Altérations immunes dans les leucémies aigües myéloïdes : de leur étude multi-paramétrique au développement de biomarqueurs immuns pronostiques

Clémence Demerlé

▶ **To cite this version:**

Clémence Demerlé. Altérations immunes dans les leucémies aigües myéloïdes : de leur étude multi-paramétrique au développement de biomarqueurs immuns pronostiques. Sciences pharmaceutiques. 2018. dumas-01877750

HAL Id: dumas-01877750

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01877750

Submitted on 20 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 16 Mars 2018

Par Mme Clémence Demerlé
Né(e) le 31 Janvier 1991

Conformément aux dispositions du décret n°2003-76
du 23 janvier 2003, tenant lieu de

THÈSE

POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

Altérations immunes dans les leucémies aiguës myéloïdes : de leur étude multi-paramétrique au développement de biomarqueurs immuns pronostiques

----oOo----

JURY :

Président : Pr Françoise Dignat-George

Membres : Pr Daniel Olive

Pr Jean-Louis Mège

Pr Marc Pallardy

Dr Anne-Sophie Chretien

Faculté de Pharmacie
Aix*Marseille Université

27 Boulevard Jean Moulin – 13385 MARSEILLE Cedex 05
Tel. : 04 91 83 55 00 – Fax : 04 91 80 26 12

ADMINISTRATION :

Doyen :	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Vice-Doyens :	M. Jean-Paul BORG, M. Philippe CHARPIOT, M. Pascal RATHELOT
Chargés de Mission :	M. David BERGE-LEFRANC, M. François DEVRED, Mme Caroline DUCROS, Mme Pascale BARBIER
Conseiller du Doyen :	M. Patrice VANELLE
Doyens honoraires :	M. Jacques REYNAUD, M. Pierre TIMON-DAVID, M. Patrice VANELLE
Professeurs émérites :	M. José SAMPOL, M. Jean-Pierre REYNIER
Professeurs honoraires :	M. Guy BALANSARD, M. Jacques BARBE, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, M. Bernard CRISTAU, M. Gérard DUMENIL, M. Alain DURAND, Mme Danielle GARÇON, M. Maurice JALFRE, M. Joseph JOACHIM, M. Maurice LANZA, M. José MALDONADO, M. Patrick REGLI, M. Jean-Claude SARI,
Chef des Services Administratifs :	Mme Florence GAUREL
Chef de Cabinet :	Mme Sandrine NOURIAN
Responsable de la Scolarité :	Mme Myriam TORRE

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

BIOPHYSIQUE	M. Vincent PEYROT M. Hervé KOVACIC
GENIE GENETIQUE ET BIOINGENIERIE	M. Christophe DUBOIS
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETIQUE	M. Philippe PICCERELLE

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE	M. Robert GILLI Mme Odile RIMET-GASPARINI Mme Pascale BARBIER M. François DEVRED Mme Manon CARRE M. Gilles BREUZARD Mme Alessandra PAGANO
GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE	M. Eric SEREE-PACHA Mme Véronique REY-BOURGAREL
PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE, BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE	M. Pascal PRINDERRE M. Emmanuel CAUTURE Mme Véronique ANDRIEU Mme Marie-Pierre SAVELLI
NUTRITION ET DIETETIQUE	M. Léopold TCHIAKPE

A.H.U.

CULTURE ET THERAPIE CELLULAIRE	M. Jérémy MAGALON

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS	Mme Caroline MONTET

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe CHARPIOT

PROFESSEURS

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	M. Philippe CHARPIOT
BIOLOGIE CELLULAIRE	M. Jean-Paul BORG
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE Mme Laurence CAMOIN Mme Florence SABATIER-MALATERRE
MICROBIOLOGIE	M. Jean-Marc ROLAIN M. Philippe COLSON
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Dominique JOURDHEUIL-RAHMANI M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Nathalie BARDIN Mme Dominique ARNOUX Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET M. Michel DE MEO Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD
PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET ZOOLOGIE	Mme Carole DI GIORGIO M. Aurélien DUMETRE Mme Magali CASANOVA Mme Anita COHEN
BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne-Catherine LOUHMEAU

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Sylvie COINTE

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Henri PORTUGAL Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Philippe GALLICE
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	Mme Evelyne OLLIVIER

PROFESSEURS ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (P.A.S.T.)

GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE	M. Jean-Pierre CALISSI

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Elisabeth SCHREIBER-DETURMENY Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Catherine DIANA Mme Sandrine FRANCO-ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE, HOMEOPATHIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

MAITRES DE CONFERENCE ASSOCIES A TEMPS PARTIEL (M.A.S.T.)

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Thierry ATHUYT
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	M. Philippe BESSON

AHU

CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	Mme Manon ROCHE

ATER

CHIMIE ANALYTIQUE	Mme Camille DESGROUAS

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE
Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS	
PHARMACIE CLINIQUE	Mme Diane BRAGUER
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Athanassios ILIADIS
TOXICOLOGIE GENERALE	M. Bruno LACARELLE
TOXICOLOGIE DE L'ENVIRONNEMENT	Mme Frédérique GRIMALDI

MAITRES DE CONFERENCES	
PHARMACODYNAMIE	Mme Suzanne MOUTERDE-MONJANEL
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOCINETIQUE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Hot BUN M. Joseph CICCOLINI Mme Raphaëlle FANCIULLINO
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD M. Stéphane HONORÉ Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.	
PHARMACODYNAMIE	M. Philippe GARRIGUE

ATER	
PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlel BOUHLEL

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Nathalie AUSIAS, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Gérard CARLES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Nicole FRANCOIS, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Christine PENOT-RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Alain RAGON, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

Mise à jour le 1er décembre 2015

L'Université n'entend donner aucune approbation, ni improbation aux opinions émises dans les thèses. Ces opinions doivent être considérées comme propres à leurs auteurs.

Remerciements

Je remercie respectueusement

Le **Professeur Françoise Dignat-George**, Doyen de la faculté de Pharmacie de Marseille d'avoir accepté de présider ce jury.

Le **Professeur Marc Pallardy**, Doyen de la faculté de Pharmacie de Paris Sud XI, où j'ai fait mes études, qui nous fait l'honneur de sa présence.

Le **Professeur Daniel Olive**, qui m'a accueillie dans son équipe en Master 2 et proposé ce sujet ambitieux.

Le **Professeur Jean-Louis Mège,** pour ses précieux conseils sur la suite de mon cursus.

Le **Dr Anne-Sophie Chrétien**, qui a encadré mon travail sans compter son temps.

Le **Dr Anne-Catherine Lhoumeau**, pour son aide dans la partie recherche translationnelle.

Le **centre d'Immunophénomique (CIPHE)**, et notamment **Hervé Luche** et **Emilie Gregory**, pour toute la partie cytométrie de masse.

Mes remerciements les plus chaleureux vont

Au Dr **Jacques Nunès,** pour son aide et sa gentillesse, et pour la description détaillée des falaises de La Ciotat.

Au Dr **Cyril Fauriat**, pour son franc-parler et sa disponibilité pour préparer les oraux… et pour les cessions « escalade » du lundi soir avec Michel ☺

A **PaysagePaysages** pour l'accompagnement à l'écriture et les relectures de ce manuscrit.

A **Bernadette**, qu'aurais-je fait sans toi ? L'organisation du labo, les commandes, les conseils avisés…tu es irremplaçable !

A **Philou**, l'homme aux 10^9 Ficolls, j'ai appris auprès d'un très grand !

A **Flo**, déesse des comp', pour les petites cessions « Fortessa » du vendredi.

A **Berna**, princesse du Liban, et **Ying**, repartie en Thaïlande, pour nos échanges toujours fructifiants sur le boulot, le sens de la vie (au moins ça), et tout le reste.

A **Philippe,** avec qui j'ai (vainement) tenté d'apprendre à utiliser R (smp<-read.csv.2$cestpourlesgeekscetruc) avant qu'il ne parte chez les « ricains ».

A tous mes collègues de bureau, toujours prêts à aider (et à manger du gingembre confit, des chocolats, des bonbons, des gâteaux, des gaufres au miel… ça suffit non ?!). Merci pour la bonne humeur (et la bonne « bouffe ») que vous apportez tous les jours.

A **Aude, Suong, Stéphanie** et **Clara**, pour m'avoir montré des thèses brillantes !

A **Magali**, ingé-Cytof de choc ! En plus d'avoir bossé quelques fois avec moi, tu as accepté de garder notre chat : tu ne méritais pas ça !

A mes co-internes de Master, « **Juju la mascotte** » et « **Anne-Charlotte qui dépote** », on a partagé les mêmes stress (labmeeting oulalala) et les mêmes coups de bourre (comment ça on rend le manuscrit la semaine prochaine ???!!)

A tous les **habitants de la « cave »**, qui ne sont pourtant pas des hommes des cavernes, et à la plateforme de cytométrie : merci pour votre gentillesse et votre aide, c'était un plaisir de pouvoir travailler avec chacun d'entre vous.

Et à toutes les autres personnes et personnalités de l'équipe DO que j'aurais oublié de citer…

Je pense à ceux sans qui ma thèse ne serait même pas une hypothèse

Ma grand-mère, **Denise** et mon grand-père **Roger**, deux grands pédiatre et chirurgien, qui, je l'espère, seraient fiers de moi aujourd'hui.

Mon grand-père **François**, médecin de campagne et du ciel, et à ma grand-mère **Brigitte**, j'espère devenir d'aussi grands voyageurs que vous.

Ma tante **Caroline** et mon oncle **Marc**, les pharmaciens de la famille, qui m'ont donné envie de suivre leur voie.

Mes tantes maternelles, **Emma**, pour une formation continue en pâtisserie, **Catherine**, pour tes encouragements durant la rédaction de cette thèse, et **Isabelle** (ou tata 'zabelle) pour les vacances normandes depuis toute petite (c'est pas la maison de redressement ici !)

Mes beaux-parents **Annie** et **Jean-Paul**, qui m'ont si gentiment accueillie dans leur famille.

Ma belle-sœur, **Amélie,** (j'aurais aimé avoir une grande sœur comme toi !) et **Marc**, mon beau frère CGTiste préféré… désolée si je rentre en Uber ce soir !

Ma belle-cousine, **Marie**, marseillaise depuis peu, toujours partante pour plein de choses.

Anne et **Éric**, mes parents, qui n'ont cessé de croire en moi, même quand j'ai décidé d'arrêter les études de Pharmacie pour aller sur la banquise pendant un an. A quand le déménagement dans le Sud ?

Mes frères, **Nathan** et **Nils**, qui, même s'ils font deux têtes de plus que moi, restent mes petits frères. Dur d'être la première avec d'aussi grands gars comme vous derrière (et là je parle plus de la taille !).

Je ne risque pas d'oublier le soutien ..

De **Gaël**, mon meilleur binôme de TP à la fac, jamais les deux pieds dans le même bateau, toujours partant et/ou déjà partis vers de nouvelles contrées. Tu as préféré approfondir tes

connaissances en 2e année… dommage je n'ai jamais pu sortir de TP aussi vite après ça. Enfin bon, tu peux toujours te cacher au Danemark, je sais où te trouver !

De **Hervé**, parce que d'après lui « on est pas là pour être ici » même si je n'ai toujours pas compris pourquoi tu dis ça ☺

De **Kira**, une allemande rencontrée au canada en faisant du woofing, on partage le même goût des voyages et plus récemment de l'escalade, on repart quand tu veux !

De **Lucie**, voisine d'internat, qui m'a si gentiment accueillie en arrivant à Marseille.

De **Maude**, **Léa**, et **Estelle** mes premières et irréductibles copines marseillaises qui ne sont pas marseillaises (on ne peut pas être parfaites non plus !).

De **Pauline** et **Mélanie**, mes co-internes et co-pines de biochimie. Un trio de choc pour un super choix d'été ! D'ailleurs Pauline, je t'attends toujours pour aller grimper (Christophe aussi, je crois…).

Et de toute notre bande d'amis un peu fous, un peu originaux, et ~~un peu~~ carrément sympa : **Jean-Sé**, le trompettiste, **Damien** et **Loris**, nos chercheurs acharnés, **Jordan**, qui me doit toujours un tour en Mégane RS, **Florence**, une Corse qui a osé aller jusqu'à Paris, **Chloé**, la skieuse passionnée (« on est pas bien là ? »), **Baptiste,** car il faut toujours avoir un ami picard, **Julien**, notre œnologue confirmé, **Thibault** et **Thomas**, nos surfeurs des îles…

D'**Adeline**, rencontrée fortuitement au pavillon Cornil il y a 2 ans, comme quoi l'immuno ça crée des liens. En plus d'être super forte dans ton boulot, tu sais déchiffrer les notices IKEA : chapeau !

De **Cam's**, de **Lulu**, et des tortues, encore une découverte fortuite en Immuno ! (pas les tortues, ça c'est venu après…).

D'**Isabelle** et **David** de Namibie mais aussi de l'Isle-sur-la-Sorgue, et finalement d'un peu partout tellement vous voyagez… On n'aurait pas fait connaissance si l'avion n'avait pas été annulé, si vous n'aviez pas crevé vos pneus au fin fond du désert sans couverture réseau, et si vous n'étiez pas aussi sympa !

Et j'espère avoir toute la vie pour remercier…

Guillaume, pour TOUT ! Médecin multi-fonctions aux multi-projets comme le bricolage, la photographie, les Arduino, la plongée, les avions,…c'est vrai qu'il faut suivre, mais ça en vaut tellement la peine.

Merci à **tous** d'être là, physiquement ou pas, ça compte énormément pour moi…..

Table des matières

Liste des abréviations 3

I. Introduction 4

1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) 4

2. Stratification pronostique des LAM 5

3. Traitements des LAM 6

4. Stratification pronostique des tumeurs solides 6

5. Immunité et Cancer 7

6. Intérêt des biomarqueurs immuns dans les LAM 8

II. Recherche translationnelle de biomarqueurs immuns pronostiques par l'étude des lymphocytes Natural Killer. 10

1. Les lymphocytes Natural Killer (NK) 10

2. Maturation des lymphocytes NK 10

3. Activation des lymphocytes NK 11

4. Les récepteurs NK 11

5. Les Natural Cytotoxicity Receptor (NCR) 12

a. Découverte des NCR 12

b. Ligands des NCR 12

c. NCR et évolution des espèces 13

6. Surveillance antitumorale par les lymphocytes NK 14

7. Altération de l'expression des NCR dans les LAM 14

a. Etude princeps en 2002 14

b. Cohorte prospective 2002-2005 15

c. Cohortes IPC 2007 – 2012 et GOELAMS 17

1. NKp30, un biomarqueur immun pronostique au diagnostic[39] 17

2. NKp46, un biomarqueur immun prédictif de réponse à l'allogreffe[40] 18

d. Translation en routine hospitalière 19

8. Conclusion 20

III. Les lymphocytes T dans l'immunité antitumorale 21

1. Synapse immunologique 21

2. Différenciation des lymphocytes T 22

3. Les lymphocytes T régulateurs 22

4. Les lymphocytes cytotoxiques T $CD8^+$ et T γδ 23
5. Conclusion 24
IV. Nouvelle approche multiparamétrique dans la recherche de biomarqueurs immuns ... 25
1. Matériel et méthodes 26
a. Principe de la cytométrie de masse 26
b. Echantillons 27
c. Protocole de marquage 27
1. Préparation des cellules 27
2. Marquages 28
3. Acquisition 28
4. Traitement des données 28
2. Résultats 29
a. Fenêtrage des populations d'intérêt 29
b. Anomalies NK 29
1. Activation et inhibition NK 29
2. Maturation NK 30
c. Anomalies T 31
1. Différenciation des T 31
2. Récepteurs de co-signalisation sur les T $CD8^+$ 31
3. Lymphocytes T régulateurs 32
3. Discussion 33
4. Conclusion 36
V. Bibliographie 37
Annexe 1 : Panels d'anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie de masse. 42
Annexe 2 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de flux (BD FACSCanto II®). 43

Liste des abréviations

CD : Cluster de différenciation

CM : Central Mémoire

DMSO : Diméthylsulfoxyde

EDTA : Acide éthylène-diamine-tétraacétique

EFS : Etablissement Français du Sang

ELN : European Leukemia Network

IL : Interleukine

KIR : Récepteurs de type immunoglobuline des cellules tueuses

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

NCR : Récepteurs de cytotoxicité naturelle

NS : Non significatif

NK: Lymphocytes Natural Killer

OMS : Organisation mondiale de la santé

PBMC : Cellules mononuclées du sang périphérique

PCNA : Proliferative Cell Nuclear Antigen **RC** : Rémission Complète

RPMI : milieu de culture (Roswell Park Memorial Institute)

SVF : Sérum de Veau Fœtal

T_{CM} : Lymphocyte T central mémoire

T_N : Lymphocyte T naïf

TEM : Lymphocyte T Effecteurs Mémoire

TEMH : Lymphocyte T Effecteurs Mémoire Helper

TEMRA : Lymphocyte T Effecteurs Mémoire RA

TLR : Toll Like Receptor

VS : Volontaire Sain

Table 1 : Classification morphologique des LAM par le groupe coopératif Franco-Américain-Britannique,1976. (D'après Bennett *et al*[2])

FAB	Intitulé	Fréquence (%)
M0	LAM avec différenciation minime	2%
M1	LAM sans maturation	20%
M2	LAM avec maturation	30%
M3	LA promyélocytaire	10%
M4	Leucémie myélomonocytaire aiguë	15%
M5	LA monoblastique	15%
M6	érythroleucémie	5%
M7	LA mégacaryocytaire	2%

Table 2 : Classification 2016 de l'Organisation Mondiale de la Santé des leucémies aiguës myéloïdes (D'après Arber *et al*[3])

AML avec anomalies cytogénétiques récurrentes	LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; RUNX1 - RUNX1T1
	LA promyélocytaire avec PML - RARA
	LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16 ;16) (p13.1q22) ; CBFB - MYH11
	LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; MLLT3 - KMT2A (MLL)
	LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; DEK - NUP214
	LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; GATA2, MECOM
	LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; RBM15 - MKL1
	LAM avec mutation NPM1
	LAM avec mutation bi allélique CEBPA
	Entités provisoires : LAM avec BCR-ABL1
	Entités provisoires : LAM avec mutation RUNX1
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies	Soit faisant suite à un syndrome myélodysplasique ou un syndrome myéloprolifératif/dysplasique Soit avec anomalie(s) cytogénétique(s) de syndrome myélodysplasique
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie	
LAM sans autres spécifications par ailleurs	LA Myéloblastique avec différenciation minime
	LA Myéloblastique sans maturation
	LA Myéloblastique avec maturation
	LA myélomonocytaire
	LA monoblastique / monocytaire
	LA érythroïde pure
	LA mégacaryoblastique
	LA Myéloblastique à composante basophile
	LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
Sarcome granulocytaire	
Prolifération myéloïde associée à la Trisomie 21 constitutionnelle	

I. Introduction

L'incidence mondiale des cancers ne cesse d'augmenter, avec près de 14 millions de nouveaux cas en 2012, dont 355 000 en France. Durant cette même année, les cancers sont également responsables de 8 millions de décès dans le monde, dont 148 000 en France[1]. Les cancers sont donc aujourd'hui un véritable enjeu de santé publique. A la différence des tumeurs solides, les formes de cancer les plus fréquentes qui peuvent se développer dans n'importe quel tissu, les hémopathies représentent 10% des cancers diagnostiqués en France et sont une spécialité à part entière en oncologie. Dans le cadre de cette étude, nous traiterons des leucémies aigues myéloïdes (LAM), la première hémopathie aiguë de l'adulte avec près de 3000 nouveaux cas par an en France[1].

1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

Les LAM regroupent un ensemble hétérogène d'hémopathies, toutes définies par la prolifération maligne de progéniteurs des cellules sanguines, présentant un blocage de maturation, c'est-à-dire ayant perdu leur capacité de différenciation. L'accumulation dans la moelle osseuse de ces blastes leucémiques affecte la production physiologique des éléments figurés du sang. L'hématopoïèse n'étant plus efficace, des cytopénies parfois profondes apparaissent, comme par exemple thrombopénie, neutropénie et/ou anémie. La symptomatologie en lien avec ces cytopénies peut être plus ou moins marquée : syndrome hémorragique, infectieux ou anémique, amenant le patient à consulter et effectuer un bilan biologique. L'anémie et la thrombopénie sont fréquemment retrouvées mais le nombre de leucocytes varie quant à lui : de la leucopénie franche avec neutropénie à l'hyperleucocytose majeure avec blastes circulants.

Le diagnostic de LAM repose sur l'examen cyto-morphologique de la moelle osseuse et du sang, ainsi que la numération des blastes (supérieur à 20%) dans la moelle osseuse. L'analyse morphologique des blastes a donné lieu à une première classification en 1976[2] en 7 catégories de LAM [Table 1].

Plus récemment, cette analyse a été complétée par l'étude de marqueurs immunophénotypiques, et surtout de la génétique, pour former la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) des néoplasies myéloïdes et leucémies aigues[3]. Revue en 2016, cette classification

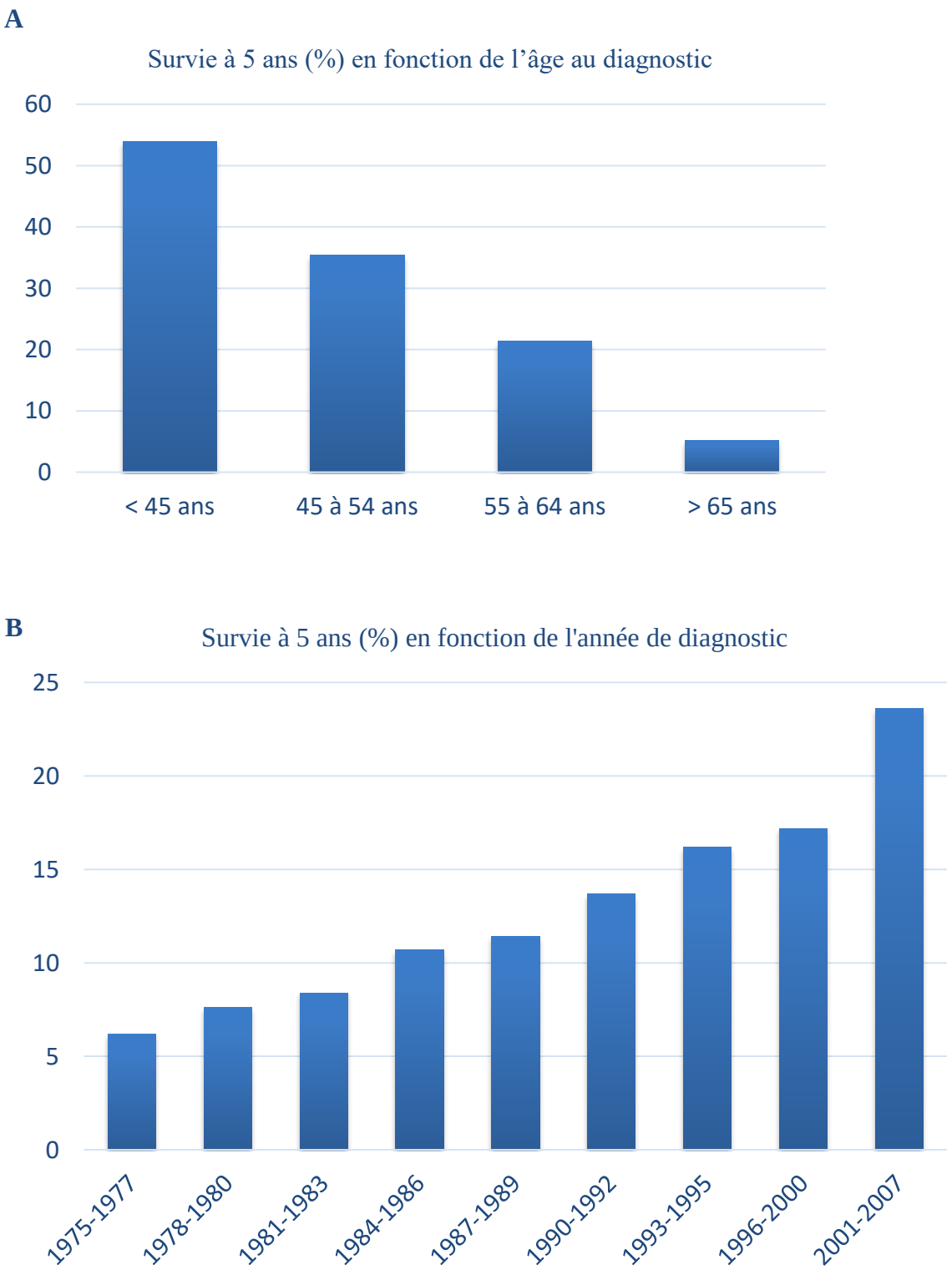


Figure 1 : **Survie dans les LAM**.
Survie à 5 ans des patients atteints de LAM en fonction de l'âge au diagnostic (**A**). Evolution de la survie moyenne des patients à 5 ans, tout âges confondus, en fonction de l'année de diagnostic, de 1977 à 2007 (**B**). (D'après la SEER Cancer Statistics Review 1975-2008[4]).

illustre bien la complexité et l'hétérogénéité des hémopathies regroupées dans l'appellation leucémie aiguë myéloïde [Table 2].

