Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep.* juin 2015;10(2):65-75.
76. Cummins KD, Gill S. Chimeric antigen receptor T-cell therapy for acute myeloid leukemia: how close to reality? *Haematologica.* juill 2019;104(7):1302-8.
77. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood.* 15 mars 1995;85(6):1416-34.
78. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"? *Blood.* 27 nov 2014;124(23):3345-55.
79. Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. MRD in AML: It is time to change the definition of remission. *Best Pract Res Clin Haematol.* sept 2014;27(3-4):265-71.
80. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. *J Clin Oncol.* 1 nov 2013;31(31):3889-97.
81. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* 4 févr 2016;374(5):422-33.
82. Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. *Hématologie.* 2019;25:14.
83. Ducourneau B. Apport de la RT-MLPA dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. Lille; 2016.
84. Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Sconocchia G, Cefalo M, Consalvo MI, et al. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications. *Mediterr J Hematol Infect Dis.* 20 oct 2016;8(1).
85. 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. *J Clin Oncol.* 1 nov 2009;27(31):5195-201.
86. 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. *J Clin Oncol.* 1 avr 2006;24(10):1507-15.
87. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European Leukemia Net MRD Working Party. *Blood.* 22 mars 2018;131(12):1275-91.
88. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, et al. Prospective Minimal Residual Disease Monitoring to Predict Relapse of Acute Promyelocytic Leukemia and to Direct Pre-Empive Arsenic Trioxide Therapy. *J Clin Oncol.* 1 août 2009;27(22):3650-8.
89. 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.* 21 mars 2013;121(12):2213-23.
90. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With *NPM1* Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol.* 10 janv 2017;35(2):185-93.

91. Payne KJ, Crooks GM. Human hematopoietic lineage commitment. *Immunol Rev.* sept 2002;187(1):48-64.
92. Wood B. Multicolor Immunophenotyping: Human Immune System Hematopoiesis. In: *Methods in Cell Biology* p. 559-76.
93. Vergez F. Maladie résiduelle en cytométrie. *Horizons Hémato.* 2018;8(4):189-90.
94. Feller N, van der Velden VHJ, 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 J.* août 2013;3(8):e129.
95. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood.* 1 juin 2001;97(11):3574-80.
96. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: Comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom.* 2004;62B(1):25-38.
97. Freeman SD, Hourigan CS. MRD evaluation of AML in clinical practice: are we there yet? *Hematology.* 6 déc 2019;2019(1):557-69.
98. Kersten B, Valkering M, Wouters R, van Amerongen R, Hanekamp D, Kwidama Z, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* avr 2016;173(2):219-35.
99. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood.* 1 mai 1997;89(9):3104-12.
100. Blair A, Sutherland HJ. Primitive acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo lack surface expression of c-kit (CD117). *Exp Hematol.* juin 2000;28(6):660-71.
101. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, et al. Monoclonal Antibody-Mediated Targeting of CD123, IL-3 Receptor  $\alpha$  Chain, Eliminates Human Acute Myeloid Leukemic Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 2 juill 2009;5(1):31-42.
102. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 Is a Promising Target to Selectively Kill Acute Myeloid Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell.* 3 déc 2010;7(6):708-17.
103. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell-associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood.* 1 oct 2007;110(7):2659-66.
104. Jaiswal S, Jamieson CHM, Pang WW, Park CY, Chao MP, Majeti R, et al. CD47 is upregulated on circulating hematopoietic stem cells and leukemia cells to avoid phagocytosis. *Cell.* 23 juill 2009;138(2):271-85.
105. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 26 juin 2007;104(26):11008-13.