2. Stratification pronostique des LAM

Il a été largement démontré que l'âge des patients au diagnostic de LAM est un facteur pronostic indépendant, avec une moins bonne survie pour les patients les plus âgés. Ainsi d'après les données de l'Institut national du cancer aux Etats-Unis[4] recueillies entre 2000 et 2007, la survie à 5 ans chute de 53,9% pour les moins de 45 ans à 5,2% pour les plus de 65 ans (Figure 1A). Les données statistiques des années antérieures, remontant jusqu'à 1975, montre que les progrès médicaux, ont permis d'améliorer la survie à 5 ans de tous les patients confondus de 6,2% en 1975 à plus de 23% au début du 21^{e} siècle (Figure 1B). Un plus grand nombre de patients atteignent donc la rémission complète, mais en conséquence un plus grand nombre vont également rechuter. C'est pourquoi il est nécessaire de trouver des outils performants pour évaluer le risque de rechute chez les patients. Le développement de la génétique puis des techniques de biologie moléculaire ont permis d'identifier des anomalies corrélées à la survie des patients.

Initialement les analyses cytogénétiques ont permis de stratifier les patients en 3 groupes : Favorable, Intermédiaire et Défavorable, en fonction des anomalies cytogénétiques acquises, dépistées au diagnostic. La biologie moléculaire a permis d'affiner cette classification avec la recherche de mutation sur les gènes CEBPα, NPM1, FLT3, et plus récemment des gènes ASXL1, RUNX et TP53 pour les patients du groupe intermédiaire. Lorsque les patients présentent une mutation NPM1 ou CEBPα bi-allélique en l'absence de mutation FLT3-ITD^{high} ils sont reclassés dans le groupe favorable. Ceux ayant une mutation FLT3-ITD^{high} quel que soit leur statut NPM1 et CEBPα sont maintenus dans le groupe intermédiaire. Des mutations portant sur ASXL1, RUNX ou TP53 entrainent le reclassement de ces patients du groupe de pronostic intermédiaire dans celui de mauvais pronostic [Table 3]. Récemment revue par l'European Leukemia Network (ELN)[5] et illustrée en Figure 2, cette stratification permet ensuite d'orienter la prise en charge des patients.

Table 3 : Stratification pronostique selon l'European Leukemia Network (D'après Döhner *et al*[5])

Catégorie de risque	Anomalies génétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); RUNX1-RUNX1T1 inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); CBFB-MYH11 Muation NPM1 sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD^{low} Mutation bi-allélique CEBPA
Intermédiaire	Mutation NPM1 et FLT3-ITD^{high} NPM1 non muté sans FLT3-ITD ou avec FLT3-ITD^{low} (sans anomalies génétiques défavorables) t(9;11)(p21.3;q23.3); MLLT3-KMT2A Anomalies cytogénétiques noon classées en favorable ou défavorable.
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); DEK-NUP214 t(v;11q23.3); réarrangement KMT2A t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1 inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2,MECOM(EVI1) 25 ou del(5q); 27; 217/abn(17p) Complex karyotype, monosomal karyotype NPM1 non muté et FLT3-ITD^{high} Mutation RUNX1 Mutation ASXL1 Mutation TP53

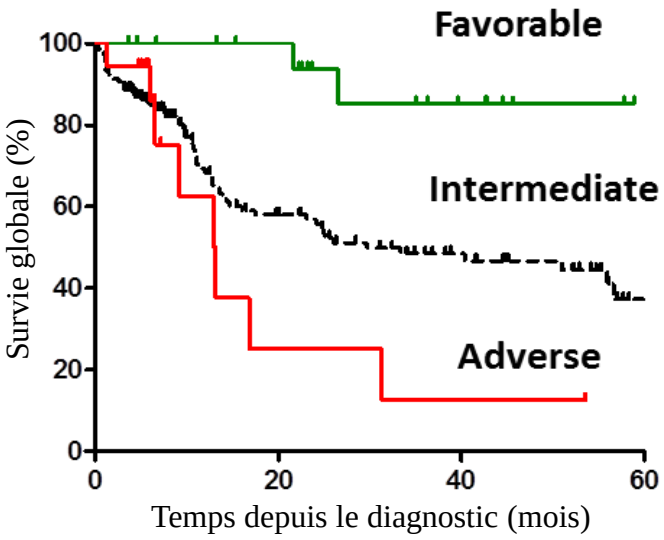


Figure 2 : **Courbe de survie des patients atteints de LAM selon la stratification pronostique de l'ELN** présentée en Table 3 (Chretien *et al*[39])

3. Traitements des LAM

Les patients sont traités par chimiothérapie, avec une première phase d'induction très agressive qui vise à obtenir une rémission complète (RC) rapidement. Cette phase, selon un schéma « 3+7 », consiste à administrer une anthracycline pendant 3 jours et de la cytarabine pendant 7 jours continus[6]. Si les patients ne peuvent pas être traités intensivement, des alternatives sont proposées [Table 4]. La seconde phase du traitement, composée de cytarabine à dose intermédiaire (IDAC) est une phase de consolidation pour assurer une rémission prolongée. Durant cette phase, les patients de mauvais pronostic sont considérés comme à haut risque de rechute, c'est pourquoi l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est recommandée dès l'obtention de la rémission complète. Cependant cette thérapeutique ne peut être proposée à tous les patients car les patients âgés ou ayant des comorbidités ne sont pas éligibles à la greffe. La greffe est par ailleurs conditionnée par l'existence d'un donneur compatible, et le conditionnement du patient pour recevoir le greffon a une toxicité importante, avec environ 30% de décès post-greffe liés au traitement en lui-même[7]. Concernant les patients de pronostic intermédiaire, il a été montré une hétérogénéité importante au sein du groupe ; en effet certains d'entre eux vont rechuter rapidement alors que d'autres maintiendront une rémission complète plus prolongée. C'est pourquoi la prise en charge thérapeutique de ces patients n'est pas encore consensuelle. Pour les patients de bon pronostic, la greffe n'apporte pas de bénéfice en termes de survie, la chimiothérapie est suffisante pour induire une rémission complète prolongée.

L'indication de greffe est donc clairement établie pour les patients de mauvais pronostic, et clairement écartée pour ceux de bon pronostic, mais reste discutable pour ceux se situant dans le groupe de pronostic intermédiaire, qui représentent près de 50% des patients atteints de LAM. C'est pourquoi, une meilleure évaluation du risque de rechute chez ces patients, et donc d'un bénéfice potentiel de l'allogreffe de CSH, est nécessaire.

4. Stratification pronostique des tumeurs solides

La stratification pronostique des patients est aussi une issue majeure dans de nombreux cancers. La classification internationale TNM est la plus utilisée dans les tumeurs solides[8]. Elle permet d'apprécier la taille de la tumeur (T), l'envahissement ganglionnaire (N) et les métastases (M). Ces éléments, bien que très importants pour la prise en charge du patient, ne prennent pas en compte un certain nombre de paramètres, comme le micro-environnement

Table 4 : Stratégie de prise en charge des patients atteints de LAM selon les recommandations de l'European Leukemia Network (D'après Döhner *et al*[5])

Patients éligibles à la chimiothérapie intensive	
Thérapie d'induction (tout âges)	3 jours d'anthracycline IV : daunorubicine ; idarubicine ; ou mitoxantrone, et 7 jours d'IV continue de cytarabine.
Thérapie de consolidation pour les **patients jeunes** (18-60/65 ans)	
• anomalies génétiques favorables	2-4 cycles de cytabarine à dose intermédiaire (IDAC)
• anomalies génétiques intermédiaires	Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) 2-4 cycles d' IDAC Thérapie forte dose et autogreffe de CSH
• anomalies génétiques défavorables	Greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH)
Thérapie de consolidation pour les **patients âgés** (> 60/65 ans)	
• anomalies génétiques favorables	2-3 cycles d'IDAC
• anomalies génétiques intermédiaires et défavorables	Efficacité non établie de la thérapie de consolidation intensive ; considérer la greffe allogénique de CSH chez les patients ayant de faibles comorbidités, ou proposer études cliniques expérimentales.
Patients non candidats à la chimiothérapie intensive	
Azacitidine, ou Décitabine, ou cytarabine faible dose, hydroxyurée, soins de support	
Patients non répondeurs au premier cycle d'induction ou en rechute, éligibles à la chimiothérapie invensive.	
IDAC	Cytarabine à dose intermédiaire avec ou sans idarubicine, daunorubicine, mitoxantrone.
FLAG-IDA	Fludarabine, Cytarabine, Idarubicine, et G-CSF.
MEC	Mitoxantrone Etoposide Cytarabine
Greffe allogénique de CSH	à considérer pour les patients réfractaires primaines, ou en deuxième rémission complète.

tumoral. Dans ce micro-environnement, sont présentes des cellules immunitaires dont les interactions extrêmement complexes avec les cellules tumorales semblent jouer un rôle majeur dans le processus tumoral. Afin d'empêcher leur destruction par les cellules immunes, les cellules tumorales induisent une immunosuppression en exprimant des signaux inhibiteurs qui rendent notamment les lymphocytes cytotoxiques dysfonctionnels[9]. Ainsi pour améliorer la stratification des patients atteints de cancer colorectal, J. Galon *et al* ont proposé le concept d'Immunoscore[10]. En caractérisant les populations immunes infiltrant les tumeurs dans une large cohorte de patients atteints de cancer colorectal, Galon *et al* ont montré qu'une faible réponse immunitaire *in situ* est associée à un moins bon pronostic. Ce concept est également en cours de développement dans d'autres cancers comme le mélanome[11] et le cancer du poumon non à petites cellules[12].

En 2015, Gentles *et al*[13] publiaient une méta-analyse s'intéressant aux signatures transcriptomiques d'un très large panel de tumeurs et d'hémopathies, et notamment aux leucocytes présents dans les tumeurs. Ils ont pu identifier des associations complexes entre 22 sous-populations immunes retrouvées dans les tumeurs et la survie. De manière intéressante, la présence de certaines populations est corrélée avec un gain de survie, mais d'autres semblent avoir un rôle défavorable et sont associées à une moins bonne survie.

5. Immunité et Cancer

Durant les dernières décennies, les connaissances à propos de la biologie du cancer ont été révolutionnées. Les cellules tumorales développent des caractéristiques particulières, décrites notamment par Hanahan *et al*[14] en 2011, en faveur de leur survie, de leur prolifération et de leur dissémination, mais aussi d'échappement au système immunitaire (Figure 3). Cette dernière caractéristique a été plus largement décrite avec la théorie des « 3 E » (Figure 4). L'immuno-editing[15] est un processus dynamique pouvant être décomposé en trois phases : l'élimination, l'équilibre et l'échappement. Durant la phase d'élimination, les cellules de l'immunité innée et adaptative agissent en synergie pour détruire les cellules transformées. L'élimination est ainsi un processus continu empêchant le développement de cancer. Néanmoins, de rares clones peuvent échapper à l'élimination et entrent alors en phase d'équilibre. Lors de cette phase, les interactions entre cellules immunes et cellules tumorales en dormance induisent une modification de l'immunogénicité des cellules tumorales. La pression de sélection finit par promouvoir l'émergence de clones tumoraux ayant acquis des mutations leur permettant

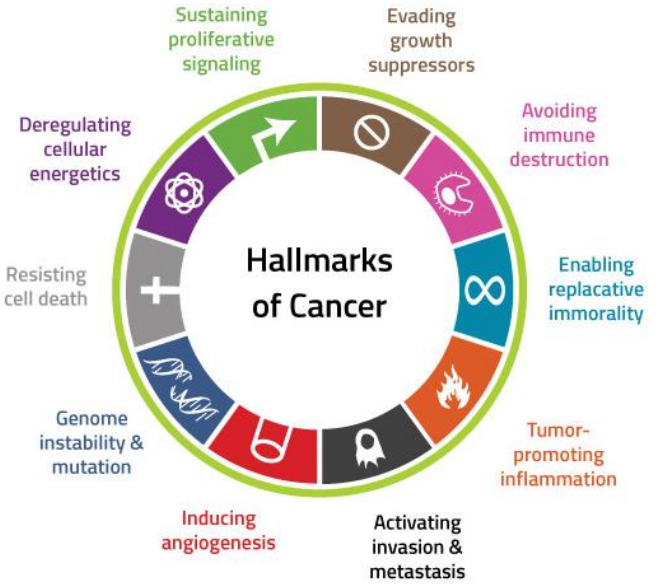


Figure 3 : Caractéristiques du cancer
(Hanahan *et al*[14])

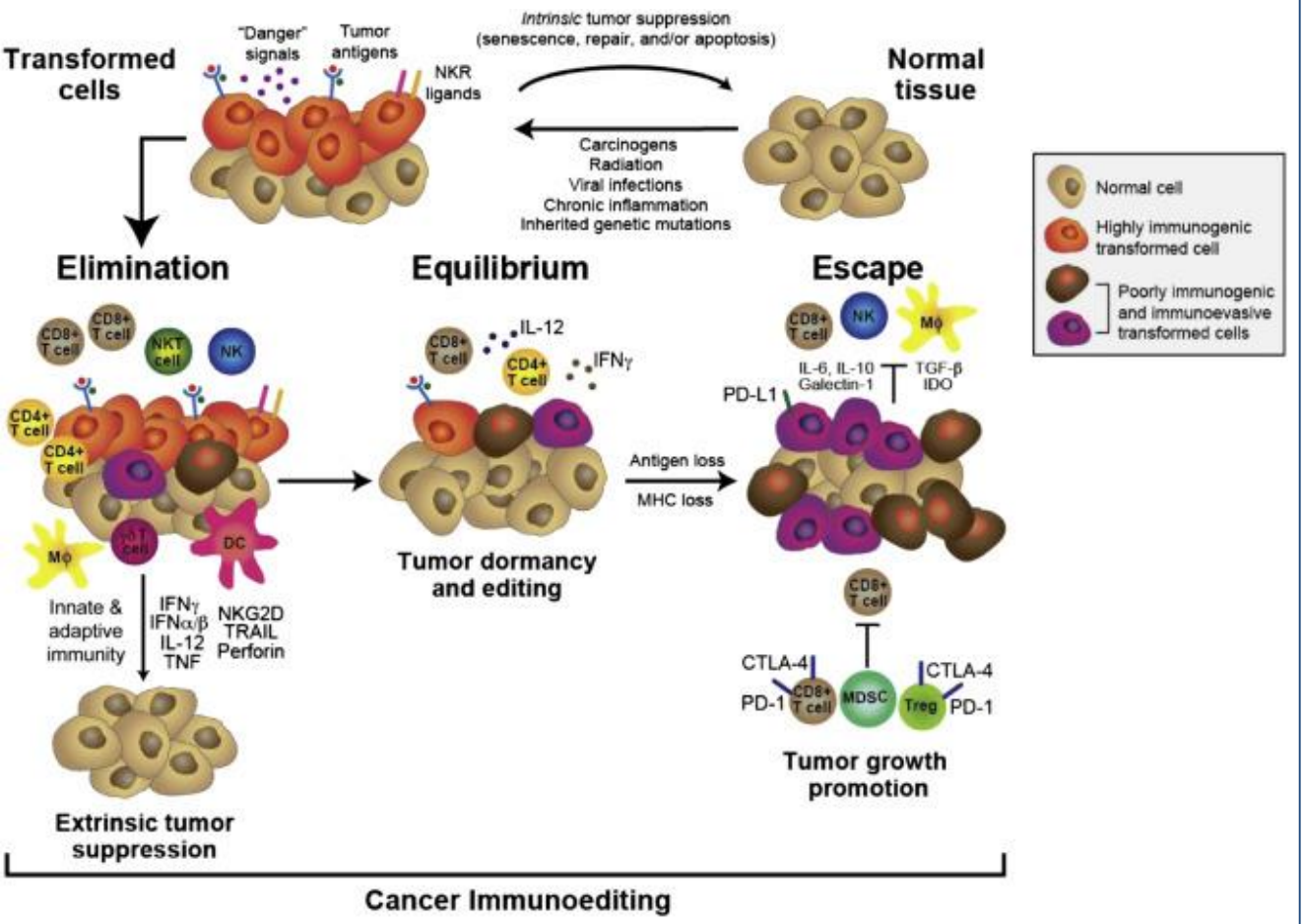


Figure 4 : **L'immuno-editing.**
Principe de l'immuno-editing, décomposée en 3 étapes d'élimination, équilibre et échappement.
(Schreiber *et al*[15])

d'échapper à l'immunosurveillance. Devenus insensibles aux effecteurs immuns, ces clones peuvent alors induire un état d'immunosuppression au sein du microenvironnement tumoral. C'est la phase d'échappement, avec une forte progression tumorale. Elle correspond à l'apparition clinique de la maladie.

Différentes populations immunes sont impliquées dans l'immuno-editing. La phase d'élimination met en jeu l'immunité innée, avec les lymphocytes Natural Killers (NK), et l'immunité adaptative, avec les lymphocytes T cytotoxiques, mais aussi les lymphocytes T γδ, qui sont à l'interface entre ces deux types d'immunité. Les lymphocytes T, avec la sécrétion d'Interleukine 12 et d'interféron gamma semblent être les acteurs majeurs de la phase d'équilibre. Finalement, la phase d'échappement aboutit au recrutement de certaines populations immunosuppressives, comme les lymphocytes T régulateurs (T reg) ou les cellules myéloïdes suppressives (MDSC)[16] (Figure 5).

6. Intérêt des biomarqueurs immuns dans les LAM

Le principe de l'immunoscore développé par Galon *et al*[10] pour les tumeurs solides n'existe pas encore pour les LAM. Néanmoins, l'efficacité de l'allogreffe de CSH dans les LAM, avec notamment la recherche d'un effet « graft versus leukemia »[17], c'est à dire une lyse des cellules leucémiques par les cellules immunes du donneur démontre qu'il s'agit bien d'un cancer « immunosensible ». L'allogreffe reste tout de même un traitement de dernier recours, où le système immunitaire du malade est complètement remplacé par celui d'un donneur sain. L'efficacité de cette thérapeutique pour les patients de mauvais pronostic suggère donc que ces patients ont des altérations immunes plus importantes que les patients de bon pronostic, pour lesquels l'allogreffe n'apporte justement pas d'efficacité supplémentaire à celle de la chimiothérapie.

Plusieurs approches sont possibles pour étudier ces altérations immunes. Classiquement, l'étude phénotypique au cas par cas des populations immunes a permis d'identifier des marqueurs d'intérêt permettant de discriminer les patients de bon et de mauvais pronostics, qui seront discutés dans la première partie de cette étude.

Plus récemment, l'avènement de la cytométrie de masse multiparamétrique, que nous aborderons dans une seconde partie, a transformé la recherche de biomarqueurs immuns. En partant d'un unique échantillon de cellules mononuclées du sang périphérique, il est maintenant

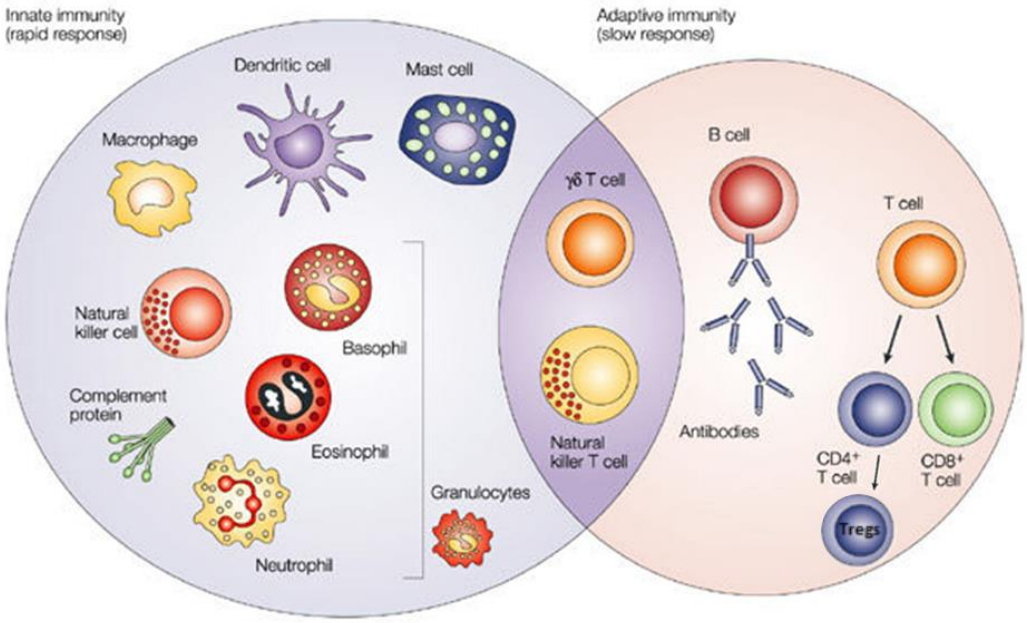


Figure 5 : **Les différentes populations de l'immunité innée et adaptative.**
(Adaptée d'après Dranoff *et al*[16])

possible d'observer simultanément près de 40 marqueurs différents[18]. Le jeu de données considérable ainsi généré permet d'établir une cartographie très précise des cellules immunes des patients, mais également d'en extraire des signatures immunologiques pronostiques, en mettant ces données en regard de l'évolution clinique des patients.

II. Recherche translationnelle de biomarqueurs immuns pronostiques par l'étude des lymphocytes Natural Killer.

A l'interface entre immunité innée et immunité adaptative, les lymphocytes Natural Killer (NK) sont des acteurs privilégiés de la surveillance immune face aux infections et aux cancers. L'étude approfondie de cette population immunitaire depuis plus de 40 ans, dans le contexte tumoral notamment, a permis d'identifier des éléments clés de l'immunosurveillance qui ont récemment abouti au développement de biomarqueurs pronostiques dans les LAM, utilisables en pratique clinique.

1. Les lymphocytes Natural Killer (NK)

Les cellules NK sont de grands lymphocytes granuleux qui représentent environ 10% des lymphocytes totaux circulant, et qui sont également présents dans les organes lymphoïdes secondaires, dans les tissus périphériques sains comme le foie, les poumons, l'utérus, mais aussi les tissus tumoraux. Ils sont classés parmi les lymphocytes en raison de leur ressemblance morphologique avec les lymphocytes cytotoxiques, de l'expression de marqueurs lymphoïdes, et de leur origine commune avec les lymphocytes T, grâce à un progéniteur lymphoïde commun (CLP). Néanmoins, les NK ont été récemment regroupés au sein des « cellules lymphoïdes innées » (Innate Lymphoid cells ou ILCs), des effecteurs principalement tissulaires de l'immunité innée.