106. van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint A, Zweegman S, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup> stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia*. 2012;26(12):2811-2819.
107. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. mai 2017;105(5):549-57.
108. Zheng B, Yu S-F, Rosario G del, Leong SR, Lee GY, Vij R, et al. An Anti-CLL-1 Antibody-Drug Conjugate for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Clin Cancer Res*. 15 févr 2019;25(4):1358-68.
109. Ehinger M, Pettersson L. Measurable residual disease testing for personalized treatment of acute myeloid leukemia. *APMIS*. mai 2019;127(5):337-51.
110. Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, Gregg R, Rindl M, Khan J, et al. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. avr 2015;29(4):988-91.
111. Renneville A, Dumézy F, Cassinat B. Leucémies aiguës myéloïdes. 2012;5.
112. Dumezy F. Suivi cellulaire de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes en cytométrie multiparamétrique. Lille; 2009.
113. Lacombe F, Campos L, Allou K, Arnoulet C, Delabarthe A, Dumezy F, et al. Prognostic value of multicenter flow cytometry harmonized assessment of minimal residual disease in acute myeloblastic leukemia. *Hematol Oncol*. avr 2018;36(2):422-8.
114. Gassen SV, Callebaut B, Helden MJV, Lambrecht BN, Demeester P, Dhaene T, et al. FlowSOM: Using self-organizing maps for visualization and interpretation of cytometry data. *Cytometry A*. 2015;87(7):636-45.
115. Duetz C, Bachas C, Westers TM, van de Loosdrecht AA. Computational analysis of flow cytometry data in hematological malignancies: future clinical practice? *Curr Opin Oncol*. mars 2020;32(2):162-9.
116. Lacombe F, Maynadié M, Chatelain B, Béné M-C. Évolution des outils informatiques d'analyse des données en cytométrie en flux. *Rev Francoph Lab*. sept 2017;2017(495):57-61.
117. Saeys Y, Van Gassen S, Lambrecht BN. Computational flow cytometry: helping to make sense of high-dimensional immunology data. *Nat Rev Immunol*. juill 2016;16(7):449-62.
118. Aghaeepour N, Finak G, Hoos H, Mosmann TR, Brinkman R, Gottardo R, et al. Critical assessment of automated flow cytometry data analysis techniques. *Nat Methods*. 2013;10(3):228-38.
119. Chen Z, Li Y, Tong Y, Gao Q, Mao X, Zhang W, et al. Stepwise discriminant function analysis for rapid identification of acute promyelocytic leukemia from acute myeloid leukemia with multiparameter flow cytometry. *Int J Hematol*. mars 2016;103(3):306-15.
120. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, et al. Flow cytometry and IG/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*. févr 2013;27(2):370-6.
121. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol*. janv 1980;8(1):103-7.

122. on behalf of the EuroFlow Consortium (EU-FP6, LSHB-CT-2006-018708), Kalina T, Flores-Montero J, van der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. sept 2012;26(9):1986-2010.
123. Hanekamp D, Snel AN, Kelder A, Scholten WJ, Khan N, Metzner M, et al. Applicability and reproducibility of acute myeloid leukaemia stem cell assessment in a multi-centre setting: Applicability and reproducibility of acute myeloid leukaemia stem cells. *Br J Haematol* [Internet]. 2 avr 2020 [cité 25 août 2020]; Disponible sur: <http://doi.wiley.com/10.1111/bjh.16594>
124. Sui J, Chen Q, Zhang Y, Sheng Y, Wu J, Li J, et al. Identifying leukemia-associated immunophenotype-based individualized minimal residual disease in acute myeloid leukemia and its prognostic significance. *Am J Hematol*. mai 2019;94(5):528-38.
125. Rossi G, Giambra V, Minervini MM, De Waure C, Mancinelli S, Ciavarella M, et al. Leukemia-associated immunophenotypes subdivided in “categories of specificity” improve the sensitivity of minimal residual disease in predicting relapse in acute myeloid leukemia. *Cytometry B Clin Cytom*. mai 2020;98(3):216-25.
126. Plesa A, Dumontet C, Mattei E, Tagoug I, Hayette S, Sujobert P, et al. High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells*. 26 déc 2017;9(12):227-34.
127. Arroz M, Came N, Lin P, Chen W, Yuan C, Lagoo A, et al. Consensus guidelines on plasma cell myeloma minimal residual disease analysis and reporting. *Cytometry B Clin Cytom*. 2016;90(1):31-9.
128. Soh KT, Wallace PK. Monitoring of Measurable Residual Disease in Multiple Myeloma by Multiparametric Flow Cytometry. *Curr Protoc Cytom* [Internet]. sept 2019 [cité 25 août 2020];90(1). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/cpcy.63>
129. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34+CD38- leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. mai 2019;33(5):1102-12.
130. Vergez F, Nicolau-Travers M-L, Bertoli S, Rieu J-B, Tavitian S, Bories P, et al. CD34+CD38-CD123+ Leukemic Stem Cell Frequency Predicts Outcome in Older Acute Myeloid Leukemia Patients Treated by Intensive Chemotherapy but Not Hypomethylating Agents. *Cancers*. 6 mai 2020;12(5).
131. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJM, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. févr 2016;30(2):439-46.