2. Maturation des lymphocytes NK

Les lymphocytes NK se définissent phénotypiquement par l'absence d'expression du CD3 et par l'expression du CD56 ($CD3^-$ $CD56^+$). Les lymphocytes NK exprimant fortement le CD56 ($CD56^{bright}$) sont les plus immatures, ils ont un relativement faible pouvoir cytotoxique mais une forte capacité sécrétrice de cytokines suite à une stimulation. La maturation NK est corrélée à une diminution d'expression du CD56, ce qui aboutit à la population circulante majoritaire des NK $CD56^{dim}$. Au cours de la maturation, les lymphocytes NK perdent leur capacité sécrétrice et proliférative au profit du développement de leurs fonctions cytotoxiques, en étant activés par des cytokines, et éduqués pour reconnaitre les cellules cibles. Cette éducation passe par l'acquisition de récepteurs permettant la reconnaissance des cellules du soi, comme par

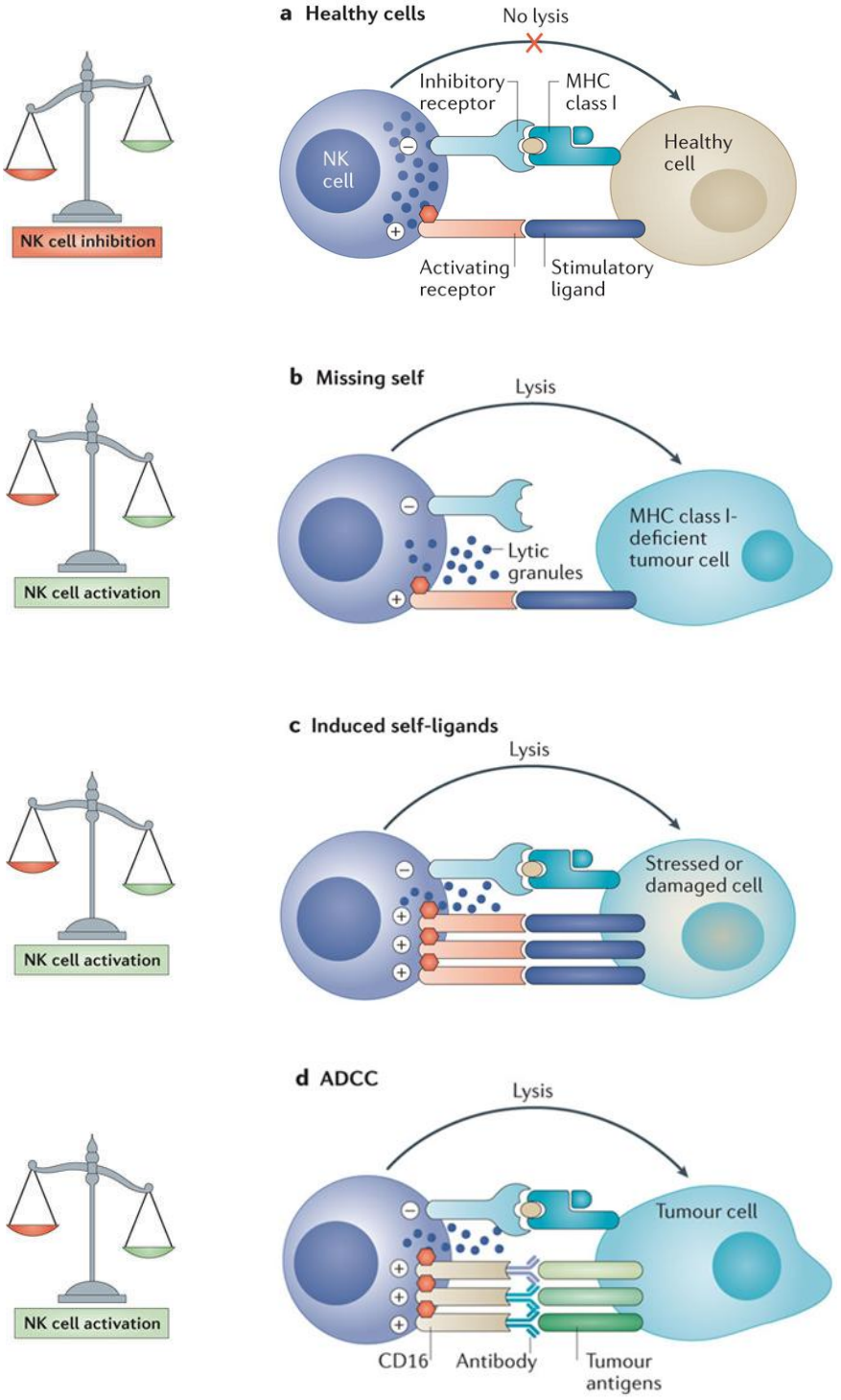


Figure 6 : Mécanismes d'activation des lymphocytes NK (adaptée d'après Vivier *et al*[20] et Morvan *et al*[21]) (**a**) La balance de signaux délivrés par les récepteurs activateurs et inhibiteurs régule la reconnaissance des cellules saines par les NK. (**b**) Les cellules tumorales qui sous-expriment le complexe majeur d'histocompatibilité CMH de classe I sont détectées comme « non soi » et lysées par les NK. (**c**) Les cellules tumorales peuvent surexprimer des ligands induits par le stress, qui sont reconnus par les récepteurs activateurs NK, et qui surpassent les signaux inhibiteurs, entrainant la lyse de la cellule cible. (**d**) Les anticorps dirigés contre des antigènes tumoraux se lient au NK par le CD16 et entraine une cytotoxicité NK dépendante des anticorps (ADCC)

exemple les récepteurs KIR qui reconnaissent les molécules HLA, pour empêcher une auto-réactivité. La maturation terminale des lymphocytes NK s'accompagne de l'expression du marqueur CD57[19].

3. Activation des lymphocytes NK

L'engagement des fonctions des lymphocytes NK est la conséquence d'un déséquilibre entre signaux activateurs et inhibiteurs. Dans des conditions physiologiques, les lymphocytes NK reconnaissent les molécules HLA par leurs récepteurs inhibiteurs KIR, ce qui empêche la lyse de la cellule cible. Dans des conditions pathologiques (stress, infection, transformation) la cellule cible peut sous-exprimer le HLA, ou encore sur-exprimer des ligands activateurs, entrainant une diminution des signaux inhibiteurs relativement aux signaux activateurs reçus par le lymphocyte NK. L'activation du lymphocyte NK se traduit alors par la dégranulation de granules intracytoplasmiques contenant essentiellement de la perforine et du granzyme, qui lysent la cellule cible, ainsi que la sécrétion d'IFNγ pour recruter et activer d'autres cellules immunes[20]. Une autre forme de cytotoxicité, dépendante des anticorps fixés à des antigènes sur la cellule cible et mettant en jeu le récepteur CD16 sur le lymphocyte NK qui reconnait la partie constante Fc de l'anticorps est également possible[21] (Figure 6).

4. Les récepteurs NK

Une grande variété de molécules sont exprimées à la surface des lymphocytes NK, régulant étroitement leurs fonctions. Ces molécules peuvent être regroupées en quatre principales catégories : les récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs, les molécules d'adhésion, et les récepteurs aux cytokines et chimiokines. Les lymphocytes NK sont régulés négativement par les récepteurs inhibiteurs comme les KIR et NKG2A/CD94 qui reconnaissent les molécules du HLA[22], et positivement par les récepteurs activateurs et les récepteurs aux cytokines. Les récepteurs aux cytokines sont très impliqués dans la maturation des cellules NK. Leur activation permet de stimuler la prolifération des NK, mais aussi leurs fonctions cytotoxiques et sécrétrices d'autres cytokines comme l'IFNγ. Par exemple, on retrouve un ensemble de récepteurs couplés à la chaine commune gamma (γc) comme le récepteur à l'IL-2 (IL-2R), à l'IL-15 (IL-15R), à l'IL-21 (IL-21R) ou encore d'autres familles de récepteurs comme l'IL-1R ou l'IL-12R.

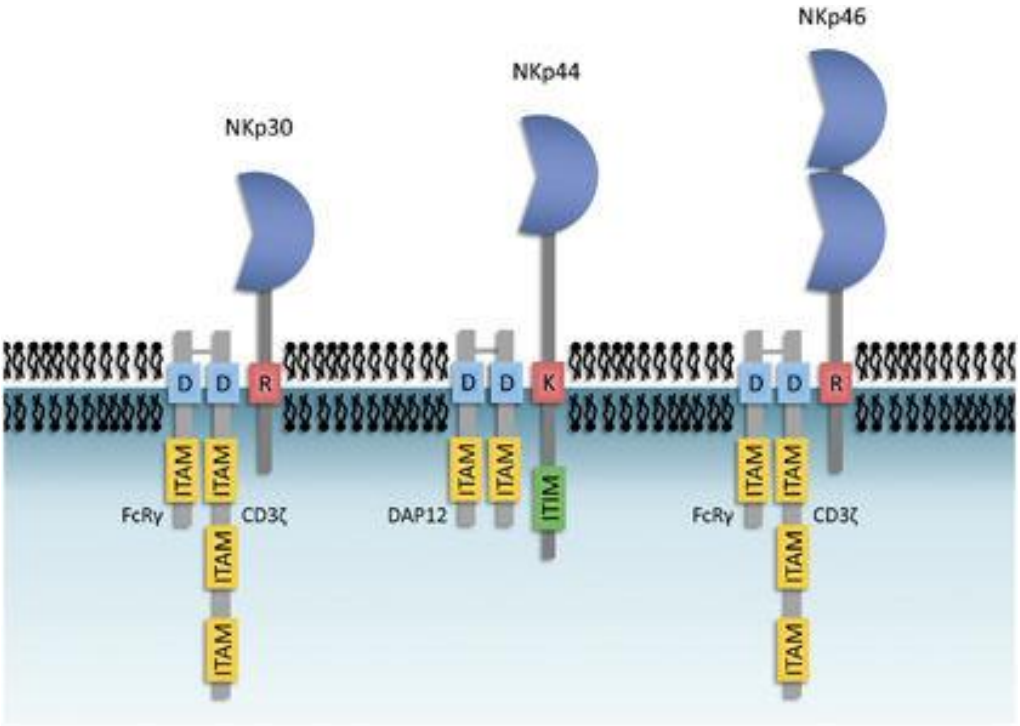


Figure 7 : Représentation des trois NCR NKp30, NK44 et NKp46
NKp30 et NKp44 possèdent un seul domaine extramembranaire Ig like, contrairement à NKp46 qui en a deux. NKp30 et NKP46 possèdent de longs domaines intra-cellulaires, composés de motifs ITAM. (Kruse *et al*[26]).

De nombreux récepteurs activateurs exprimés par les lymphocytes NK ont été décrits, comme DNAM-1, NKG2D, CD16, ou encore certains récepteurs KIR activateurs. Néanmoins, dans le contexte d'immuno-oncologie, nous nous intéresserons par la suite plus particulièrement aux « natural cytotoxicity receptors » (NCR), des récepteurs activateurs NK. Les NCR sont des récepteurs membranaires appartenant à la superfamille des Immunoglobulines, associés à des protéines adaptatrices pour transduire le signal intracellulaire. Trois principaux récepteurs ont été identifiés dans cette famille : NKp46 (NCR1 ou CD335), NKp44 (NCR2 ou CD336) et NKp30 (NCR3 ou CD337).

5. Les Natural Cytotoxicity Receptor (NCR)

a. Découverte des NCR

L'équipe du Dr Moretta à l'Université de Gênes en Italie a successivement mis en évidence les trois NCR. NKp46 est le premier NCR découvert, en 1997. Dans une étude de criblage d'anticorps monoclonaux conçus dans un modèle murin, pour induire une cytotoxicité NK, l'un d'entre eux, BAB281, permet d'identifier un nouveau marqueur de surface de 46kD, spécifique des NK, qui sera donc dénommé NKp46[23]. Sur le même principe, un autre récepteur membranaire de 30kD est découvert deux ans plus tard et nommé NKp30 [24]. NKp44 a été identifié en 1998 sur des lymphocytes NK en culture, supplémentée en IL-2[25].

Les NCR ont été initialement regroupés en raison de leur rôle activateur dans la cytotoxicité NK. Néanmoins NKp46 est codé par un gène sur le chromosome 19 inclus dans le complexe des récepteurs leucocytaires où l'on retrouve également les gènes codant pour les récepteurs KIR ; alors que NKp30 et NKp44 sont codés par des gènes du CMH de classe III portés par le chromosome 6. Au niveau protéique, les trois NCR diffèrent par leur séquence en acides aminés, leur structure, et leurs protéines adaptatrices intracytoplasmiques (Figure 7).

b. Ligands des NCR

Les premiers ligands identifiés des NCR sont d'origine virale. La glycoprotéine hémagglutinine-neuraminidase (HN) du virus Sendaï et de la maladie de Newcastle, mais aussi l'hémagglutinine (HA) exprimée à la surface des cellules infectées par le virus de la grippe, sont reconnus par NKp44 et NKp46, mais pas par NKp30 qui reconnait quant à lui la protéine pp65 du cytomégalovirus humain. D'autres ligands bactériens ou dérivés de parasite ont été décrits, comme par exemple le BCG (*Mycobacterium bovis*) reconnu par NKp44, ou encore la

protéine P1 exprimée à la surface des érythrocytes infectés par *Plasmodium falciparum*, qui est reconnue par NKp30 et dans une moindre mesure par NKp46[26].

Contrairement aux ligands d'origine infectieuse, les ligands tumoraux des NCR restent encore mal connus, bien que la découverte des NCR à la fin des années 1990 repose sur leur capacité à tuer des cellules cibles tumorales. Concernant NKp30, deux ligands tumoraux ont été décrits, BAT3 (HLA-B associated transcript 3) également appelé BAG6 (Bcl-2 associated athanogene 6), et B7H6. Localisé dans le noyau des cellules tumorales, BAT3 semble impliqué dans la réponse médiée par p53, au stress cellulaire, aux dommages de l'ADN, et dans l'apoptose. B7H6 est le seul ligand exprimé à la surface des cellules tumorales reconnu par NKp30 décrit à ce jour. Ce ligand est également retrouvé sur les monocytes inflammatoires et les polynucléaires neutrophiles activés par les Toll Like Receptor (TLR) ou encore stimulés par des cytokines pro-inflammatoires comme le TNFα. En dehors de conditions inflammatoires, comme le sepsis, B7H6 n'est pas exprimé par les tissus sains[27].

NKp44 reconnait l'antigène PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen), un ligand intracellulaire surexprimé par les cellules tumorales et qui a étonnamment un effet inhibiteur. Physiologiquement, PCNA serait impliqué au cours de la grossesse pour maintenir un état de tolérance immune au niveau de l'utérus vis-à-vis du fœtus, mais ce mécanisme est également adopté par les cellules tumorales, qui en surexprimant ce marqueur visent à échapper à la lyse par les cellules NK[28]. Un autre ligand de NKp44, appelé NKp44-L qui correspond partiellement à la séquence de la protéine MLL5 (Mixed-Lineage Leukemia) a été identifié sur un large panel de cellules tumorales. Le blocage de ce ligand par un anticorps inhibiteur entraine une forte diminution de la cytotoxicité de lymphocytes NK stimulés *in vitro* par de l'IL-2, et illustre ainsi l'importance de cette interaction dans la clairance tumorale[29].

Bien que l'implication directe de NKp46 dans l'éradication de cellules tumorales soit prouvée, les ligands tumoraux de ce récepteur activateur restent à ce jour indéterminés.

c. NCR et évolution des espèces

De manière étonnante, les marqueurs NKp30 et NKp44 ne sont pas exprimés chez la souris, alors que Nkp46 est un gène très conservé chez les mammifères placentaires comme les rongeurs (souris et rats), les ovins, les bovins, les primates (macaques Rhésus et chimpanzés). Quelques modèles de souris transgéniques ont été développées, visant à mieux comprendre le rôle des NK et de NKp46, notamment dans le sepsis, mais ces modèles n'ont pas encore été testés dans le domaine de l'oncologie[30,31].

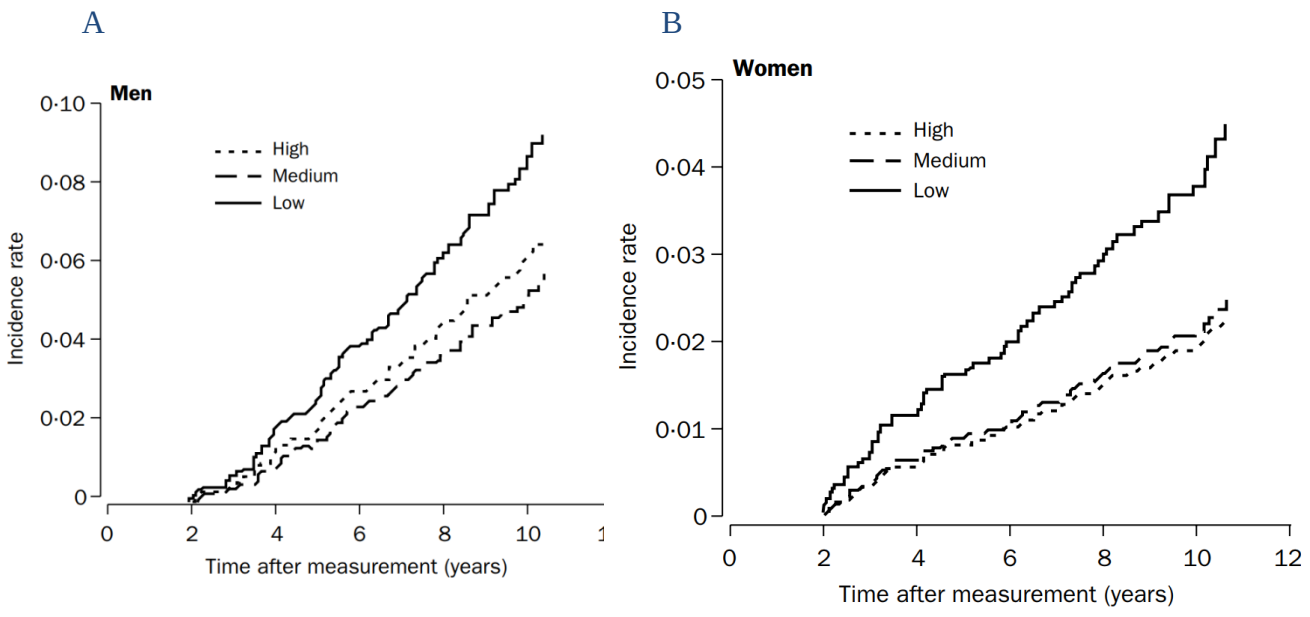


Figure 8 : Lymphocytes cytotoxiques et développement de cancer.
Incidence cumulative des taux de cancer en fonction de l'activité cytotoxique des lymphocytes du sang périphérique pour les hommes (**A**) et les femmes (**B**) (Imai *et al*[32])

6. Surveillance antitumorale par les lymphocytes NK

En 2000, Imai *et al*[32] publiaient les résultats d'une étude prospective de 11 ans auprès de 3625 adultes japonais sains évaluant l'incidence de cancers en regard des fonctions cytotoxiques de leurs lymphocytes. Les volontaires ont été classés en trois catégories en fonction de l'activité cytotoxique de leurs lymphocytes du sang périphérique à l'inclusion, puis suivi pendant 11 ans. Après une analyse multivariée prenant en compte les variables confondantes (âge, consommation d'alcool, de tabac, de légumes verts) il apparaît que les sujets appartenant au groupe dont l'activité cytotoxique est la plus faible développèrent plus de cancers que les autres (Figure 8). Avoir des fonctions cytotoxiques moyennes ou fortes serait donc associé avec un risque réduit de développer un cancer[32].

L'immunosurveillance par les lymphocytes NK en oncologie est un projet de recherche important au Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM), grâce à des collaborations privilégiées entre l'Institut Paoli Calmettes (IPC), centre de lutte contre le cancer à Marseille et l'équipe Immunité et Cancer (Pr D. Olive) ainsi que la plateforme d'Immunomonitoring du CRCM. Ainsi, l'étude des lymphocytes NK de patientes atteintes de cancer du sein, a montré des altérations phénotypiques nettes en faveur de la progression tumorale: une augmentation d'expression des récepteurs inhibiteurs, une diminution d'expression des récepteurs activateurs et des défauts fonctionnels induits par le micro-environnement[33] . Des résultats semblables sont également retrouvés dans les cancers de la prostate, démontrant un échappement des cellules cancéreuses à l'immunité antitumorale médiée par les NK [34,35].

7. Altération de l'expression des NCR dans les LAM

Depuis 2002, l'étude des lymphocytes NK de plusieurs cohortes successives de patients atteints de LAM a mis en évidence des altérations immunes profondes, à la fois phénotypiques et fonctionnelles. Mises en regard des données cliniques, elles ont permis de développer récemment des biomarqueurs immuns pronostiques.

a. Etude princeps en 2002

En 2002, Costello *et al*[36] présentaient leurs résultats sur l'étude phénotypique et fonctionnelle des lymphocytes NK de 18 patients atteints de LAM à l'IPC. Après expansion *in*

vitro des NK supplémentés en IL-2, ils ont montré que 16 patients présentaient un phénotype NCR^{dull} avec une faible expression de NKp46, NKp30 et NKp44, comparé aux volontaires sains, tous NCR^{bright}, ainsi que 2 patients également NCR^{bright}. Le faible échantillonnage de volontaires sains (< 20 donneurs) n'a pas permis de mettre en évidence des phénotypes NCR^{dull}, mais il est décrit dans la littérature qu'un faible pourcentage des volontaires sains exprime peu les NCR[37]. Néanmoins il apparaît clairement que les patients atteints de LAM présentant un phénotype NCR^{dull} sont bien plus fréquents que les volontaires sains.

Dès 1999, la corrélation entre l'expression des NCR et la cytotoxicité des NK avait été établie[37]. Elle est également confirmée sur les 18 patients testés par Costello *et al*[36]. Deux types de cellules cibles ont été testées, une lignée cellulaire de mastocytome murin P815 et les blastes autologues des patients, marqués préalablement au ^{51}Cr. Les NK provenant des 16 patients ayant un phénotype NCR^{dull} se révèlent peu cytotoxiques contre la lignée P815. A l'inverse les NK de deux patients ayant un phénotype NCR^{bright} présentent une activité cytotoxique forte, comparable à celle des volontaires sains NCR^{bright} contre P815. Lorsque les cellules cibles sont des blastes autologues, la cytotoxicité des NK des 18 patients est altérée, même pour ceux étant NCR^{bright}. Concernant les 16 patients ayant des NK NCR^{dull}, un anticorps anti CMH de classe I permet de masquer l'expression du CMH classe I sur le blaste leucémique et d'améliorer la cytotoxicité. De plus un anticorps activateur anti-NKp46 reste sans effet sur la cytotoxicité des NK NCR^{dull}. A l'inverse les NK NCR^{bright} ne sont pas plus cytotoxiques lorsque les blastes sont traités avec un anti-CMH I mais gagnent en cytotoxicité en présence de l'anticorps activateur NKp46. Il semble donc que les blastes de ces deux patients aient développé des mécanismes d'échappement à la cytotoxicité NK différents de ceux des NK NCR^{dull}. En outre les NK NCR^{bright} des patients et des volontaires sains se sont révélés tout à fait capables de détruire les blastes leucémiques des patients ayant des NK NCR^{dull}. D'après cette étude princeps sur un petit groupe de patients prélevés au diagnostic, il y a bien des altérations d'expression des NCR qui se traduisent par un défaut de cytotoxicité NK contre les blastes leucémiques.

b. Cohorte prospective 2002-2005

Afin de confirmer les résultats de Costello *et al*[36], une étude prospective du phénotype NK de 71 autres patients atteints de LAM et suivis à l'IPC entre 2002 et 2005 a été effectuée[38]. Au diagnostic, le phénotype a été réalisé sur PBMC fraiches non cultivées, et a confirmé que les altérations d'expression de NKp30 et NKp46 existent avant toute stimulation *in vitro*. Néanmoins NKp44 n'étant exprimé qu'après stimulation, ce NCR n'était pas détectable ni chez

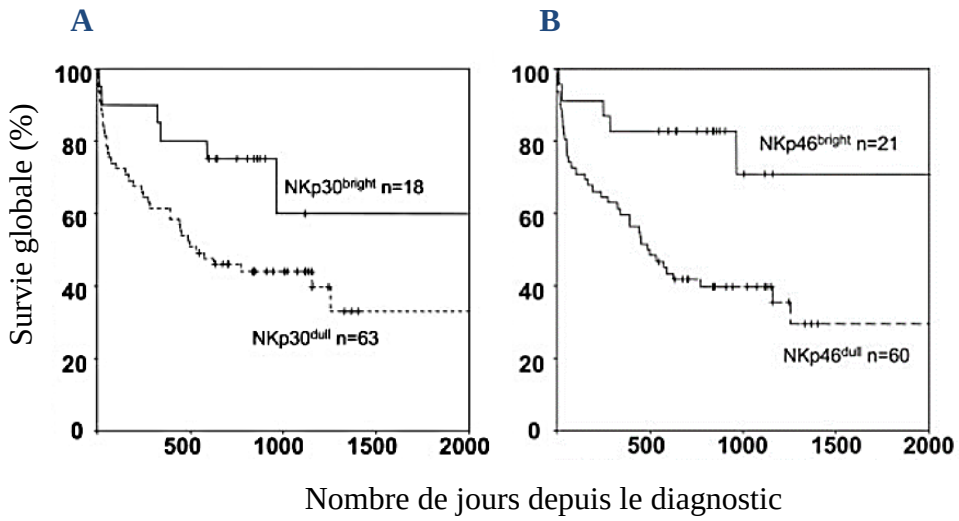


Figure 9 : Courbe de survie en fonction du phénotype des NCR au diagnostic.
Survie globale en fonction du phenotype NKp30 (NKp30^{bright}/Nkp30^{dull}) **(A)** et survie globale en fonction du phénotype NKp46 (NKp46^{bright}/Nkp46^{dull}) (**B**). n correspond au nombre de patients dans chaque branche. (Fauriat *et al*[38])

les volontaires sains ni chez les patients. Le phénotype NCR^{bright} ou NCR^{dull} a donc été établi en fonction de la densité d'expression de NKp30 et NKp46. Parmi les 71 patients, 47 présentaient un phénotype NCR^{dull} et 13 un phénotype NCR^{bright} comme les 23 volontaires sains. 11 patients avaient un phénotype discordant entre la densité d'expression des deux NCR. La survie de ces 71 patients et de ceux présentés dans l'étude de Costello *et al* [36] a été analysée en fonction de leur phénotype Nkp30 ou NKp46 au diagnostic. L'analyse multivariée (modèle de Cox) a permis d'établir une association significative entre l'expression des NCR et la survie, indépendante de l'âge, du sexe, de la formule leucocytaire, de la rechute, et des anomalies cytogénétiques. Par ailleurs, les altérations des NCR ne sont pas non plus associées à un groupe particulier de la classification FAB des LAM présentée précédemment en Table1. La probabilité de survie à 5 ans des patients ayant un phénotype NKp30^{bright} est de 60%, et chute à 33% pour le phénotype NKp30^{dull} (Figure 9A). Les patients ayant un phénotype NKp46^{bright} ont une probabilité de survie à 5 ans de 72%, contre 28% seulement avec un phénotype NKp46^{dull} (Figure 9B). Une faible expression des NCR au diagnostic est donc associée à une moins bonne survie des patients.

La cohorte prospective a également permis d'explorer la cinétique du phénotype des NCR après le diagnostic. Par rapport au diagnostic, l'expression de NKp46 et NKp30 à la rémission complète est significativement augmentée de près de 75% et 65% respectivement. Ainsi on observe une restauration du phénotype des NCR à la rémission, qui est également confirmée par une restauration des fonctions cytotoxiques des NK des patients. Parmi les 71 patients, 6 étaient réfractaires au traitement d'induction et n'ont pas atteint la rémission complète. Le faible nombre de patients limite l'interprétation des résultats, néanmoins 3 d'entre eux n'ont pas restauré leur phénotype NCR après échec d'induction, et deux autres ont présenté une amélioration très partielle, seulement sur l'un des deux NCR.

La réversibilité du phénotype NCR est à nouveau démontrée au moment de la rechute. Les patients ayant rechuté présentent une diminution drastique de l'expression des NCR comparée à celle mesurée au moment de la rémission complète.

Ainsi, au diagnostic, en échec d'induction, ou à la rechute, ce qui dans les trois cas signifie une prolifération blastique chez le patient, le phénotype NCR et les fonctions des lymphocytes NK sont altérés, mais cet état tend à se restaurer à la rémission complète qui est justement définie par l'absence de détection des blastes leucémiques. Fauriat *et al*[38] ont alors analysé l'expression des NCR de NK matures de volontaires sains stimulés en IL-2, mis en co-culture avec des blastes leucémiques provenant de patients ayant un phénotype NCR^{dull}. L'expression

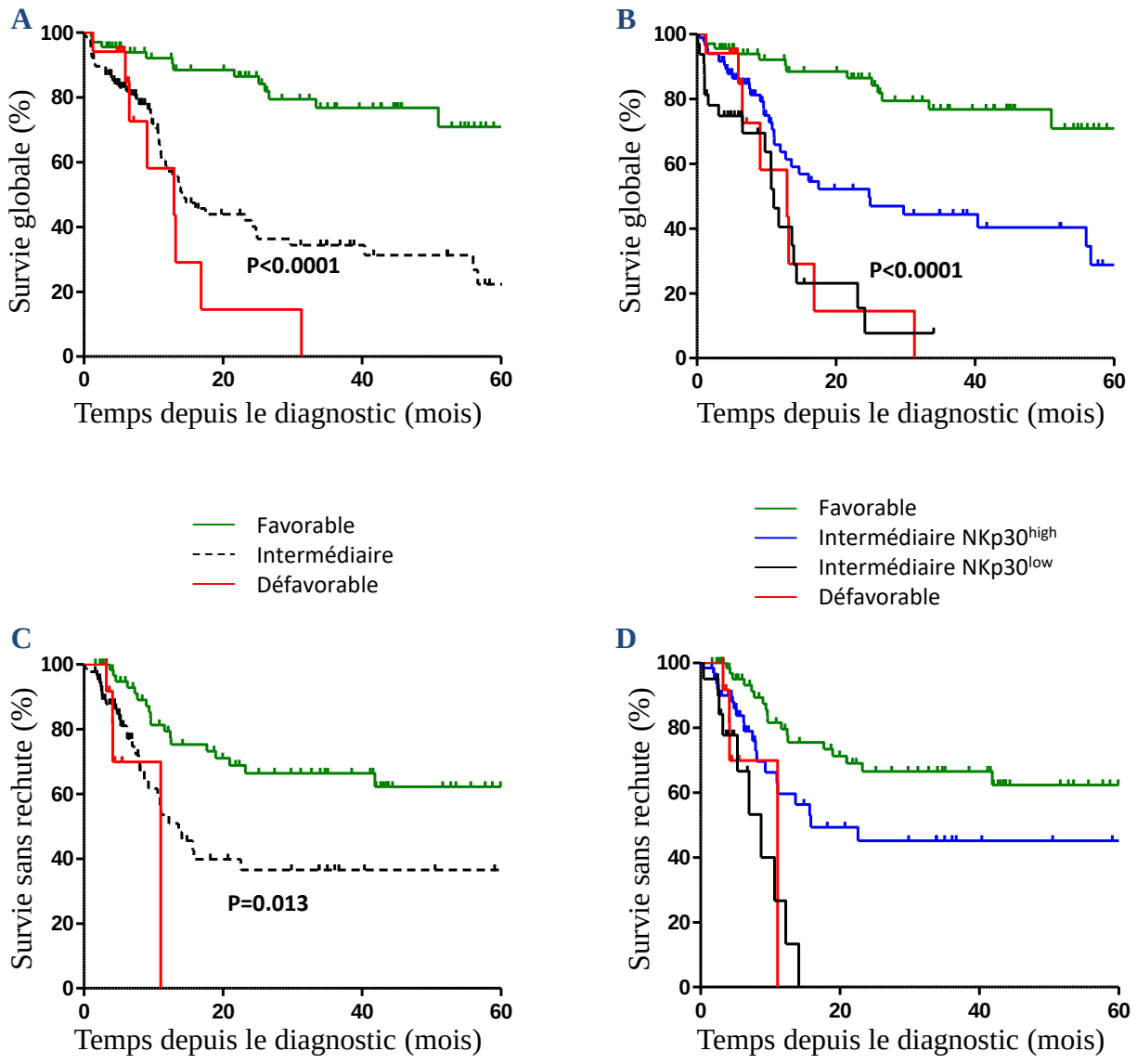


Figure 10 : Stratification pronostique des patients des cohortes GOELAMS et IPC selon l'ELN et le statut NKp30.

Courbes de survie globale **(A)** et de survie sans rechute **(C)** des trois groupes pronostiques favorable, intermédiaire et défavorable, selon l'ELN 2017. Courbes de survie globale **(B)** et de survie sans rechute **(D)** des groupes favorable et défavorable selon l'ELN, avec une stratification du groupe intermédiaire en deux sous-groupes selon le statut NKp30^{high} ou NKp30^{low}. (Chretien *et al*[39])

de NKp30 est significativement diminuée après 24h de co-culture, mais pas celle de NKp46. La même expérience avec des blastes provenant de patients ayant un phénotype NCR^{bright} n'induit pas de diminution de l'expression des NCR sur des NK de volontaires sains. Comme souligné dans l'étude princeps de 2002, ces résultats indiquent qu'un des mécanismes d'échappement au système immunitaire pourraient être une induction du phénotype NCR^{dull} par les blastes, mais il en existe probablement d'autres, notamment chez les patients n'ayant pas d'altération des NCR.

En conclusion, cette étude montre pour la première fois que l'expression des NCR peut être un biomarqueur immun pronostique de survie dans les LAM, indépendamment de la stratification cytogénétique.

c. Cohortes IPC 2007 – 2012 et GOELAMS

Les résultats prometteurs publiés en 2007 par Fauriat *et al*[38] ont continué d'être explorés, d'une part sur une cohorte prospective de 2007 à 2012 à l'IPC incluant 115 patients tous groupes pronostiques confondus, et d'autre part dans le cadre de l'essai clinique prospectif multicentrique randomisé LAM2006IR du Groupe Ouest Est d'Etude des Leucémies Aiguës et autres Maladies du Sang (GOELAMS), sur une cohorte de 86 patients, tous classés dans le groupe cytogénétique de pronostic intermédiaire[39,40]. Les patients des deux études avaient entre 18 et 65 ans, et ont tous reçu une chimiothérapie d'induction conventionnelle selon le protocole 3+7 décrit précédemment, associé ou non à du Gemtuzumab Ozogamcin dans le cadre de l'essai clinique de la cohorte GOELAMS. Les LAM promyélocytaires ont été exclues. L'expression de NKp30 et NKp46 a été analysée conjointement chez l'ensemble des patients des deux cohortes, néanmoins les résultats seront présentés séparément pour chacun des marqueurs.

1. NKp30, un biomarqueur immun pronostique au diagnostic[39]

Parmi les 201 patients des cohortes IPC et GOELAMS, 146 présentaient un phénotype $NKp30^{high}$, et 55 un phénotype $NKp30^{low}$, qui n'étaient pas expliqués par les facteurs que sont l'âge, le sexe, la cytogénétique ou encore le traitement par greffe allogénique de CSH chez certains patients.

Le seuil d'expression de NKp30 permettant de classer les patients en $NKp30^{bright}$ et $NKp30^{dull}$ a été déterminé d'après les paramètres de dispersion de l'expression de NKp30 à partir de la cohorte IPC. De plus, le seuil retenu correspond à celui le plus discriminant statistiquement pour les analyses de survie. Dans le groupe pronostique intermédiaire, les

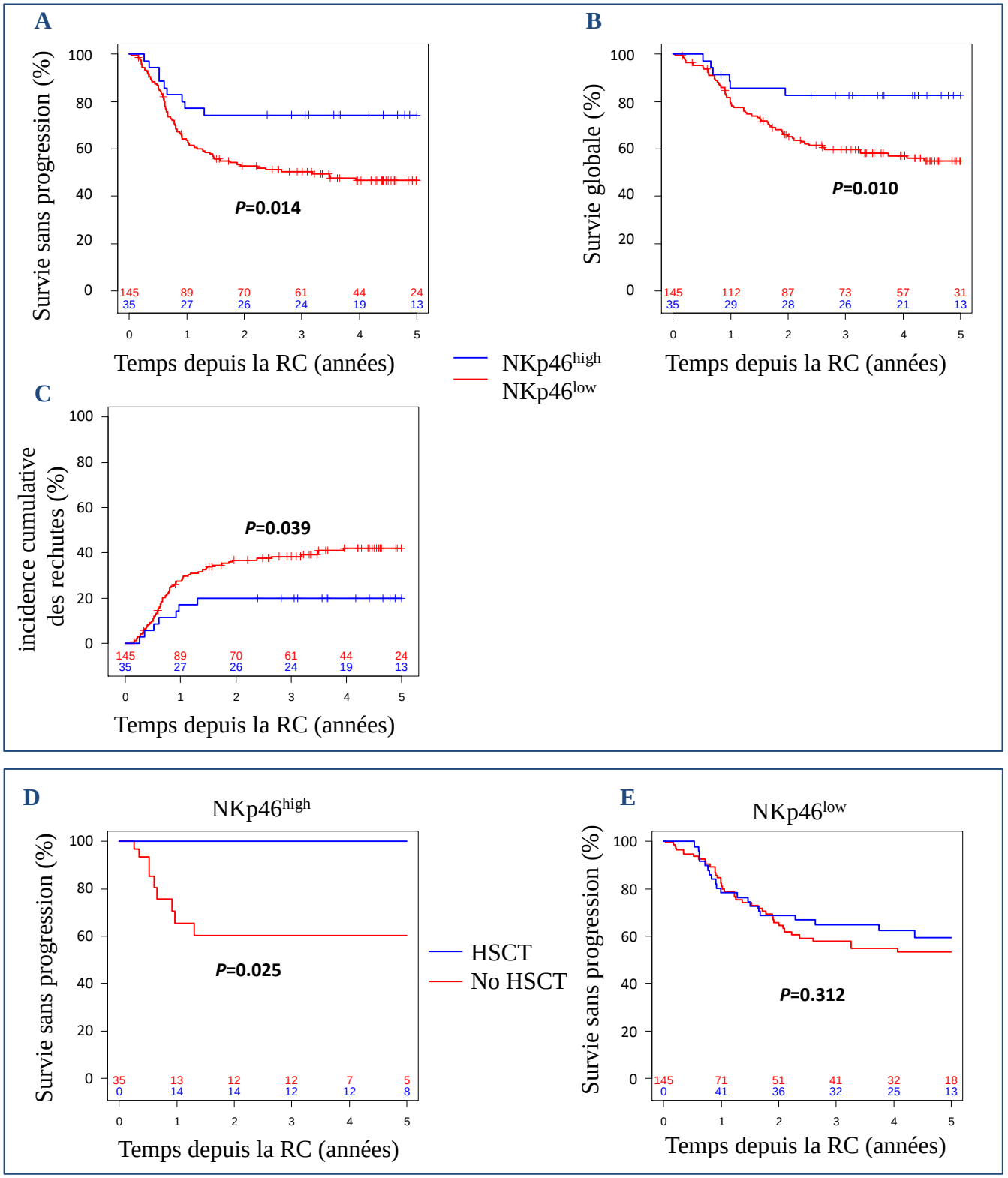


Figure 11. Stratification des patients des cohortes GOELAMS et IPC selon le statut NKp46. Courbe de survie sans progression (**A**), de survie globale (**B**) et d'incidence cumulative des rechutes (**C**) en fonction du phenotype NKp30^{high} (en rouge) et NKp30^{low} (en bleu) au diagnostic des patients des cohorts et IPC et GOELAMS. Survie sans progression des patients NKp30^{high} (**D**) ou NKp30^{low} (**E**) en fonction du traitement par allogreffe (en bleu) ou sans allogreffe (rouge). Les nombres en bas de chaque graphe représentent les nombres de patients à risque au début de chaque intervalle de 12 mois pour chaque groupe de patients. (Chretien *et al*[40])

patients exprimant fortement NKp30 ont significativement une meilleure survie globale (P<0,0001) et également une meilleure survie sans rechute (P=0,0007) que les patients du NKp30^{low} (Figure 10). Les courbes de survie globale et de survie sans rechute des patients du groupe intermédiaire NKp30^{low} sont superposées avec celles des patients du groupe de pronostic défavorable. Il semblerait donc que ces patients Nkp30^{low}, classés par la cytogénétique et la biologie moléculaire dans le groupe intermédiaire, aient finalement une probabilité de survie plus proche des patients du groupe défavorable, alors que les patients NKp30^{high} garde une probabilité de survie intermédiaire entre les deux autres groupes. La régression de Cox confirme qu'un phénotype NKp30^{high} chez les patients du groupe intermédiaire de l'ELN est significativement associé à une amélioration de la survie globale et de la survie sans rechute, indépendamment des autres facteurs, et même du traitement par allo-greffe post-rémission.

De plus, le suivi des patients de la cohorte IPC a permis d'évaluer l'expression de NKp30 non seulement au diagnostic, mais également à la rémission chez 39 d'entre eux. Cette étude cinétique permet de confirmer une augmentation d'expression de NKp30 à la rémission complète comparée au diagnostic qui avait déjà été observée par Fauriat *et al*[38] en 2007. Lorsqu'on stratifie à nouveau ces 39 patients en fonction de leur niveau d'expression de NKp30 à la rémission, la survie globale et la survie sans rechute sont significativement meilleures pour ceux ayant l'expression la plus forte de NKp30. Ces données confortent donc l'hypothèse selon laquelle les patients dont les fonctions NK sont restaurées après l'induction contrôlent la maladie résiduelle, limitant le risque de rechute.

2. NKp46, un biomarqueur immun prédictif de réponse à l'allogreffe[40]

Comme pour NKp30, les patients ont été classés selon le MFI ratio de NKp46 en NKp46^{high} (35 patients) et NKp46^{low} (145 patients). Les patients ayant un phénotype NKp46^{bright} au diagnostic ont à la fois une meilleure survie globale et une meilleure survie sans progression après la rémission complète comparée aux patients NKp46^{low}, indépendamment de la cytogénétique (Figure 11A et 11B), ce qui confirme les résultats de Fauriat *et al*[38] présentés précédemment. De plus le phénotype NKp46^{high} est inversement corrélé avec l'incidence cumulative de rechute (Figure 11C), alors que la mortalité non liée à la rechute n'est pas impactée par le phénotype NKp46^{high} et NKp46^{low}.

Sur 180 patients, 66 ont reçu une allogreffe de CSH à la rémission complète. Chrétien *et al* [40] ont alors évalué l'impact du phénotype NKp46 sur l'évolution clinique après la greffe.

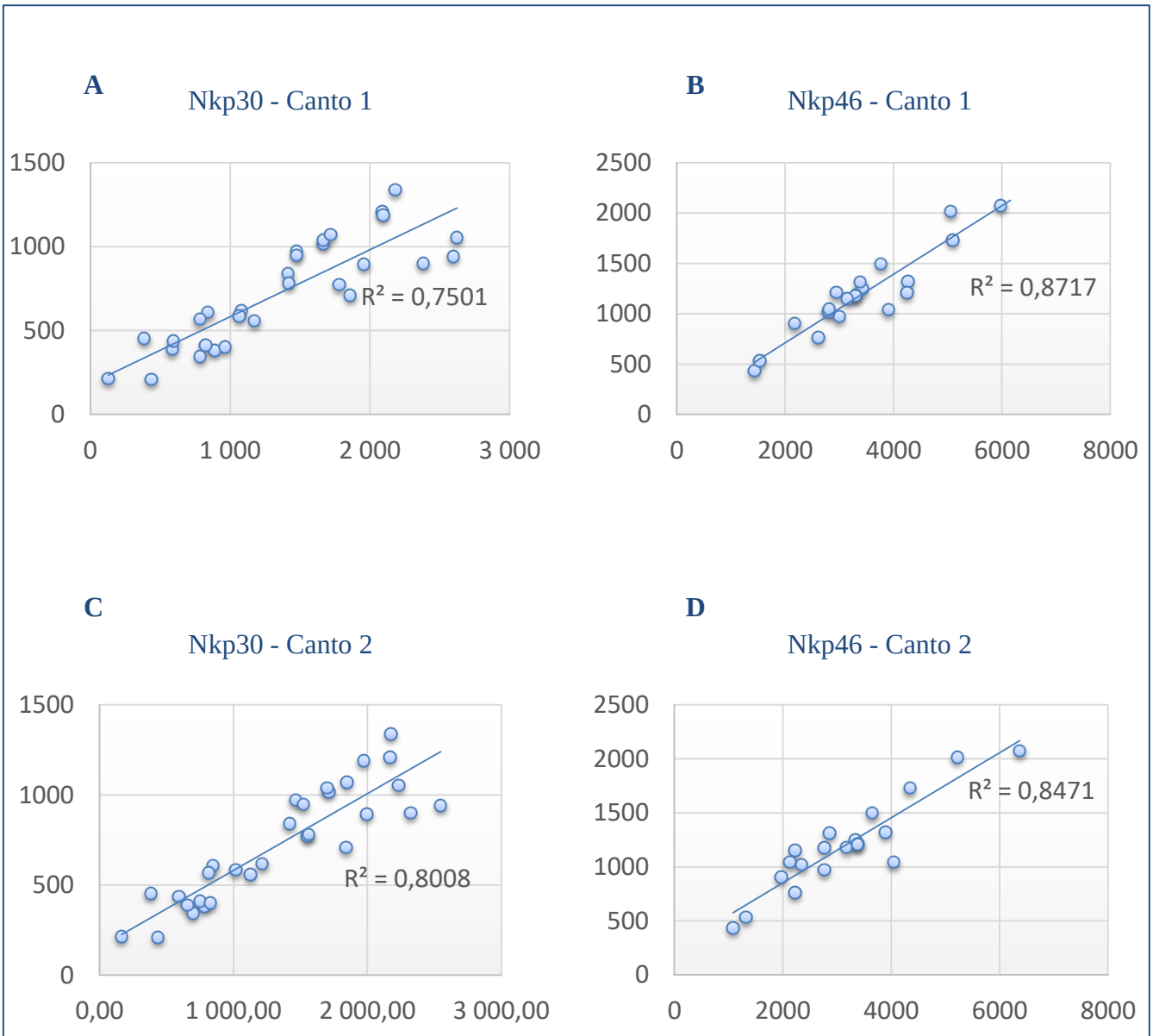


Figure 12 : Corrélation des mesures entre le laboratoire de biopathologie de l'IPC (Dr Lhoumeau) et la plateforme d'immunomonitoring du CRCM (Dr Olive).
Corrélation des MFI de Nkp30 (**A**), (**C**) et NKp46 (**B**), (**D**) entre la plateforme d'immuno-monitoring (axe des ordonnées) et les deux cytomètres Canto (BD®) du laboratoire de biopathologie de l'IPC (axe des abscisses)

Parmi les patients NKp46^{high}, ceux ayant reçu une allogreffe de CSH ont une meilleure survie sans progression que ceux non greffés après la rémission complète, alors que chez les patients Nkp46^{low}, la greffe n'a pas d'effet bénéfique sur la survie sans progression (Figure 11D et 11E). NKp46 serait donc *a priori* un biomarqueur prédictif de réponse à l'allogreffe et non pas un facteur pronostique. Ce marqueur est précocement détectable, dès le diagnostic, ce qui permettra d'orienter au plus tôt vers l'allogreffe les patients qui seront susceptibles d'en tirer des bénéfices.

d. Translation en routine hospitalière

Avec une volonté forte d'inscrire ces recherches dans un contexte translationnel, le CRCM et l'IPC ont cherché à démontrer l'importance d'évaluer la fonctionnalité des lymphocytes NK dans le domaine de l'immuno-oncologie. Après avoir mis en évidence une association entre le défaut d'expression des NCR et la cytotoxicité des NK, il a été montré qu'une faible expression de NKp30 pouvait discriminer les patients de plus mauvais pronostic dans le groupe intermédiaire de l'ELN. Par ailleurs NKp46 s'est révélé être un biomarqueur prédictif de réponse à l'allogreffe. Ces deux biomarqueurs, indépendants des facteurs génétiques, devraient être des outils précieux d'aide à la décision thérapeutique.

Après plus de 15 ans de mise au point en recherche sur des PBMC de patients, de l'IPC notamment, et de la cohorte GOELAMS, il a été décidé de faire passer en routine clinique la détermination du phénotype NCR des NK de tous les patients de l'IPC au diagnostic de LAM, en plus de la recherche des anomalies cytogénétiques et de biologie moléculaire recommandées par l'ELN. Dans la démarche d'amélioration de la qualité des laboratoires, cette transition a nécessité d'évaluer la corrélation des résultats entre la plateforme d'immuno-monitoring au CRCM (Dr Daniel Olive) et le laboratoire de biopathologie de l'IPC (Dr Anne-Catherine Lhoumeau). Cette étape de comparaison, dont je me suis occupée, a été réalisée sur des PBMC de volontaires sains commandés à l'Etablissement Français du Sang (EFS). Les échantillons (N=30) ont été phénotypés sur prélèvements frais de sang total, et analysés par le laboratoire de biopathologie de l'IPC. Les PBMC des mêmes échantillons ont été congelés avant marquage et analyse, selon le protocole utilisé pour la cohorte GOELAMS. Le coefficient de corrélation obtenu pour l'expression de NKp30 est de 0,75 et 0,80 pour les deux cytomètres du laboratoire de biopathologie de l'IPC, et de 0,87 et 0,85 pour NKp46 (Figure 12). Ces résultats satisfaisants ont permis de débuter les analyses sur les patients en routine à la fin de l'année 2017. Depuis,

20 échantillons de patients ont déjà été analysés, au diagnostic, et pour certains au J30 de l'induction.