Université de Lille  
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE  
**MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES**  
**(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)**  
Année Universitaire 2019/2020

**Nom :** Derreumaux  
**Prénom :** Sophie

**Titre du mémoire / thèse :** Analyse de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes par cytométrie en flux multiparamétrique, approche ALFA French Group 2017 : mise en place au Centre Hospitalier de Valenciennes

**Mots-clés :** leucémie aiguë myéloïde, maladie résiduelle, cytométrie en flux, LAIP, DfN, cellules souches leucémiques

---

**Résumé :** Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies clonales très hétérogènes au pronostic péjoratif. Si la majorité des patients obtiennent une rémission cytologique complète, beaucoup d'entre eux rechuteront. Les recommandations 2017 de l'*European Leukemia Net* (ELN) prennent désormais en compte l'évaluation de la maladie résiduelle minimale (MRD), en complément des données cytologiques, dans l'évaluation de la réponse thérapeutique. La cytométrie en flux (CMF) constitue une des méthodes de choix pour l'évaluation de la MRD dans les LAM. Cette méthode applicable dans 80 à 90% des LAM nécessite la recherche de profils phénotypiques aberrants associés à la leucémie (LAIP) ou différents des profils de différenciation hématopoïétique normaux (DfN pour *Different from Normal*). Une dernière approche consiste à rechercher au diagnostic et en suivi la présence de cellules souches leucémiques (LSC). Le but de notre travail est de mettre en place un protocole standardisé d'évaluation de la MRD-LAM selon l'approche LAIP-DfN-LSC de l'intergroupe français des LAM (ALFA). Au total, 35 patients ont été inclus dans ce travail. Après avoir établi un protocole standardisé d'évaluation de la MRD-LAM avec le Centre Hospitalier universitaire (CHU) de Lille, nous avons comparé les résultats obtenus entre les deux sites, et confronté les données de MRD obtenues en CMF à celles des techniques moléculaires. Nos résultats montrent une excellente corrélation intersites validant le protocole technique et la stratégie de réanalyse mise en place selon une approche standardisée. L'analyse des données de CMF avec le logiciel FlowSOM semble par ailleurs constituer un outil prometteur pour l'évaluation de la MRD-LAM en complément des techniques conventionnelles. Le protocole mis en place au laboratoire constitue un outil de choix dans la prise en charge des LAM en particulier lorsqu'aucune anomalie moléculaire permettant un suivi de la MRD en BM n'est retrouvée au diagnostic.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie POULAIN, PU-PH, CHU Lille

**Assesseurs :** Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME, PU-PH, CHU Lille  
Monsieur le Docteur Christophe ROUMIER, PH, CHU Lille  
Madame le Docteur Nathalie CAMBIER, PH, CH Valenciennes

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur Claire HEMAR, PH, CH Valenciennes