8. Conclusion

Les lymphocytes NK sont des effecteurs cytotoxiques cruciaux de l'immunité anti-cancéreuse. Au contact des blastes leucémiques, ils deviennent profondément dysfonctionnels, bien que les mécanismes sous-jacents restent à préciser. Néanmoins des altérations phénotypiques nettes, corrélées à un défaut de cytotoxicité ont été constatées et ont donné lieu au développement des biomarqueurs NKp30 pour sa valeur pronostique au diagnostic sur la survie globale et sans rechute (Brevet EP17305151.7, 2017), et NKp46, qui a dès le diagnostic une valeur prédictive de réponse à l'allogreffe après la rémission complète (Brevet WO2015144841 A1, 2014). Néanmoins, les altérations NK dans les LAM ne se limitent pas à un défaut d'expression des NCR, puisque, entre autre, le processus de maturation des lymphocytes NK semble lui aussi affecté[41], des défauts de maturation NK étant corrélés à une moins bonne survie[42].

En outre, d'autres populations immunes sont impliquées dans l'immunité antitumorale. notamment les lymphocytes T, qui jouent un rôle central dans l'établissement et le maintien de l'immunité adaptative (Figure 5), et qui seront abordés dans la prochaine partie.

Ainsi, en regroupant toutes ces informations, il sera possible d'affiner plus encore la stratification des patients. Il devient alors nécessaire de faire appel à des techniques multiparamétriques pour analyser non plus quelques altérations immunes, mais obtenir un profil immunologique complet de chaque patient.

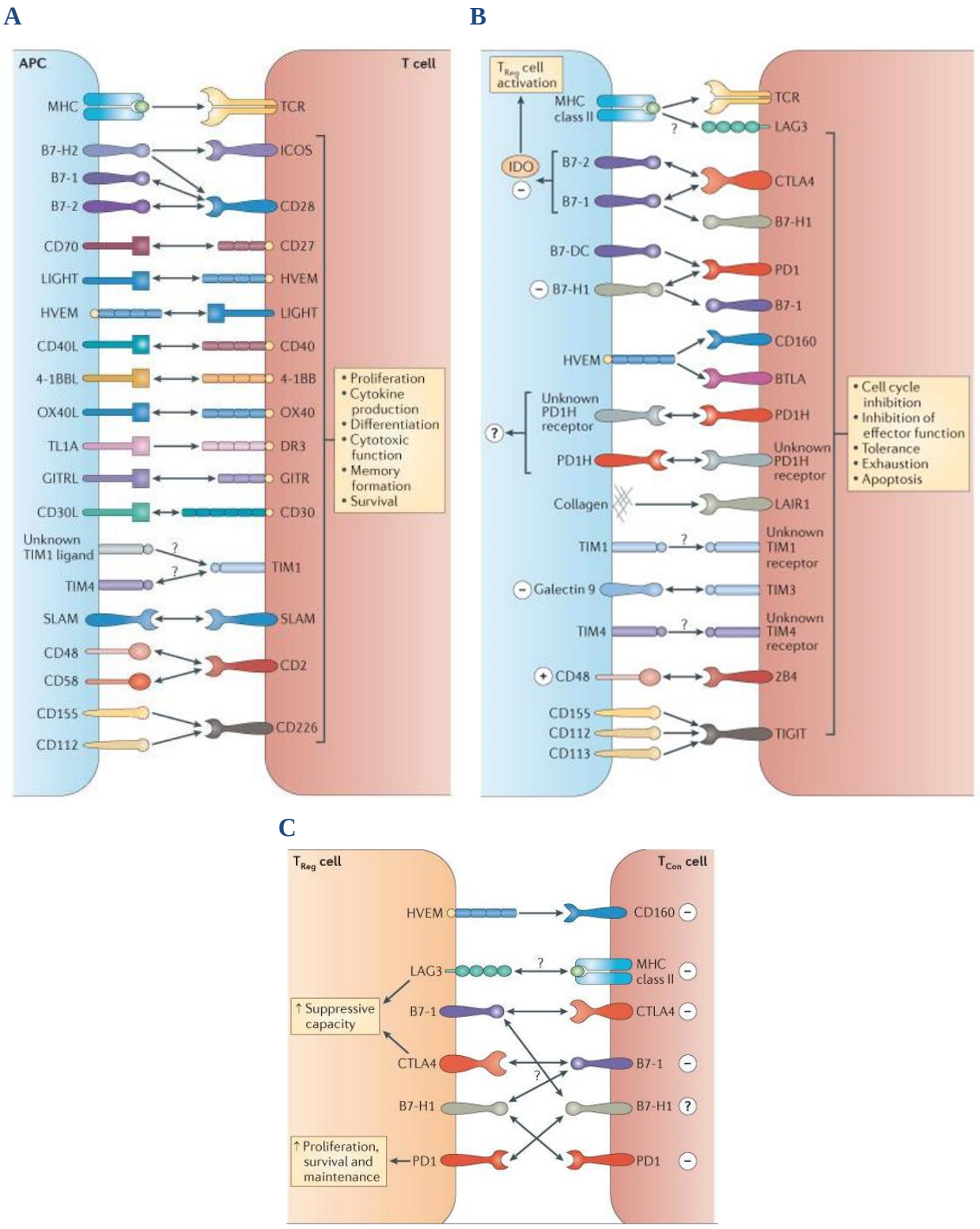


Figure 13 : **Co-signalisation T**

Récepteurs costimulateurs **(A)** et co-inhibiteurs **(B)** à la surface des lymphocytes T conventionnels (en rouge) et leur ligands sur la cellule présentatrice d'antigènes (APC) (en bleu).

Synapse immunologique entre les lymphocytes T conventionnels (en rouge) et les T régulateurs (en orange) (**C**). (Chen *et al*[43])

III. Les lymphocytes T dans l'immunité antitumorale

Bien que moins étudiés dans les hémopathies, les lymphocytes T sont des acteurs importants de l'immunité antitumorale. En développant le concept d'immunoscore, Galon *et al*[10] se sont notamment appuyés sur la caractérisation des lymphocytes T $CD8^+$ infiltrant les tumeurs solides. D'autres populations lymphocytaires T sont impliquées dans la réponse immune contre les cellules cancéreuses que nous allons détailler présentement.

Les lymphocytes T sont produits dans le thymus, un organe lymphoïde primaire situé derrière le sternum chez l'homme. Bien que divisés en de nombreuses sous-populations, les lymphocytes T partagent l'expression d'un TCR (T Cell Receptor), du marqueur CD3, et représentent les principaux acteurs de l'immunité cellulaire adaptative. Le TCR se présente sous deux formes, la première est constituée de 2 chaines α et β et concerne la majorité des lymphocytes, la seconde, minoritaire, se compose de 2 chaines γ et δ. Les lymphocytes Tαβ se divisent en T $CD4^+$ auxiliaires et T $CD8^+$ cytotoxiques. Les lymphocytes T γδ, le plus souvent $CD4^-$ $CD8^-$, sont aussi cytotoxiques, mais font partie des lymphocytes non conventionnels car participant également à l'immunité innée (Figure 5). En effet le TCR des lymphocytes conventionnels reconnait les antigènes présentés par les molécules HLA de classe I et II, alors que les T γδ peuvent s'activer en l'absence de cette présentation.

1. Synapse immunologique

Le complexe TCR est l'élément clé de la synapse immunologique qui symbolise l'interface entre le lymphocyte T et la cellule présentatrice d'antigène ou la cellule cible. Néanmoins l'activation du lymphocyte T est modulée par des récepteurs de co-signalisation. Ils sont exprimés à la surface des lymphocytes T et ont la capacité de transduire des signaux au niveau intracellulaire pour influencer positivement (costimulation) ou négativement (co-inhibition) le signal du TCR. Illustrés en Figure 13A et 13B, ces nombreux récepteurs présentent une diversité d'expression, de structure et de fonction, jouant un rôle clé dans l'activation, la différenciation, la fonction effectrice et la survie des lymphocytes T[43]. Le succès des inhibiteurs de check-point, qui consiste à utiliser un anticorps dirigé contre un récepteur co-inhibiteur comme CTLA-4 (ipilimumab) ou PD-1 (nivolumab) afin de stimuler la réponse immune antitumorale, illustre l'importance de la co-signalisation dans l'activation des lymphocytes T.

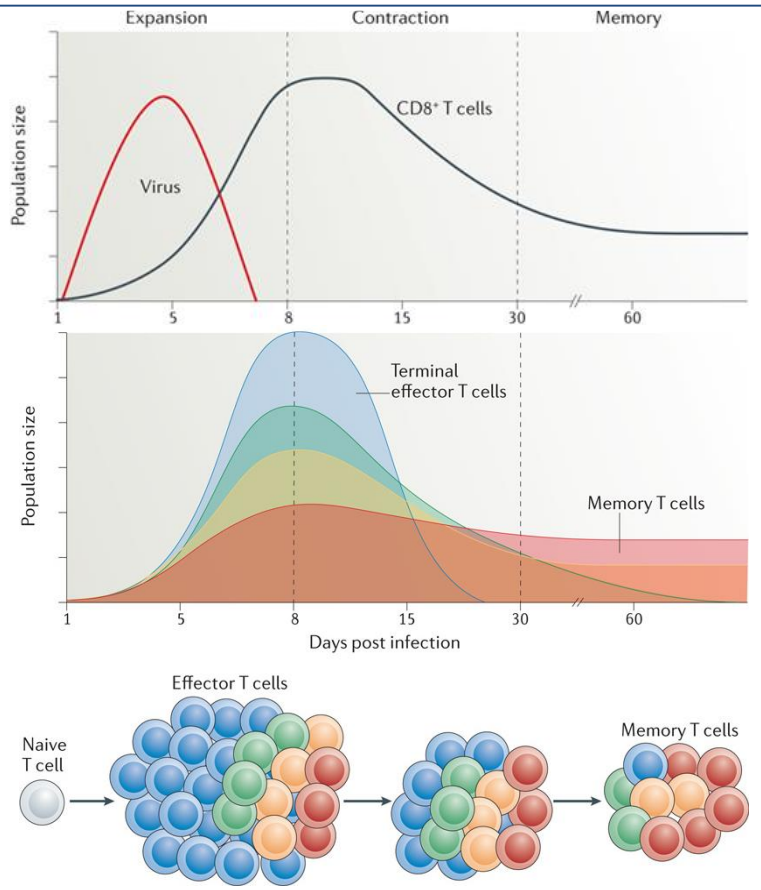


Figure 14 : Différenciation des lymphocytes T en réponse à une stimulation antigénique. (Willinger *et al*[45])

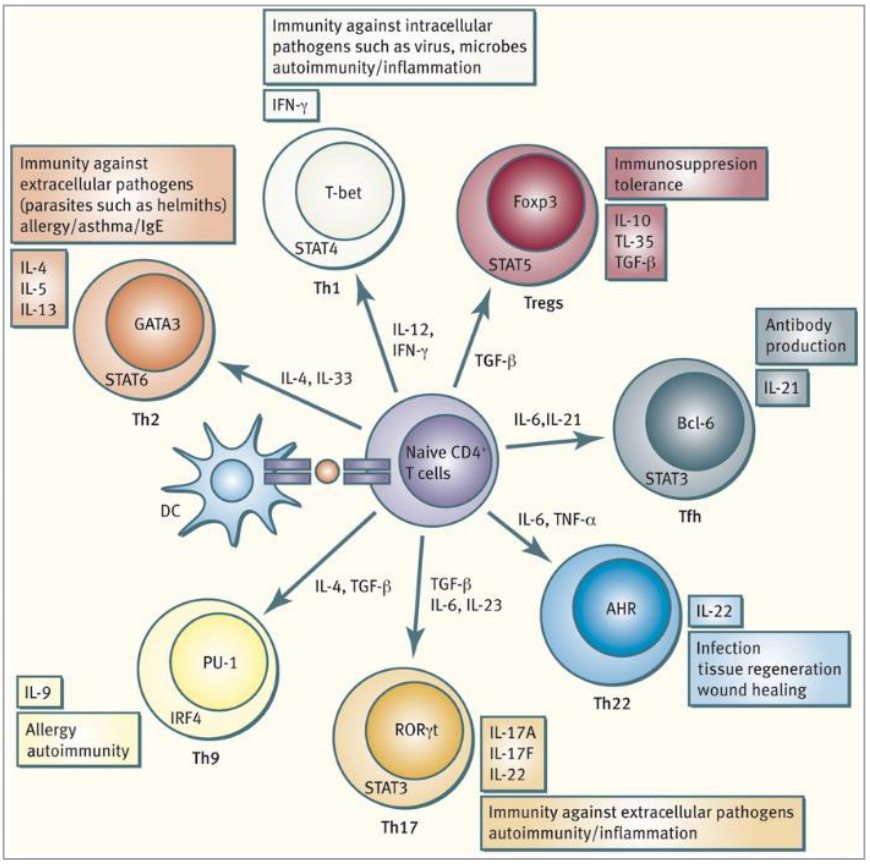


Figure 15 : **Les différentes sous-populations lymphocytaires T CD4⁺** (Jiang *et al* [46])

2. Différenciation des lymphocytes T

En sortant du thymus, les lymphocytes T sont matures et naïfs. La présentation d'un antigène d'origine infectieuse ou tumorale à un lymphocyte T naïf (T_N) entraine la différenciation en lymphocytes effecteurs puis mémoires, cruciaux dans la réponse immune adaptative.

L'activation d'un lymphocyte T_N est initiée par l'engagement de son TCR, mais devient effective lorsque des récepteurs de costimulation sont à leur tour activés, ou bien en présence de cytokines pro-inflammatoires. Suite à cette activation, une phase d'expansion clonale permet la production de nombreux lymphocytes T effecteurs.

Après élimination des cellules infectées ou transformées, la phase de contraction se traduit par l'apoptose de la plus grande partie des lymphocytes T effecteurs, moins de 10% évoluant alors vers un stade mémoire[44] (Figure 14). Les lymphocytes T mémoires peuvent être subdivisés en de nombreuses sous-populations en fonction de leur localisation, de leur fonction et de leur phénotype. Les populations T centrale mémoire (T_{CM}) et T effectrice mémoire (T_{EM}) sont les mieux caractérisées[45]. Les T_{CM}, localisés principalement dans les organes lymphoïdes, possèdent une importante capacité de survie, de prolifération, et de migration. En revanche, les T_{EM} se situent plutôt dans les tissus périphériques et ont des fonctions effectrices supérieures à celles des T_{CM}. Ainsi, les T_{EM} ont la capacité de répondre immédiatement à une nouvelle stimulation antigénique, alors que les T_{CM} répondront plus tardivement.

3. Les lymphocytes T régulateurs

Sous l'influence de leur environnement cytokinique, les lymphocytes T $CD4^+$ se polarisent en différentes sous-populations T auxiliaires (Th1, Th2, Th9, Th17, Th22 et T_{FH}) et T régulateurs[46] (Figure 15). Les lymphocytes T régulateurs sont impliqués dans la tolérance immune en raison de leurs propriétés immunosuppressives. Chez l'homme ils sont définis à partir de la population de T $CD4^+$ par l'expression de $CD25^{high}$ et $CD127^{low}$ et du facteur de transcription Foxp3. On distingue les nTreg, qui proviennent d'une différenciation naturelle dans le thymus, et les iTreg, induits à partir de lymphocytes naïfs en périphérie, suite à une stimulation antigénique prolongée dans un environnement riche en IL-2, IL-10 et TGFβ, comme par exemple dans le micro-environnement tumoral. Les T_{reg} peuvent à leur tour sécréter des cytokines immunosuppressives comme l'IL-10 et le TGFβ, ce qui va participer au recrutement d'autres T_{reg} mais également inhiber la prolifération et les fonctions des

lymphocytes T. A leur surface un certain nombre de molécules de co-signalisation sont exprimées, comme illustré sur la Figure 13C.

Depuis leur découverte, de nombreuses études ont permis de démontrer l'importance des T_{reg} dans le domaine de l'oncologie. A partir de modèles murins, l'impact négatif des T régulateurs sur l'immunité antitumorale a pu être mis en évidence, et est confirmé dans de nombreuses tumeurs solides[47] où les T_{reg} sont fréquemment retrouvés parmi les lymphocytes infiltrant la tumeur. En outre, il a été possible d'établir un lien entre leur présence au sein de la tumeur et l'évolution défavorable de cancer, entre autres, du sein[48], de l'estomac[49], de l'ovaire[50], du poumon[51], en termes d'agressivité, de risque de récidive, et de survie globale. Finalement, la déplétion spécifique des T_{reg}, étudiée dans un modèle murin de cancer du pancréas[52], permet de restaurer la cytotoxicité T et d'inhiber la croissance tumorale.

L'étude des T_{reg} des patients atteints de LAM apporte des éléments concordants avec ceux retrouvés dans les tumeurs solides. Il a été montré que les patients avaient plus de T_{reg} dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse que des volontaires sains, et qu'ils induisaient un micro-environnement tumoral immunosuppressif[53]. De plus une fréquence élevée de T_{reg} au diagnostic est corrélée avec une moins bonne survie[54]. *In vitro*, les T_{reg} des patients étaient également plus immunosuppresseurs que ceux de volontaires sains. Enfin, la fréquence des T_{reg} à la RC est diminuée par rapport au diagnostic, mais remonte nettement à la rechute, suggérant l'implication des T_{reg} dans l'évolution de la maladie.

L'ensemble de ces éléments démontre l'intérêt d'étudier les T_{reg} dans les LAM mais également les autres populations immunes, potentiellement influencées par l'action des T_{reg}.

4. Les lymphocytes cytotoxiques T CD8$^+$ et T γδ

Comme pour les lymphocytes NK, le rôle des lymphocytes T CD8$^+$ et T γδ est de détruire les cellules cibles. Bien que la reconnaissance des cellules cibles soit différente entre les T CD8$^+$ et les T γδ, les mécanismes de cytotoxicité demeurent communs [55,56] :

- La voie perforine/granzyme : similaire à la dégranulation NK, elle consiste en l'exocytose de granules contenant des enzymes et des cytokines comme la perforine et les granzymes par le lymphocyte activé.
- La voie Fas/Fas-L : la molécule Fas-ligand exprimée par les T CD8$^+$ et T γδ, est reconnue par le récepteur Fas à la surface des cellules cibles. L'engagement de ce

récepteur entraine l'activation de la voie des caspases et aboutit à l'apoptose de la cellule cible.

- La production de cytokines pro-inflammatoires comme l'IFNγ et TNF-α par les T $CD8^+$ et T γδ.

Moins étudiées que celles des NK, les anomalies fonctionnelles T dans les LAM semblent elles aussi être corrélées à l'évolution de la maladie des patients. Ainsi, dans une cohorte pédiatrique de 16 patients atteints de LAM, Montagna *et al*[57] ont mis en évidence en 2006 l'importance des cellules T cytotoxiques. Parmi les 16 enfants, 8 présentaient des précurseurs de lymphocytes T cytotoxiques (CTLp), détectés par des tests *in vitro* de cytotoxicité autologue (cytotoxicité des lymphocytes contre les blastes du patient), et aucun n'a rechuté. A l'inverse, sur les 8 autres enfants qui n'avaient pas de CTLp, 7 ont rechuté. Une autre étude, plus récente, a montré que les blastes leucémiques pouvaient induire un état d'hyporéactivité et un épuisement fonctionnel du contingent T[58].

5. Conclusion

La surveillance immune anticancéreuse est un processus complexe et détourné à leur profit par les cellules tumorales. Dans ce contexte, certaines populations cytotoxiques ou régulatrices semblent jouer des rôles privilégiés, mais ont été étudiées séparément jusqu'au développement récent de nouveaux outils multiparamétriques comme la cytométrie de masse. En outre, les altérations immunes induites par les blastes leucémiques ont une forte valeur pronostique et sont impliquées dans la résistance au traitement d'induction et de consolidation, et représentent *de facto* des cibles thérapeutiques potentielles.

Deux objectifs restent à atteindre : une meilleure caractérisation des anomalies induites par le blaste leucémique sur les effecteurs de l'immunité innée et adaptative au diagnostic, à la rechute, et chez les patients réfractaires ; et la compréhension des mécanismes impliqués pour restaurer une immunité antitumorale fonctionnelle chez les patients à risque élevé de rechute.

IV. Nouvelle approche multiparamétrique dans la recherche de biomarqueurs immuns

Introduite en 2009, la cytométrie de masse est une technologie innovante dans l'ère des analyses « single-cell » multidimensionnelles[59]. Cette technique, en permettant l'acquisition simultanée de près de 40 marqueurs différents, offre la possibilité d'analyser conjointement de nombreuses populations immunes.

Abordée dans une première partie, l'étude des lymphocytes NK de patients atteints de LAM a permis d'aboutir au développement des biomarqueurs NKp30 et NKp46. La cytométrie de masse permet de retrouver ces données, mais offre l'avantage d'analyser sur le même échantillon d'autres populations immunes, comme les lymphocytes T, et de les caractériser finement en termes de marqueurs de survie, de prolifération, de différenciation, de maturation, d'activation, ou encore d'inhibition.

Les relations privilégiées entre le CRCM, l'IPC, et le centre d'immunophénomique (CIPHE, Marseille-Luminy, Dr M. Malissen, Dr H. Luche) ont permis d'établir des collaborations avec le service d'hématologie (Pr N. Vey), la DRCI (Dr J. Pakradouni), et la tumorothèque (Pr C. Chabannon) autour du projet « Hématobio » (Investigateur Pr N. Vey) afin de collecter des renseignements cliniques et des échantillons de patients atteints de LAM, et d'avoir accès à l'un des 8 cytomètres de masse installés en France à ce jour pour analyser ces échantillons. Dans le cadre d'un Master 2 Recherche en Immuno-oncologie, j'ai participé à la mise au point des analyses de cytométrie de masse et à l'acquisition puis au traitement des données générées à partir des échantillons banqués de PBMC au diagnostic, à la rémission, à l'échec d'induction et/ou à la rechute, de 28 patients atteints de LAM ainsi que de 8 volontaires sains.

En combinant l'évolution clinique des patients et nos données multiparamétriques sur les différentes populations du système immunitaire, nous espérons identifier des signatures immunologiques prédictives de survie et/ou de réponse à la chimiothérapie.

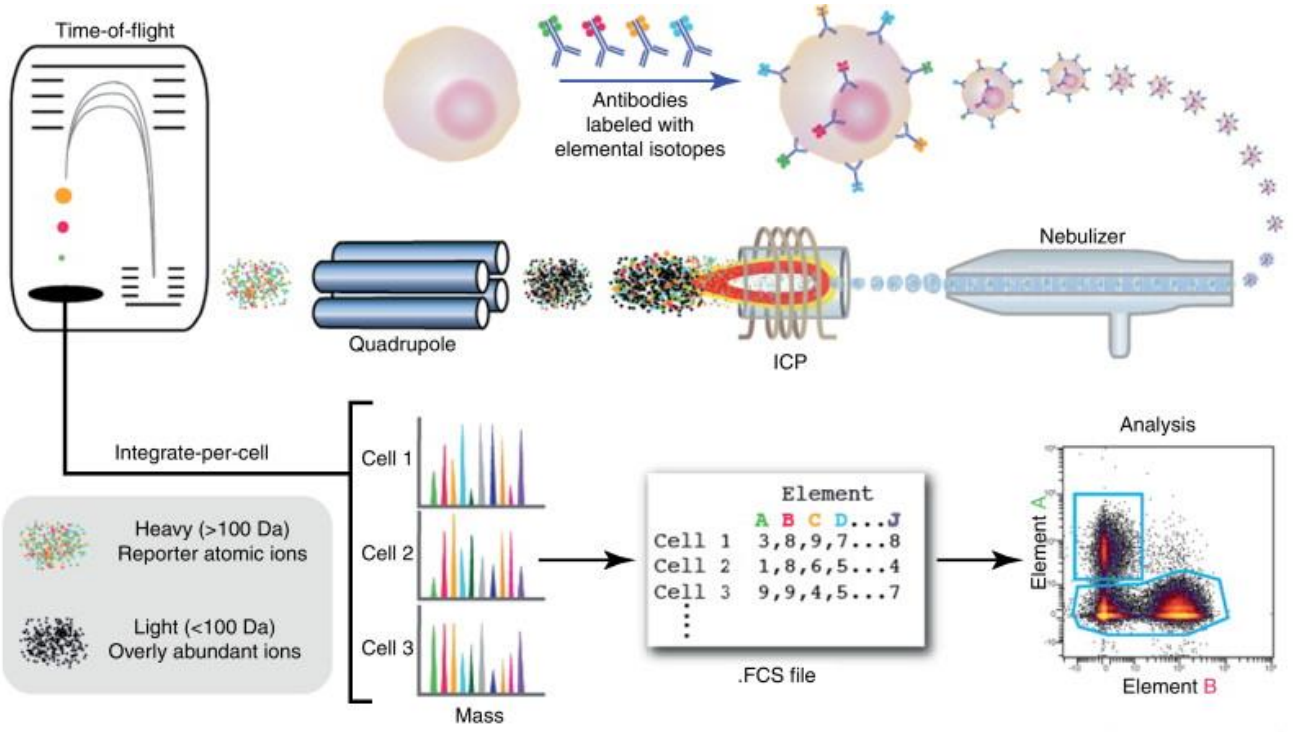


Figure 16 : Principe de la cytométrie de masse
(Bendall *et al* [60])

Table 5 : Comparaison Cytométrie de masse et de flux

	Cytométrie Flux	CyTOF
Couplage des anticorps	Fluorochromes	Métaux
Détection	Laser	Spectromètre de masse
Compensations spectrales	Oui	non
Coût machine	$	$$$
Transformation de l'échantillon	Intègre à la sortie	Destruction lors de l'acquisition
Mesure	+/- totalité échantillon	70% échantillon (Helios)
Vitesse	25 000 evt/seconde	500-1 000 evt/seconde

1. Matériel et méthodes

a. Principe de la cytométrie de masse

La cytométrie de masse est une technique récente reposant sur l'association des principes connus de la cytométrie de flux et de la spectrométrie de masse[60] (Figure 16). Il s'agit d'un procédé d'analyse individuelle (« cellule par cellule ») multiparamétrique. Les cellules sont marquées par différents anticorps, couplés à des isotopes de métaux et non plus à des fluorochromes. Ces métaux font principalement partie des lanthanides, un groupe du tableau périodique des éléments parmi les « terres rares ». L'échantillon passe dans un premier temps dans un nébuliseur, qui génère des microgouttelettes suffisamment petites pour ne contenir qu'une seule cellule à sa sortie. Ces gouttelettes sont ensuite desséchées dans une chambre de spray, puis atomisées et ionisées dans un plasma d'argon. Le nuage d'ions généré passe ensuite dans un quadrupole qui écarte tous les ions de masse atomique faible, comme le carbone, l'oxygène, et l'azote, pour ne garder que les métaux lourds, qui étaient couplés aux anticorps. La détection s'effectue comme dans un spectromètre de masse, où les ions ont un rapport masse/charge unique qui leur confère un temps de vol propre jusqu'au détecteur. Cette technique innovante de détection est très sensible. Elle permet d'augmenter le nombre de marqueurs étudiés simultanément sans rencontrer les problèmes de la cytométrie de flux comme le chevauchement des spectres d'émissions de fluorescence, ou encore l'auto-fluorescence des cellules[18].

Par ailleurs le kit de barcoding Cell-ID ™ 20-Plex Pd® (Fluidigm®, CA, USA) permet de marquer jusqu'à 20 échantillons différents avec un code-barres spécifique, constitué d'une association unique de trois isotopes du Palladium, qui s'incorporent dans le cytoplasme des cellules. Identifiés par leur code-barres, les échantillons peuvent ensuite être réunis en un seul échantillon multiplexé pour la suite des marquages et pour l'acquisition. Ce processus a de nombreux avantages : il permet notamment de réduire la consommation d'anticorps et d'éliminer la variabilité de marquage entre les tubes, d'augmenter la récupération cellulaire lors des marquages intracellulaires, mais également d'éliminer des doublets cellulaires, de réduire les contaminations croisées pendant le passage des échantillons et de diminuer la durée d'acquisition[61]. Le comparatif entre cytométrie de masse et de flux est résumé en Table 5.

Table 6 : Caractéristiques des patients et des volontaires sains

Caractéristiques	Patients	Volontaires sains
Nombre d'échantillon	28	8
Age (ans) m(SD)	59 (12,1)	49 (11,3)
Sexe Ratio M/F	1/1	7/1
Statut au diagnostic		
De novo . n (%)	27 (96)	
Transformation de syndromes myélodysplasiques . n (%)	1 (4)	
Evolution		
Patients ayant atteint la RC après l'induction. n (%)	20 (71)	
Patients réfractaires (pas de RC). n (%)	8 (29)	
Patient ayant rechuté après la RC. n (%)	11 (39)	
GB (10^9/L). m(SD)	22,6 (29,1)	N.I
Blastes dans le sang (%). m(SD)	50 (32)	
Blastes dans la moelle osseuse (%). m(SD)	62 (26)	
Classification FAB		
M0 n (%)	4 (14)	
M1 n (%)	5 (18)	
M2 n (%)	6 (21)	
M3 n (%)	2 (7)	
M4 n (%)	7 (25)	
M5 n (%)	1 (4)	
M6 n (%)	1 (4)	
M7 n (%)	0 (0)	
Non classé n (%)	2 (7)	
Marqueurs moléculaires		
FLT3 nombre de positif. n (nombre de patients testés)	3 (15)	
NPM1 nombre de positif. n (nombre de patients testés)	7 (14)	
CEPBA nombre de positif. n (nombre de patients testés)	1 (5)	
Cytogénétique (n=28)		
Groupe 1 (Favorable) n (%)	7 (25)	
Groupe 2 (Intermédiaire) n (%)	12 (43)	
Groupe 3 (Défavorable) n (%)	7 (25)	
Non classés n (%)	2 (7)	
ELN (cytogénétique + marqueurs moléculaires)		
Groupe 1 (Favorable) n (%)	12 (43)	
Groupe 2 (Intermédiaire) n (%)	7 (25)	
Groupe 3 (Défavorable) n (%)	7 (25)	
Non classés n (%)	2 (7)	

b. Echantillons

Les échantillons de patients proviennent de la collection Hématobio de l'IPC (Investigateur, Pr N. Vey). Tous les patients atteints de LAM inclus dans cette étude ont signé un consentement éclairé conformément à la déclaration d'Helsinki. Les patients ont été prélevés par ponction veineuse périphérique sur tube EDTA. Le sang collecté a été centrifugé pour isoler les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) à l'aide d'un gradient de densité (Lymphoprep separation media®). Les PBMC ont ensuite été congelées dans une solution d'Albumine humaine (Vialebex®) et de DMSO 10%, et conservées dans de l'azote liquide à la tumorothèque (Pr Chabannon) jusqu'aux manipulations.

Les échantillons contrôles de volontaires sains proviennent de l'EFS. A la réception des échantillons de sang total recueillis sur tube EDTA, les PBMC ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité puis congelées en SVF DMSO 10% à - 80°c jusqu'au jour des analyses.

Les caractéristiques des patients et volontaires sains sont présentées dans la Table 6 et le processus de prélèvement des patients est présenté Figure 17, avec un premier prélèvement au diagnostic puis d'autres, à la RC, à la rechute, ou à l'échec d'induction, selon l'évolution des patients, qu'on peut donc classer en trois groupes :

-un groupe « RC » qui comprend huit patients ayant atteint la RC et qui n'ont pas rechuté à la date des dernières nouvelles. Ces patients sont considérés comme étant en rémission complète prolongée (> 1an).

- un groupe « rechute » qui comprend les onze patients ayant atteint la RC mais ayant rechuté précocement.

- un groupe « réfractaire » qui comprend les huit patients n'ayant pas atteint la RC après la chimiothérapie d'induction.

c. Protocole de marquage

1. Préparation des cellules

La préparation des cellules en vue d'une analyse par cytométrie de masse nécessite une attention particulière quant à l'utilisation des consommables plastiques et des solutions tampons, qui ne doivent pas ou peu contenir d'iode, de barium et d'autres contaminants qui généreraient un bruit de fond important pouvant aller jusqu'à la détérioration du détecteur du cytomètre de masse.

Les PBMC sont décongelées et lavées dans du RPMI 10% SVF puis incubées pendant 30 minutes en présence de nucléase universelle Pierce® (Thermo Fisher Scientific, Waltham,

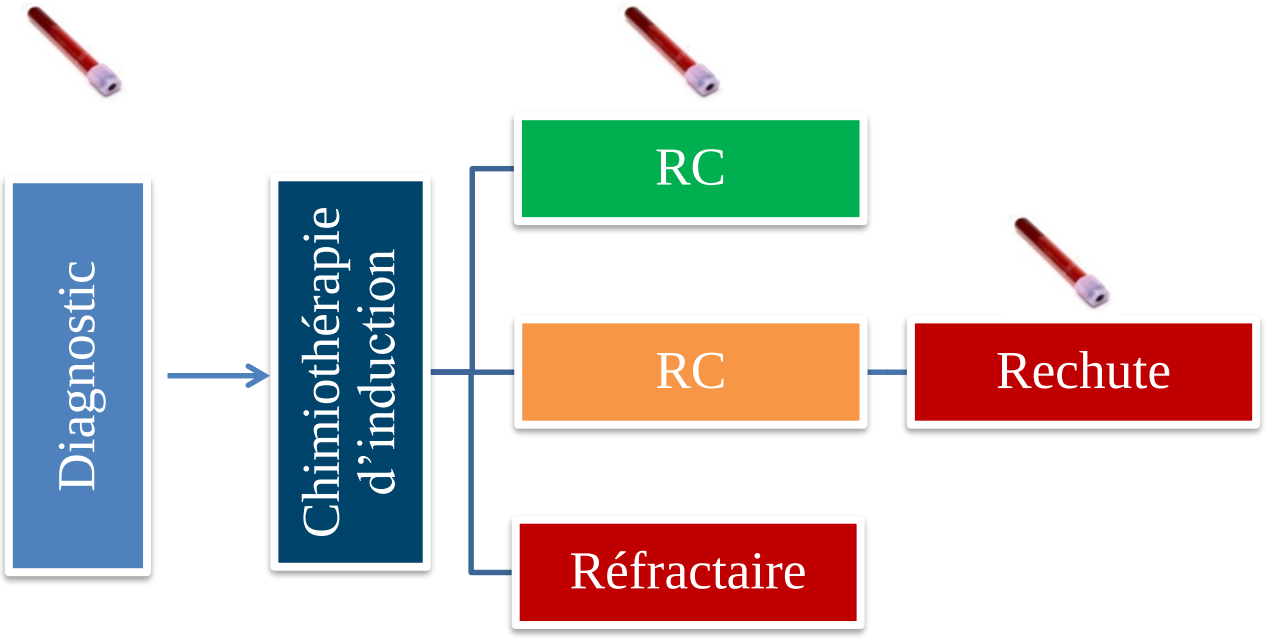


Figure 17 : Processus de prélèvements des échantillons sanguins.
Les patients sont prélevés au diagnostic puis après la chimiothérapie d'induction lorsqu'ils ont atteint le rémission complète (RC) pour les répondeurs, et lorsqu'ils sont en échec d'induction (groupe réfractaire). Pour les patients rechutant après la RC, un échantillon est également prélevé à la rechute.

MA, USA). Les PBMC sont lavées et comptées pour être distribuées en plaque 96 puits fond V à raison de 2 millions de cellules par puits. Les PBMC sont ensuite incubées avec du cisplatine qui marque les cellules mortes. Enfin les cellules sont bloquées avec 5µg de Fc Block (BD® Bioscience, Le Pont de Claix, France) par puits.

2. *Marquages*

Le marquage extracellulaire s'effectue en deux étapes. Les PBMC sont dans un premier temps incubées avec les anticorps primaires extracellulaires pendant 30 min à + 4°C. Après lavages, on procède à une deuxième incubation de 30 min à + 4°C avec l'anticorps secondaire anti-biotine qui est couplé à un métal, afin de révéler les marquages primaires par des anticorps biotinylés.

Les PBMC sont à nouveau lavées puis fixées et « barcodées » selon les recommandations fournisseur. Après le « barcoding », l'ensemble des échantillons est rassemblé en un seul tube pour la suite des marquages. Après un lavage supplémentaire, les PBMC sont perméabilisées par le kit de fixation-perméabilisation Foxp3 (e-Biosciences®, San Diego, CA, USA), bloquées par 5µg/échantillon de Fc Block (BD® Biosciences) et marquées pendant 30 min à +4°C par les anticorps intracellulaires. Les PBMC sont encore lavées deux fois puis resuspendues dans du Cytofix 1/1000 Iridium jusqu'au lendemain matin. Les PBMC sont alors comptées puis aliquotés en SVF DMSO 90% et immédiatement congelées à -80°C jusqu'à acquisition. Les panels complets extra- et intra-cellulaires sont disponibles en Annexe 1.

3. *Acquisition*

Les aliquots sont décongelés un par un juste avant l'acquisition. Après deux lavages en eau désionisée pour éliminer le SVF, les cellules sont filtrées (35µm) et resuspendues dans un volume adéquat de billes de normalisation (Fluidigm®) diluées au 1/10^{e}.

4. *Traitement des données*

Les billes de normalisation sont acquises en même temps que les PBMC marquées. Cela permet de rapporter l'intensité des marquages des PBMC à l'intensité des billes. La normalisation de tous les échantillons permet ainsi d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles[62]. L'ensemble des données normalisées est ensuite concaténé puis « débarcodé » pour séparer les données propres à chaque échantillon.

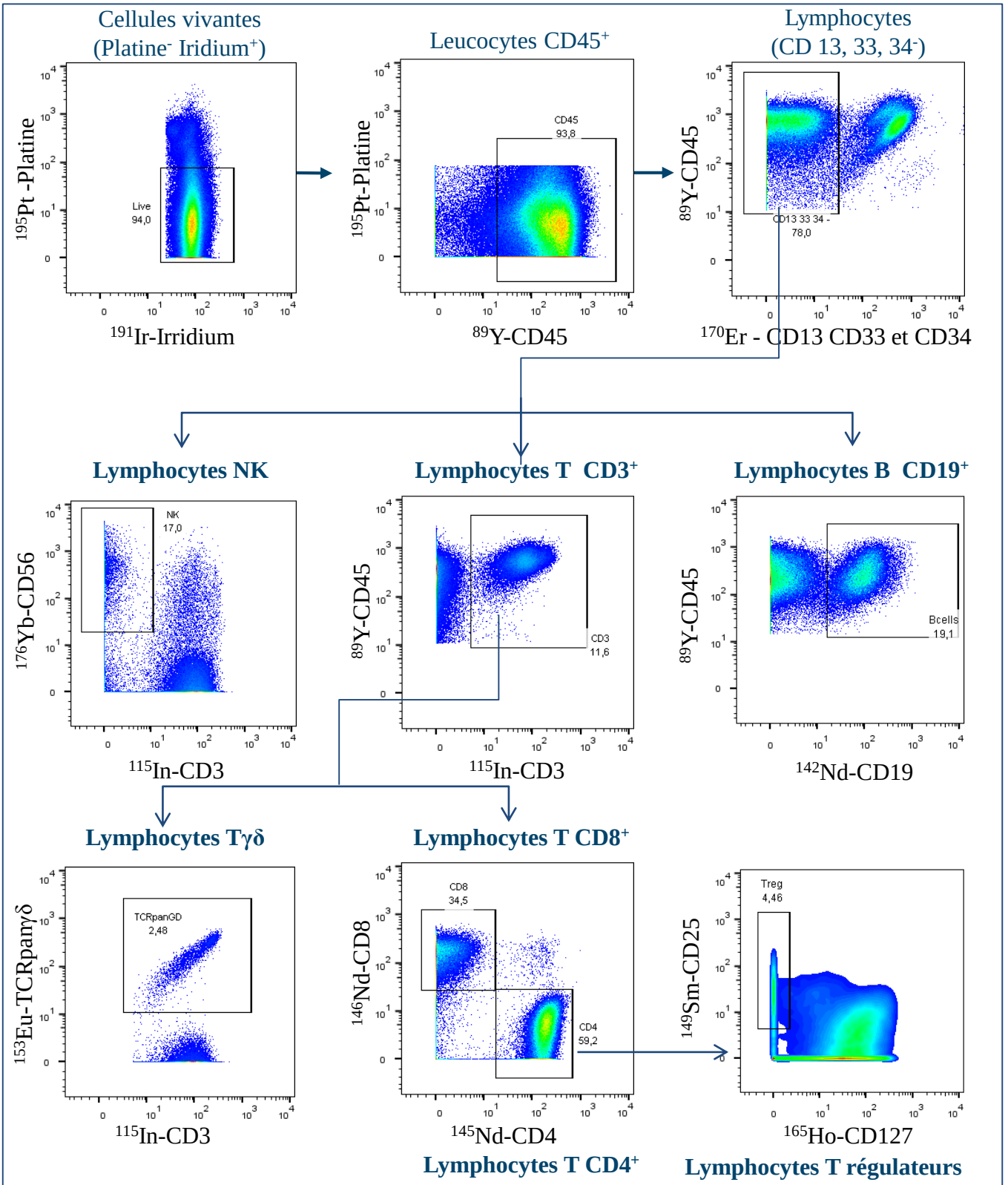


Figure 18 : Stratégie de fenêtrage pour les analyses en cytométrie de masse.
Les cellules vivantes sont séléctionnées (Irridium$^+$), en excluant les cellules mortes (Platine$^+$). On fenêtre ensuite les leucocytes grâce au marquage CD45, puis on exclue les blastes et les monocytes (CD13, 33 34$^+$) pour obtenir la population des lymphocytes. Les marquages CD19, CD3, TCR panγδ, CD4, CD8, permettent de définir respectivement les sous-populations lymphocytaires B, T, Tγδ, T CD4$^+$, TCD8$^+$. Le marquage CD56, associé à l'absence du marqueur CD3 définit quand à lui la population NK. Les lymphocytes T régulateurs sont une sous-population des T CD4$^+$, qui expriment le CD25 et non le CD127.

L'analyse des données a été réalisée à l'aide du logiciel FlowJo® (X.0.7), et sur la plateforme en ligne Cytobank® qui permet d'utiliser des algorithmes de fenêtrage automatique comme SPADE® (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events), ou encore des outils performants de recherche de biomarqueurs comme CITRUS® (cluster identification, characterization, and regression)

Le clustering hiérarchique a été réalisé avec les logiciels Morpheus® (Broad Institute, Harvard et MIT, USA) et MeV® .

Les analyses statistiques ont été effectuées à l'aide du logiciel GraphPad Prism®. Les comparaisons entre groupes de patients ont été analysées statistiquement par le biais d'un t-test non paramétrique de Mann Whitney avec un intervalle de confiance de 95%.

2. Résultats

a. Fenêtrage des populations d'intérêt

La stratégie de fenêtrage est résumée dans la Figure 18. Après élimination du bruit de fond, les débris sont éliminés en ne prenant que les éléments marqués à l'Iridium, qui indique la présence d'ADN et donc de cellules. Les cellules mortes sont exclues grâce à un marquage au cisplatine. On utilise ensuite le marqueur pan-leucocytaire CD45 pour sélectionner l'ensemble des leucocytes. Enfin, il est nécessaire d'exclure parmi ces cellules les monocytes et les blastes leucémiques circulants, qui expriment CD13, CD33 et/ou CD34.

Ensuite on utilise des marqueurs d'intérêt pour sélectionner les lymphocytes B ($CD19^+$), les lymphocytes NK ($CD3^-$ $CD56^+$), et les lymphocytes T ($CD3^+$) qu'on peut encore diviser en T $CD4^+$, T $CD8^+$, T γδ (TCRpanγδ$^+$). Parmi les T $CD4^+$, on peut distinguer les T_{reg} qui expriment CD25 et faiblement CD127. Les analyses ont ensuite été réalisées en pourcentage de cellules exprimant le marqueur d'intérêt au sein des lymphocytes totaux. Comme illustrée sur la Figure 19, la répartition des différentes populations lymphocytaires NK, B, T $CD4^+$, T régulateurs, T $CD8^+$ et T γδ est sensiblement la même chez les patients au diagnostic de leur LAM et chez les volontaires sains.

b. Anomalies NK

1. Activation et inhibition NK

L'activation des NK résulte d'un déséquilibre en faveur de l'activation entre signaux activateurs et inhibiteurs. Ils sont perçus par la cellule grâce à différents récepteurs activateurs,

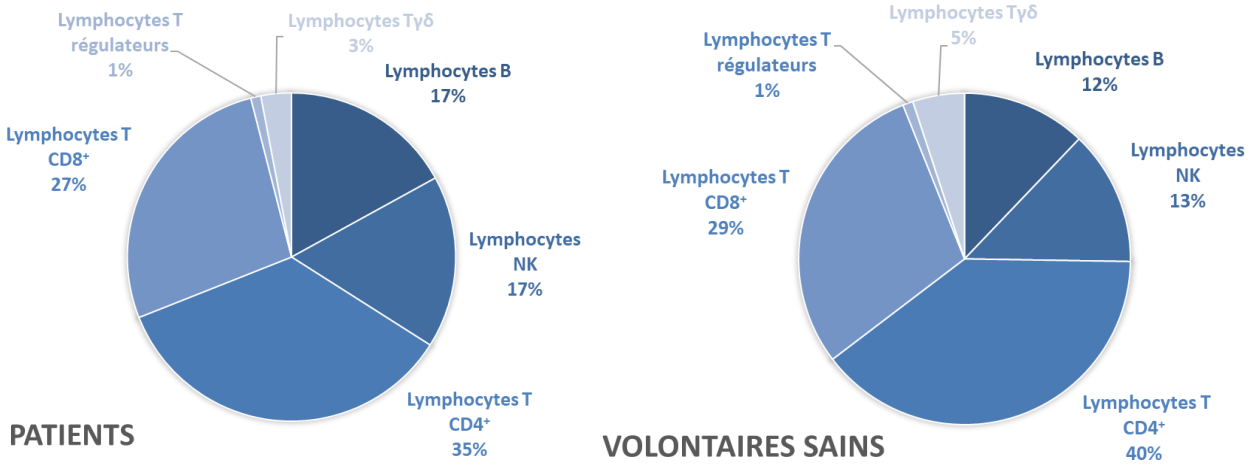


Figure 19 : Répartition des sous-populations lymphocytaires des patients et des volontaires sains.

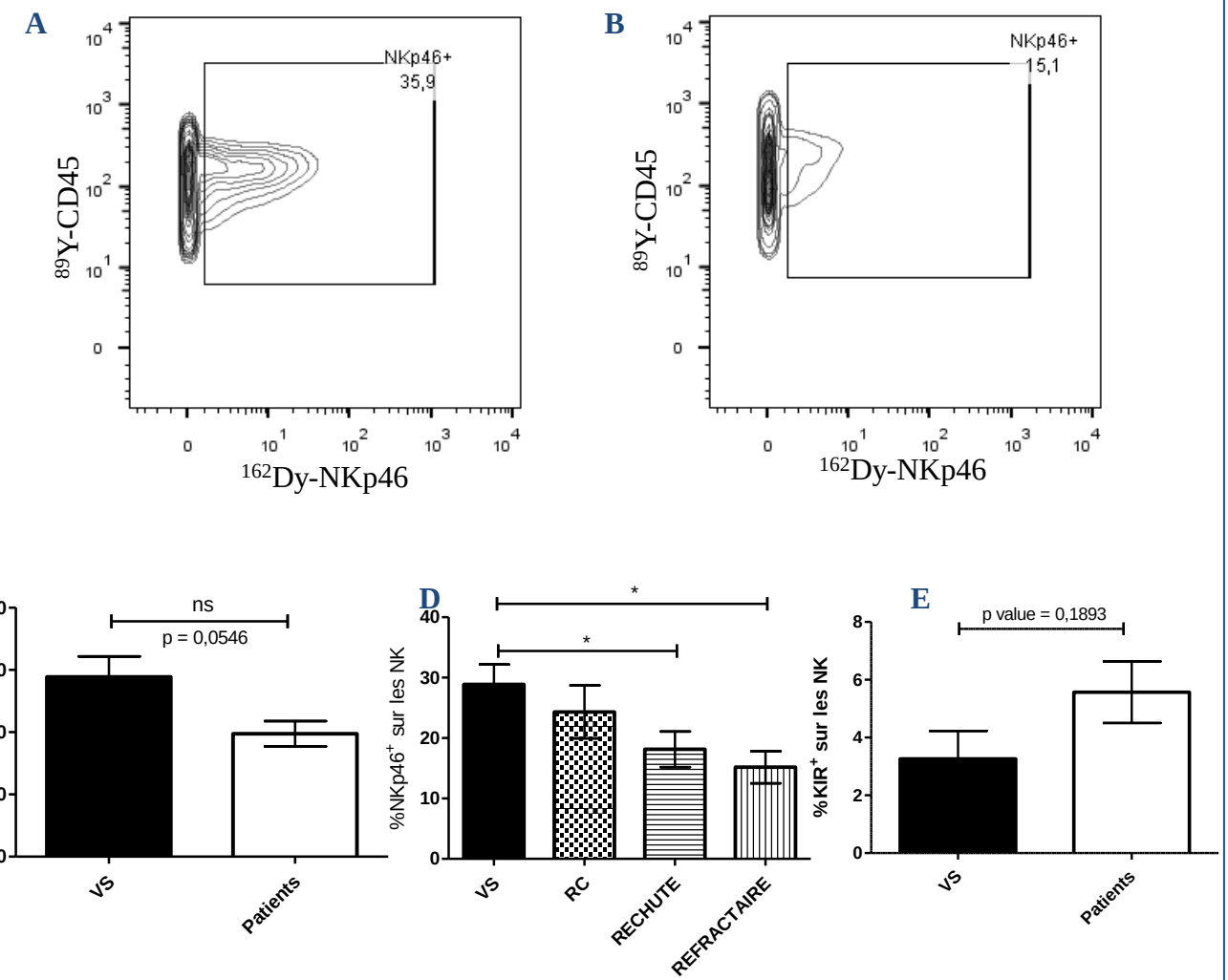


Figure 20 : Activation et Inhibition NK au diagnostic.

Exemple de Fenêtrage des NK NKp46^{+} chez un volontaire sain **(A)** et chez un patient représentatif du groupe réfractaire **(B)**. Comparaison au diagnostic de l'expression de NKp46 sur les NK entre les patients et les volontaires sains **(C)**, et entre les différents groupes de patients **(D)**. Comparaison de l'expression des KIR sur les NK entre les volontaires sains et les patients au diagnostic **(E)**. (* $p<0,05$)

comme NKp46, NKp30, NKG2D, DNAM-1, et grâce à des récepteurs inhibiteurs comme KIR, NKG2A, CD96, qui font partie des marqueurs analysés dans nos panels de cytométrie de masse.

Nos données mettent en évidence une diminution significative ($p<0,05$) de l'expression du récepteur activateur NKp46 au diagnostic chez les patients du groupe rechute et du groupe réfractaire. A l'inverse, aucune diminution significative n'est mise en évidence dans le groupe des patients qui maintiennent une rémission complète prolongée par rapport aux volontaires sains (Figure 20). L'expression de NKp46 analysée par cytométrie de masse est représentée chez un volontaire sain (Figure 20A) et chez un patient représentatif du groupe rechute (Figure 20B). A titre de comparaison, un exemple de marquage NKp46 en cytométrie de flux est illustré en Annexe 2, ainsi que la stratégie de fenêtrage globale propre à la cytométrie de flux. L'analyse de l'expression de NKp30, montre une diminution entre volontaires sains et patients au diagnostic, mais sans significativité statistique (données non présentées).

Concernant les récepteurs inhibiteurs KIR, on observe une tendance non significative à l'augmentation de son expression chez les patients comparée aux volontaires sains (Figure 20E). L'analyse des autres marqueurs activateurs DNAM-1, NKG2C, NKG2D et inhibiteurs NKG2A et CD96 sur cette cohorte de patients, n'a pas permis de mettre en évidence d'autres anomalies significatives sur les lymphocytes NK des patients au de cette cohorte au diagnostic.

2. Maturation NK

Les NK suivent un processus de maturation qui passe par différentes étapes. Initialement les NK immatures présentent un phénotype $CD56^{bright}$, qu'ils vont perdre pour devenir $CD56^{dim}$, acquérir séquentiellement les marqueurs CD57 et KIR, et finir au stade de maturation le plus avancé, c'est-à-dire double positif $CD57^{+}$ et KIR^{+}.

Nos données mettent en évidence une diminution significative de la fréquence de NK $CD56^{bright}$ chez les patients au diagnostic comparés aux volontaires sains(2,8% vs 1,1% $p<0,05$) (Figure 21B). Cette diminution des NK $CD56^{bright}$ au diagnostic est majorée pour le groupe de patients réfractaires à la chimiothérapie d'induction (Figure 21C).

Le profil complet de maturation de chaque patient et volontaire sain est représenté à l'aide d'une « heat map » (Figure 21D) qui permet de regrouper les patients présentant les profils de maturation NK les plus similaires. On observe que les patients du groupe réfractaire, principalement regroupés dans un « cluster » en bas de la « heat map » semblent avoir en commun une proportion plus importante de NK matures $CD56^{dim}$ KIR^{-} $CD57^{+}$, ce qui concorde

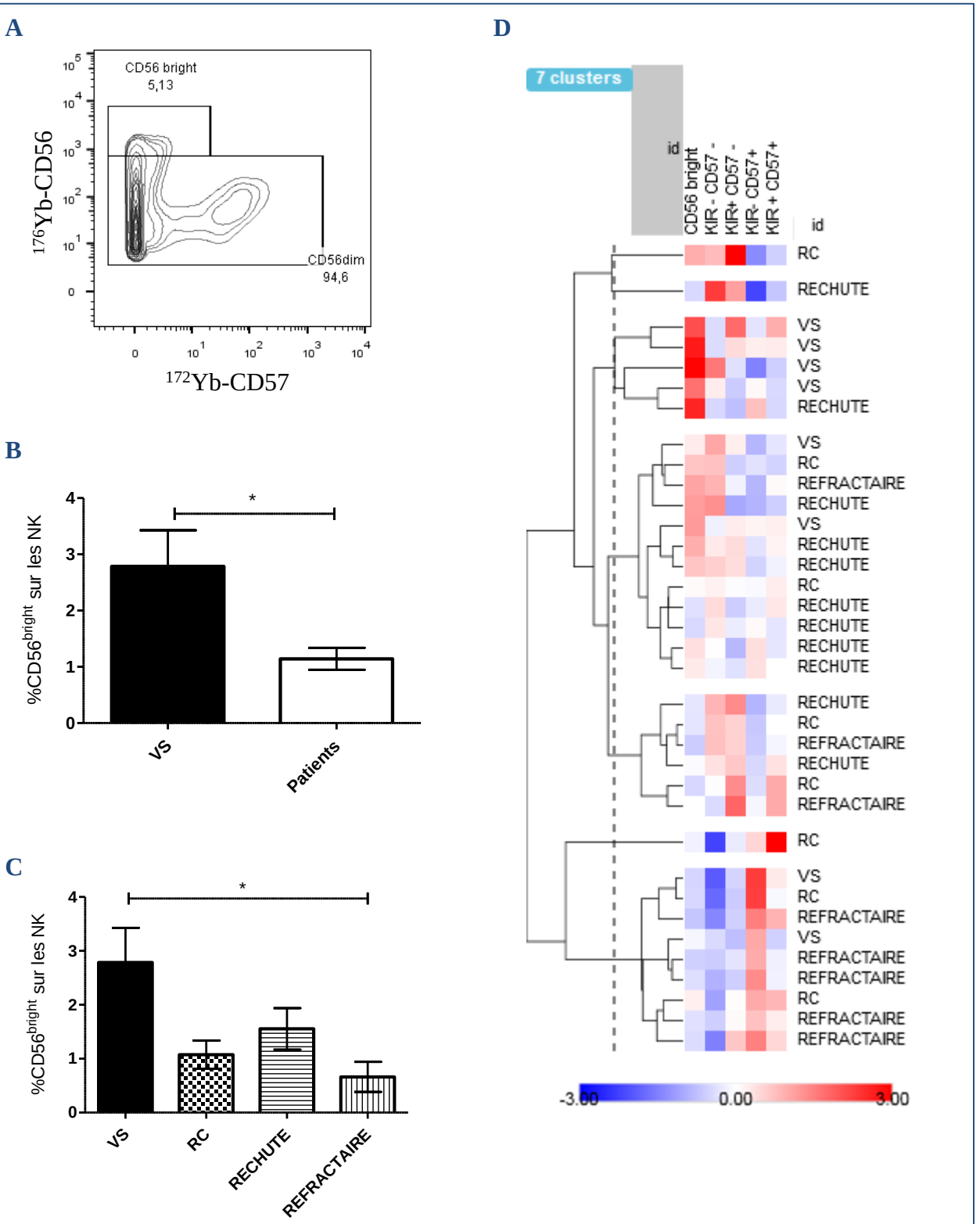


Figure 21 : Maturation NK.

Exemple de fenêtrage des NK CD56^{bright} sur les NK totaux d'un volontaire sain **(A)** Comparaison des fréquences des NK CD56^{bright} chez les patients comparés aux volontaires sains **(B)** et comparaison entre les sous-groupes de patients au diagnostic **(C)** Clusterisation hiérarchique (distance euclidienne) des patients au diagnostic et volontaires sains selon leur profil de maturation NK représenté par 5 sous-populations NK de la plus immature (CD56^{bright}) à la plus mature (KIR^{+} CD57^{+}) **(D)**. (* p<0,05).

avec la diminution de NK immature CD56^{bright} dans ce groupe de patients. Concernant les autres patients, la « heat map » met en évidence une hétérogénéité de profils de maturation NK, contrairement aux volontaires sains qui ont presque tous le même profil.

c. Anomalies T

1. *Différenciation des T*

Les différentes sous-populations issues de la différenciation T peuvent être identifiées à partir de leur expression des marqueurs CD45RA et CD27 : les lymphocytes T naïfs (T_N) qui co-expriment les marqueurs CD27 et CD45RA, les T centraux mémoire (T_{CM}) qui ont perdu le CD45RA mais expriment toujours le CD27, les T effecteurs mémoire (TEMH) qui n'expriment ni le CD27 ni le CD45RA, et enfin les TEMRA, qui représentent la sous-population la plus différenciée de T qui restent CD27 négative mais réacquièrent le CD45RA (Figure 22A et 22B).

En analysant les fréquences de ces quatre sous-populations parmi les T CD8$^+$, on observe que les patients atteints de LAM possèdent significativement moins de lymphocytes T CD8$^+$ naïfs comparés aux volontaires sains. Concernant les populations mémoires TEMH et TEMRA, il y a une tendance à l'augmentation chez les patients comparés aux volontaires sains, mais sans significativité (Figure 22C). De même, on peut étudier le profil de maturation des lymphocytes T γδ (Figure 22D), mais qui ne montre pas de différence significative entre patients et volontaires sains.

L'outil SPADE permet de représenter les populations immunes sous la forme d'un arbre, sur lequel sont répartis des groupes homogènes de cellules (« cluster ») indiqués par des pastilles dont la taille reflète le nombre de cellules dans ce cluster. La Figure 23 explique le principe de clustering automatique de SPADE®, sur les lymphocytes T CD8$^+$ dans cet exemple, en fonction de l'expression de CD45RA (Figure 23A) et CD27 (Figure 23B), ce qui permet d'identifier les 4 sous-populations T_{CM}, T_N, TEMH et TEMRA (Figure 23C) décrites ci-dessus, sans qu'il soit nécessaire d'effectuer manuellement une stratégie de fenêtrage. L'intérêt de cet outil pour mieux visualiser les données est détaillé dans la partie qui suit.

2. *Récepteurs de co-signalisation sur les T CD8⁺*

A partir des arbres SPADE® générés pour visualiser les sous-populations lymphocytaires T CD8$^+$ (Figure 23), on peut visualiser sur chaque cluster l'expression des récepteurs de costimulation HVEM et ICOS, et de co-inhibition BTLA et PD-1 (Figure 24), où la couleur

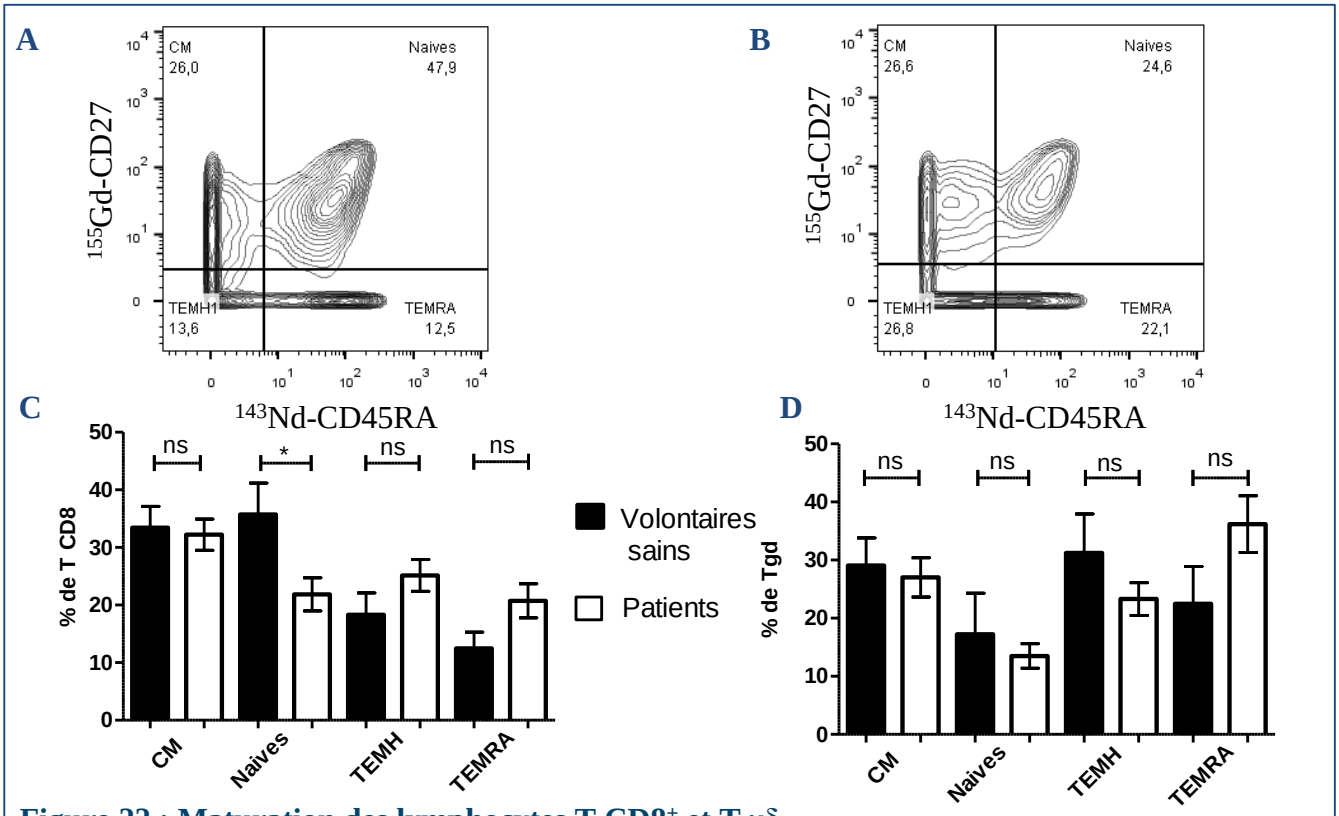


Figure 22 : Maturation des lymphocytes T CD8⁺ et T γδ.
Fenêtrage des sous populations lymphocytaires T selon l'expression de CD27 et CD45RA : Centrale Mémoire (CM : $CD27^+$ $CD45RA^-$), Naives ($CD27^+$ $CD45RA^+$), T Effecteur Mémoire Helper (TEMH : $CD27^-$ $CD45RA^-$), T Effecteur Mémoire RA (TEMRA : $CD27^-$ $CD45RA^+$) illustrée sur les T $CD8^+$ d'un volontaire sain **(A)** et d'un patient **(B)**, représentatifs de la cohorte. Comparaison des fréquences des sous populations T $CD8^+$ **(C)** et T γδ **(D)** entre volontaires sains et patients au diagnostic. (* $p<0,05$)

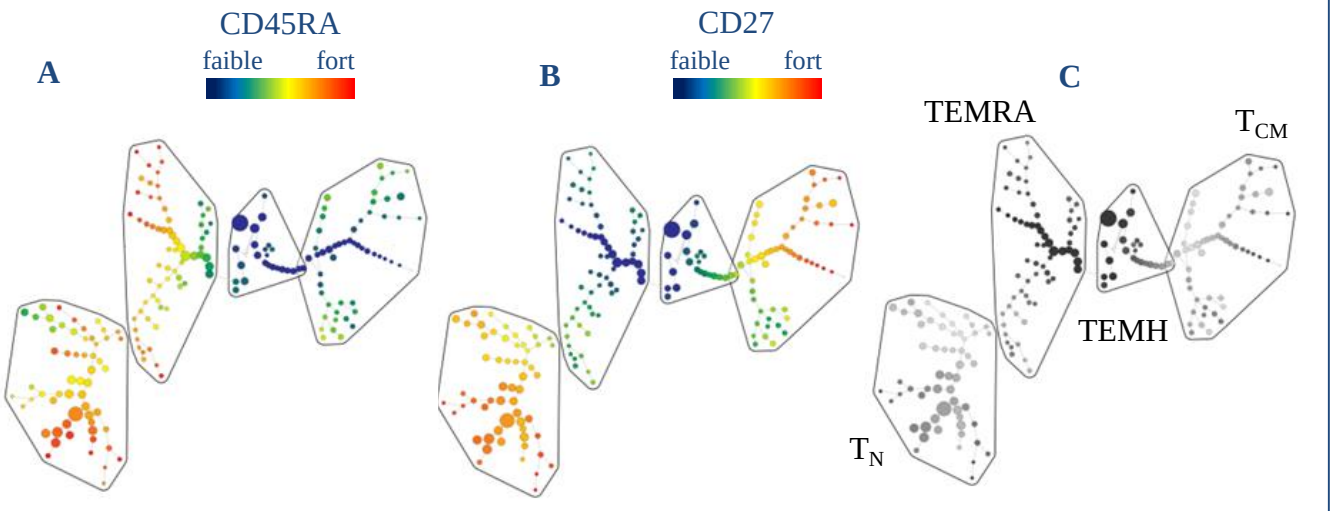


Figure 23 : Représentation en arbre Spade® des Lymphocytes T CD8⁺.
Les arbres Spade® représentent ici l'ensemble des lymphocytes T $CD8^+$ d'un volontaire sain, regroupés en clusters signalés par les pastilles. L'expression de CD27 **(A)** ou de CD45RA **(B)** de chaque cluster est signalisée par la couleur, le rouge indiquant l'expression la plus forte, et le bleu la plus faible. A partir des données de **(A)** et **(B)** on identifie les sous-populations lymphocytaires : T_{CM} ($CD45RA^-$ $CD27^+$), T_N ($CD45RA^+$ $CD27^+$), TEMH ($CD45RA^-$ $CD27^-$) et TEMRA ($CD45RA^+$ $CD27^-$) (**C**).

rouge signalise l'expression la plus forte et la couleur bleue l'expression la plus faible de chacun des marqueurs respectivement. L'expression de ces corécepteurs est comparée entre un volontaire sain et un patient représentatif du groupe rechute, au diagnostic, à la rémission et à la rechute. L'expression de HVEM est forte et homogène sur l'ensemble des sous-populations T_{CM}, T_N, TEMH et TEMRA chez le volontaire sain, comparé au patient pour lequel l'expression d'HVEM est moins importante que ce soit au diagnostic, à la RC et à la rechute. *A contrario* ICOS est essentiellement exprimé par les lymphocytes T les plus différenciées que sont les TEMRA. Au diagnostic, l'expression d'ICOS sur les TEMRA est nettement augmentée chez le patient comparé au volontaire sain, mais disparait à la RC et à la rechute. L'expression de PD-1 semble également restreinte aux TEMRA chez le volontaire sain. Au diagnostic, l'expression de PD-1 est augmentée sur les TEMRA du patient, mais également sur certains clusters de ses autres sous-populations T_{CM}, T_N et TEMH. A la RC, PD-1 est faiblement exprimé par l'ensemble des T CD8, et réapparait à la rechute sur certains clusters de TEMRA, T_N et TEMH. L'expression de BTLA chez le volontaire sain est faible et concerne seulement quelques clusters de T_N. Au diagnostic, BTLA est également peu exprimée, mais est plutôt retrouvée sur des clusters de TEMRA, son expression est encore plus faible à la RC et dans une moindre mesure à la rechute.

Ainsi on observe au diagnostic une diminution globale de l'expression de HVEM, une augmentation de l'expression de PD-1 et de ICOS portant sur les TEMRA, et une modification de l'expression de BTLA entre T_N et TEMRA, en comparaison avec les volontaires sains. A la RC, ces altérations ne sont plus constatées mais le profil des patients n'est néanmoins pas semblable à celui d'un volontaire sain, laissant supposer un effet direct de la chimiothérapie intensive sur les populations immunes. A la rechute, les altérations sont différentes de celles identifiées au diagnostic, suggérant le développement d'autres mécanismes d'échappement au système immunitaire.

3. Lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs représentent une petite population, de l'ordre de quelques pour cent parmi les lymphocytes totaux, impliquée dans la tolérance immune.

La fréquence des lymphocytes T régulateurs chez les patients est en moyenne identique à celle des volontaires sains (Figure 25A). Une analyse en sous-groupe met en évidence une diminution de la fréquence de Tregs dans le groupe RC comparé au groupe réfractaire (2,0% vs 4,1%,

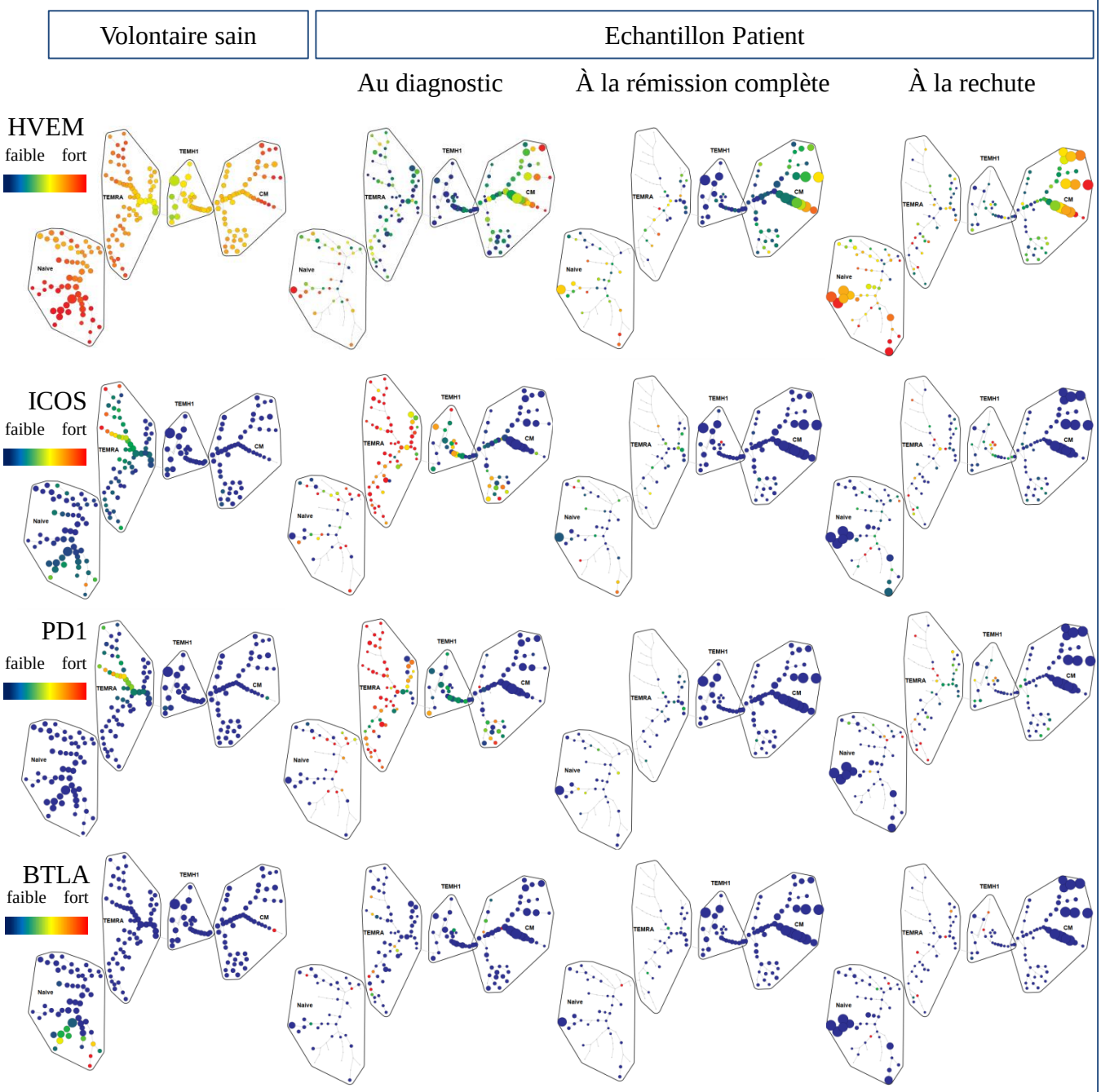


Figure 24 : Expression des récepteurs de cosignalisation HVEM, ICOS, PD-1 et BTLA sur les T CD8$^+$ clusterisés en arbre SPADE® selon leur expression de CD27 et CD45RA. Les arbres SPADE® ont été générés selon le même procédé que sur la figure 23, à partir de l'expression de CD27 et CD45RA sur les T CD8$^+$, pour identifier les sous-populations T_{CM}, T_N, TEMH et TEMRA. L'expression des récepteurs costimulateurs HVEM et ICOS, et co-inhibiteurs PD-1 et BTLA est représentée en intensité de couleur pour un volontaire sain et pour un patient au diagnostic, à la rémission et à la rechute, chacun représentatif de l'ensemble des patients de leur groupe.

P<0,05). On observe également une différence, certes non significative, entre groupe RC et groupe rechute (2,9% vs 4,1%, P<0,05) (Figure 25B).

En outre, on remarque une augmentation globale de l'expression de Ki-67, un marqueur intracellulaire de prolifération lorsqu'on compare les T_{reg} des patients à ceux des volontaires sains (p=0,07) (Figure 25C). Cette différence devient significative (p<0,05) pour les patients du groupe « rechute », bien que l'hétérogénéité soit importante dans ce groupe (Figure 25D).

Une analyse non-supervisée des phénotypes T_{reg} met en évidence deux groupes distincts de patients (Figure 25E). Le premier groupe présente une forte expression de récepteurs impliqués dans l'activation des T_{reg} (LAG-3, CD69), leur prolifération (Ki-67, 4-1BB), leur propriétés immunosuppressives (CTLA4, ICOS, 4-1BB), leur survie (CD28), ainsi que la conversion des T_{reg} depuis les populations de $TCD4^+$ (PD-1, CD28). Le second groupe présente un phénotype T_{reg} assimilé aux sujets sains avec une faible expression de ces mêmes récepteurs. Ce phénotype T_{reg} proche de celui du sujet sain est associé à une probabilité de rechute moindre (27% vs 73%, respectivement).

3. Discussion

Notre étude multiparamétrique des populations immunes de patients atteints de LAM met en évidence de nombreuses altérations phénotypiques dès le diagnostic, en corrélation avec la non-réponse à la chimiothérapie d'induction et la rechute après la RC.

Concernant les lymphocytes NK, nous avons montré qu'ils étaient présents en proportions semblables chez les patients et chez les volontaires sains, mais qu'ils présentaient des modifications dans leur profil de maturation et d'activation. Les NK immatures, exprimant fortement le CD56 et caractérisés par un haut potentiel de prolifération sont moins représentés chez les patients que chez les volontaires sains. L'expression du récepteur activateur NKp46 est également diminuée chez les patients, et l'on observe une tendance à l'augmentation du récepteur inhibiteur KIR. Le récepteur KIR ne sert pas seulement à empêcher l'activation du lymphocyte NK, mais prend également part au processus d'éducation et donc de maturation des NK. Finalement, activation et maturation NK sont liés et il semble cohérent de retrouver des anomalies affectant les deux processus. Ainsi les NK des patients, analysés par cytométrie de masse, semblent à la fois plus matures, mais plus difficilement activables par les cellules leucémiques. Ces résultats sont cohérents avec ceux présentés dans la partie recherche translationnelle sur les lymphocytes NK à partir de données de cytométrie de flux, et attestent

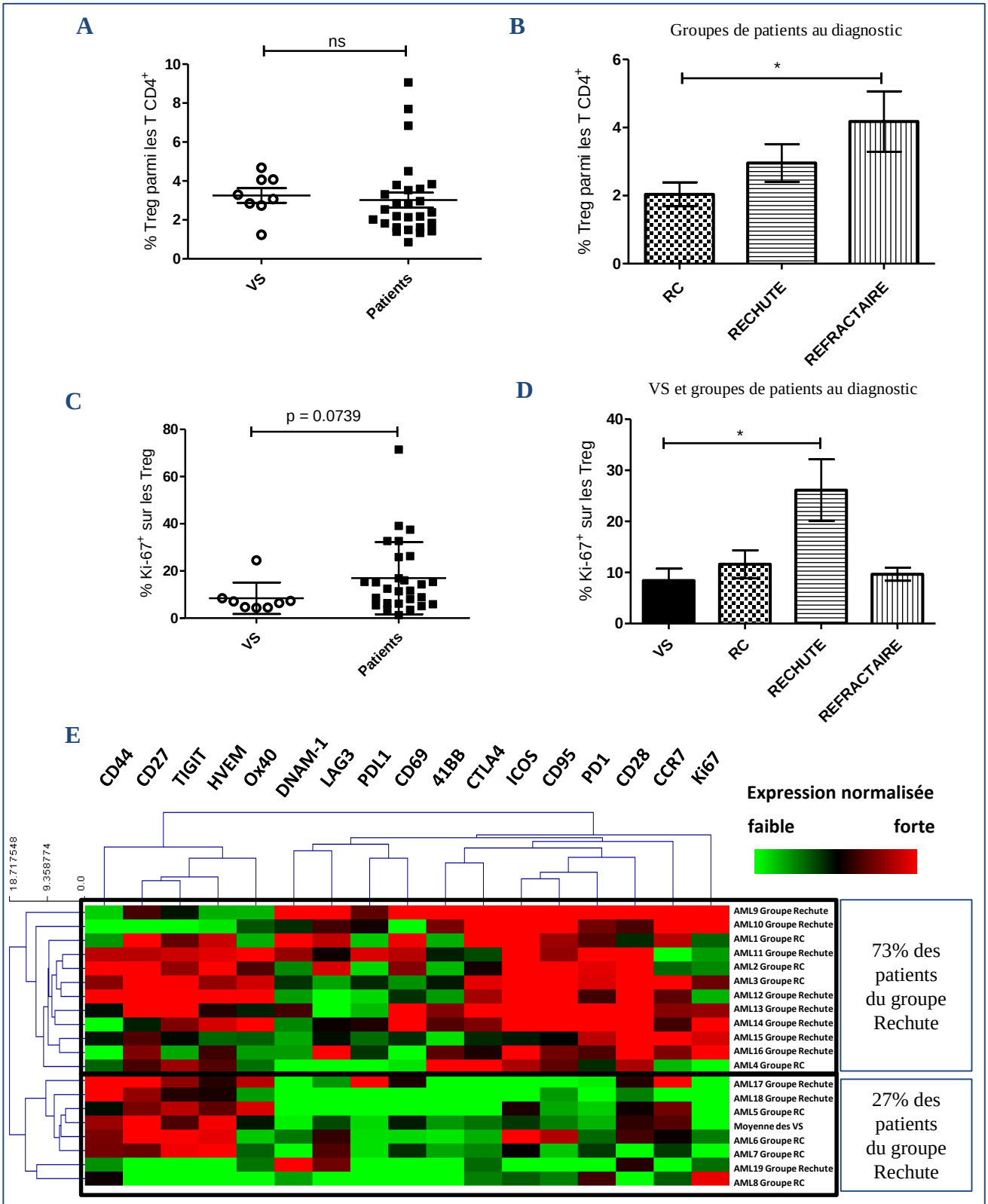


Figure 25 : Lymphocytes T régulateurs.
Comparaison des fréquences de T régulateurs exprimés en % de lymphocytes T CD4⁺ chez les volontaires sains comparés aux patients **(A)**, et comparaison entre les sous groupes de patients au diagnostic **(B)**. Comparaison de l'expression de Ki-67 sur les T reg des patients comparés aux volontaires sains **(C)** et entre les groupes de patients au diagnostic **(D).** Heat-map de l'ensemble des molécules de co-signalisation analysées dans le Panel et exprimés par les Treg (**E**) (* p<0,05).

de la fiabilité de la cytométrie de masse. Par ailleurs, ces altérations sont toujours la cible d'une recherche soutenue pour le développement de nouvelles immunothérapies visant à restaurer la cytotoxicité NK, comme par exemple le développement d'anticorps thérapeutiques anti-KIR, et plus récemment anti-NKG2A[63].

L'étude conjointe et approfondie des lymphocytes T met également en évidence des anomalies complexes, en terme de différenciation et de co-signalisation des lymphocytes T $CD8^+$. D'autre part, on observe chez certains patients une diminution de la sous-population T $CD8^+$ naïve, une augmentation de l'expression de corécepteurs inhibiteurs comme PD-1 majoritairement sur les TEMRA et la diminution d'expression du corécepteur activateur HVEM, au diagnostic comparé aux volontaires sains. Ces données sont en faveur d'un épuisement du contingent T, largement décrit dans les infections chroniques et les cancers[64]. L'épuisement des lymphocytes T entraine une diminution de leurs capacités fonctionnelles et de prolifération, liée en partie à la surexpression de corécepteurs inhibiteurs, comme notamment PD-1[65]. Le succès des traitements par inhibiteurs de checkpoint anti-PD-1 (Pembrolizumab, Nivolumab) dans le traitement des tumeurs solides[66] et plus récemment des lymphomes de Hodgkin[67] a permis leur enregistrement dans de nombreuses indications. Nos résultats indiquent que les stratégies thérapeutiques ciblant des molécules de co-signalisation pourraient également être utilisées dans la LAM afin de restaurer l'immunité antitumorale T. Par ailleurs ces résultats très prometteurs sur quelques marqueurs gagneront à être enrichis avec les autres données acquises sur de nombreux autres marqueurs tels que CD28, CTLA-4, TIM-3,…(Annexe 1) et dont l'analyse est toujours en cours.

Les lymphocytes T_{reg}, font également l'objet d'un intérêt certain en immuno-oncologie. Cette population rare (<5% des lymphocytes totaux) et indispensable à l'homéostasie du système immunitaire peut néanmoins devenir délétère dans la réponse antitumorale. Nos données montrent d'une part que les T_{reg} des patients prolifèrent plus que ceux des volontaires sains, notamment les patients du groupe « rechute », et d'autre part que les patients qui resteront en rémission complète prolongée ont moins de T régulateurs au diagnostic. En outre il semblerait que les T_{reg} des patients qui vont rechuter ont, dès le diagnostic, un profil différent des autres patients et des volontaires sains, avec une expression plus forte d'ICOS, de CTLA-4, et de PD-1. Ces résultats suggèrent donc que la présence au diagnostic de ces T_{reg} aux

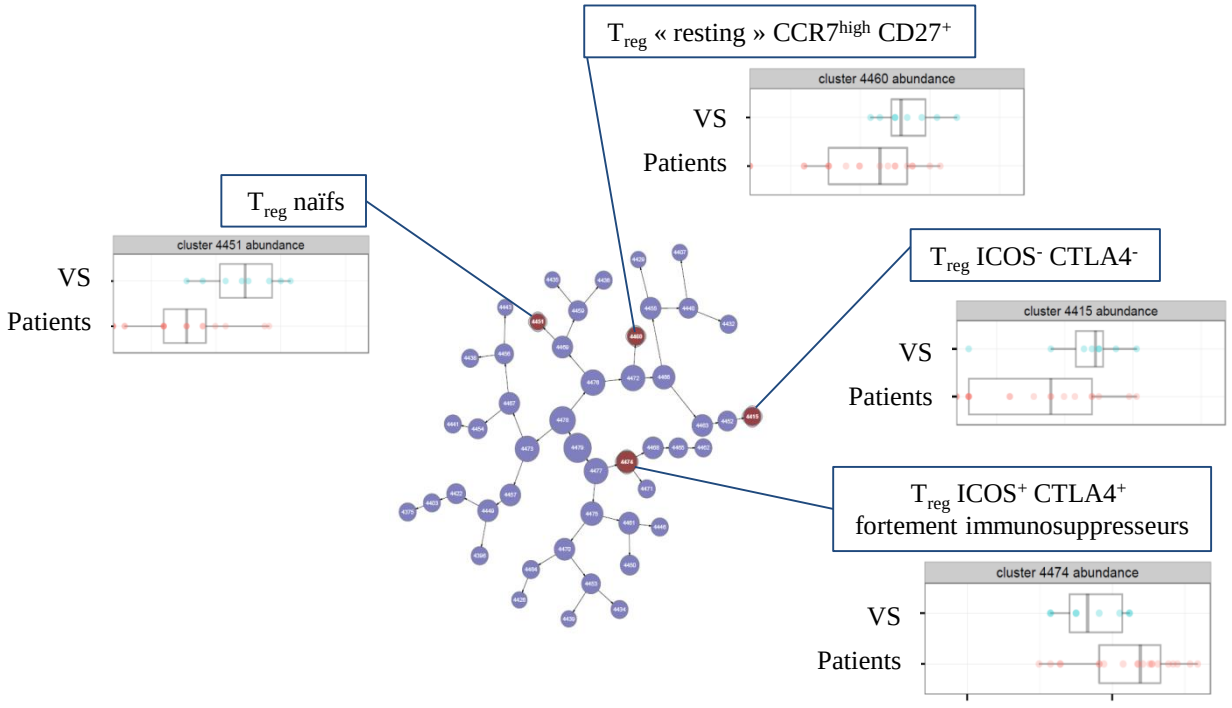


Figure 26 : Analyse CITRUS® des lymphocytes T régulateurs.
Cet arbre généré avec CITRUS® représente l'ensemble des Treg des patients au diagnostic et des volontaires sains regroupés en clusters homogènes de cellules, signalés par les pastilles. Les pastilles rouges sont celles pour lesquelles il y a une différence significative entre patients et volontaires sains, illustrée dans les box-plots.

propriétés particulièrement immunosuppressives et aux capacités de prolifération accrues n'est pas de bon pronostic pour l'évolution de la maladie.

L'analyse de ces jeux de données de forte dimensionalité ne peut être conduite conventionnellement, et nécessite de faire appel à de nouvelles méthodes bio-informatique, et notamment aux algorithmes de fenêtrage automatique comme Spade®. D'autres algorithmes, comme CITRUS® ont été récemment développés pour identifier de nouvelles populations immunes et de nouveaux biomarqueurs à partir des données de cytométrie de masse. Illustré sur les T_{reg} (Figure 26), cet algorithme fait appel au principe de fenêtrage automatique pour créer des clusters homogènes de cellules chez tous les patients au diagnostic et les volontaires sains, représentés ici en un seul arbre. Les clusters identifiés en rouge sont ceux pour lesquels il existe une différence significative entre le groupe de patients au diagnostic et les volontaires sains. Les patients ont ainsi moins de T_{reg} naïfs, de T_{reg} « resting », de T_{reg} $CTLA4^-$ $ICOS^-$, et plus de T_{reg} aux capacités immunosuppressives accrues $CTLA4^+$ $ICOS^+$, comme illustré dans les box-plots associés aux clusters d'intérêt. En maitrisant les risques liés au sur-apprentissage, cet algorithme permet d'identifier des sous-populations immunes très précises qui diffèrent selon l'expression d'un ensemble de marqueurs entre deux ou trois groupes de patients. Cet outil permettra donc d'identifier des combinaisons de marqueurs pertinentes pour discriminer les patients, le premier pas pour développer de nouveaux biomarqueurs sous la forme de signatures immunologiques complexe.

Des analyses similaires en cytométrie de flux auraient nécessité la mise au point d'au moins 3 panels différents, donc le fractionnement de l'échantillon entre ces panels, ce qui ferait perdre tout l'intérêt des analyses à haute résolution « single-cell » que propose la cytométrie de masse. Dans un contexte non tumoral Mason *et al*[68] se sont justement intéressés aux T_{reg} de volontaires sains, dont l'analyse par cytométrie de masse a permis d'identifier 22 sous-populations différentes de T_{reg} illustrant bien la complexité de ce contingent lymphocytaire. Une autre étude, publiée par Kordasti *et al*[69] s'intéresse à une sous-population spécifique de T_{reg} identifiée par cytométrie de masse et qui, d'après leur conclusion, serait prédictive de réponse à un traitement immunosuppresseur dans les insuffisances médullaires idiopathiques.

4. Conclusion

L’analyse haut débit de l’immunome permet de franchir une étape importante dans la caractérisation des anomalies de maturation et d’activation des cellules NK, des lymphocytes T et des populations immunosuppressives chez les patients atteints de LAM . Ces premiers résultats, extraits des données générées par cytométrie de masse à partir d’une cohorte de 28 patients et de 8 volontaires sains, illustrent la complexité des anomalies immunes dans un contexte tumoral. Les données obtenues sur les lymphocytes NK sont cohérentes avec celles obtenues en cytométrie de flux et largement décrites dans la littérature, permettant de valider cette technique récente et innovante. L’étude des lymphocytes T nécessitent de plus amples investigations. Nos données mettent en évidence des anomalies portant sur les T régulateurs, qui pourraient avoir des répercussions sur l’activation des lymphocytes T cytotoxiques, comme cela a été décrit dans d’autres cancers.

La cytométrie de masse, en utilisant des outils bio-informatiques appropriés pour l’analyse de jeux de données à forte dimensionnalité, apportera une vision plus complète des altérations de l’immunité antitumorale, qui sont intrinsèquement liées de par les interactions complexes et multiples entre les différents acteurs du système immunitaire. Une meilleure compréhension de ces anomalies permettra en outre de mieux appréhender les mécanismes d’échappement au système immunitaire des blastes leucémiques et ainsi de mieux prédire les patients à risque élevé de rechute.

Bibliographie

1. Monnereau, A. *et al* Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. *Institut National de Veille Sanitaire*.
2. Bennett, J. M. *et al.* Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British journal of haematology* **33,** 451–458 (1976).
3. Arber, D. A. *et al.* The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood* **127,** 2391–2405 (2016).
4. Howlader, N. et al. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2008, *National Cancer Institute*.
5. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129,** 424–447 (2017).
6. Li, W. *et al.* High-dose cytarabine in acute myeloid leukemia treatment: a systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE* **9,** e110153 (2014).
7. Gratwohl, A. *et al.* Cause of death after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in early leukaemias: an EBMT analysis of lethal infectious complications and changes over calendar time. *Bone Marrow Transplant.* **36,** 757–769 (2005).
8. O'Sullivan, B. *et al.* The TNM classification of malignant tumours-towards common understanding and reasonable expectations. *Lancet Oncol.* **18,** 849–851 (2017).
9. Fourcade, J. *et al.* CD8(+) T cells specific for tumor antigens can be rendered dysfunctional by the tumor microenvironment through upregulation of the inhibitory receptors BTLA and PD-1. *Cancer Res.* **72,** 887–896 (2012).
10. Galon, J. *et al.* Type, density, and location of immune cells within human colorectal tumors predict clinical outcome. *Science* **313,** 1960–1964 (2006).
11. Galon, J. *et al.* Immunoscore and Immunoprofiling in cancer: an update from the melanoma and immunotherapy bridge 2015. *J Transl Med* **14,** 273 (2016).
12. Fend, L. *et al.* Prognostic impact of the expression of NCR1 and NCR3 NK cell receptors and PD-L1 on advanced non-small cell lung cancer. *Oncoimmunology* **6,** e1163456 (2017).
13. Gentles, A. J. *et al.* The prognostic landscape of genes and infiltrating immune cells across human cancers. *Nat Med* **21,** 938–945 (2015).
14. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144,** 646–674 (2011).

15. Schreiber, R. D., Old, L. J. & Smyth, M. J. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science* **331,** 1565–1570 (2011).
16. Dranoff, G. Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* **4,** 11–22 (2004).
17. Dickinson, A. M. *et al.* Graft-versus-Leukemia Effect Following Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Leukemia. *Front Immunol* **8,** (2017).
18. Cossarizza, A. *et al.* Guidelines for the use of flow cytometry and cell sorting in immunological studies. *Eur. J. Immunol.* **47,** 1584–1797 (2017).
19. Kared, H., Martelli, S., Ng, T. P., Pender, S. L. F. & Larbi, A. CD57 in human natural killer cells and T-lymphocytes. *Cancer Immunol Immunother* **65,** 441–452 (2016).
20. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nature Reviews Immunology* **12,** 239–252 (2012).
21. Morvan, M. G. & Lanier, L. L. NK cells and cancer: you can teach innate cells new tricks. *Nat. Rev. Cancer* **16,** 7–19 (2016).
22. Moretta, L. *et al.* Cellular and molecular basis of natural killer and natural killer-like activity. *Immunol. Lett.* **88,** 89–93 (2003).
23. Sivori, S. *et al.* p46, a Novel Natural Killer Cell–specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *J Exp Med* **186,** 1129–1136 (1997).
24. Pende, D. *et al.* Identification and molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. *J. Exp. Med.* **190,** 1505–1516 (1999).
25. Vitale, M. *et al.* NKp44, a novel triggering surface molecule specifically expressed by activated natural killer cells, is involved in non-major histocompatibility complex-restricted tumor cell lysis. *J. Exp. Med.* **187,** 2065–2072 (1998).
26. Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol. Cell Biol.* **92,** 221–229 (2014).
27. Matta, J. *et al.* Induction of B7-H6, a ligand for the natural killer cell-activating receptor NKp30, in inflammatory conditions. *Blood* **122,** 394–404 (2013).
28. Rosental, B., Hadad, U., Brusilovsky, M., Campbell, K. S. & Porgador, A. A novel mechanism for cancer cells to evade immune attack by NK cells: The interaction between NKp44 and proliferating cell nuclear antigen. *Oncoimmunology* **1,** 572–574 (2012).
29. Baychelier, F. *et al.* Identification of a cellular ligand for the natural cytotoxicity receptor NKp44. *Blood* **122,** 2935–2942 (2013).

30. Walzer, T. *et al.* Identification, activation, and selective in vivo ablation of mouse NK cells via NKp46. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104,** 3384–3389 (2007).
31. Chiche, L. *et al.* The role of natural killer cells in sepsis. *J. Biomed. Biotechnol.* **2011,** 986491 (2011).
32. Imai, K., Matsuyama, S., Miyake, S., Suga, K. & Nakachi, K. Natural cytotoxic activity of peripheral-blood lymphocytes and cancer incidence: an 11-year follow-up study of a general population. *The Lancet* **356,** 1795–1799 (2000).
33. Mamessier, E. *et al.* Human breast cancer cells enhance self tolerance by promoting evasion from NK cell antitumor immunity. *J. Clin. Invest.* **121,** 3609–3622 (2011).
34. Pasero, C. *et al.* Inherent and Tumor-Driven Immune Tolerance in the Prostate Microenvironment Impairs Natural Killer Cell Antitumor Activity. *Cancer Res.* **76,** 2153–2165 (2016).
35. Pasero, C. *et al.* Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* **6,** 14360–14373 (2015).
36. Costello, R. T. *et al.* Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **99,** 3661–3667 (2002).
37. Sivori, S. *et al.* NKp46 is the major triggering receptor involved in the natural cytotoxicity of fresh or cultured human NK cells. Correlation between surface density of NKp46 and natural cytotoxicity against autologous, allogeneic or xenogeneic target cells. *Eur. J. Immunol.* **29,** 1656–1666 (1999).
38. Fauriat, C. *et al.* Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: Evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood* **109,** 323–330 (2007).
39. Chretien, A.-S. *et al.* NKp30 expression is a prognostic immune biomarker for stratification of patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Oncotarget* (2017).
40. Chretien, A.-S. *et al.* NKp46 expression on NK cells as a prognostic and predictive biomarker for response to allo-SCT in patients with AML. *Oncoimmunology* **6** (2017).
41. Chretien, A.-S. *et al.* Increased NK Cell Maturation in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol* **6,** 564 (2015).
42. Chretien, A.-S. *et al.* Natural Killer Defective Maturation Is Associated with Adverse Clinical Outcome in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Front Immunol* **8,** 573 (2017).
43. Chen, L. & Flies, D. B. Molecular mechanisms of T cell co-stimulation and co-inhibition. *Nat. Rev. Immunol.* **13,** 227–242 (2013).

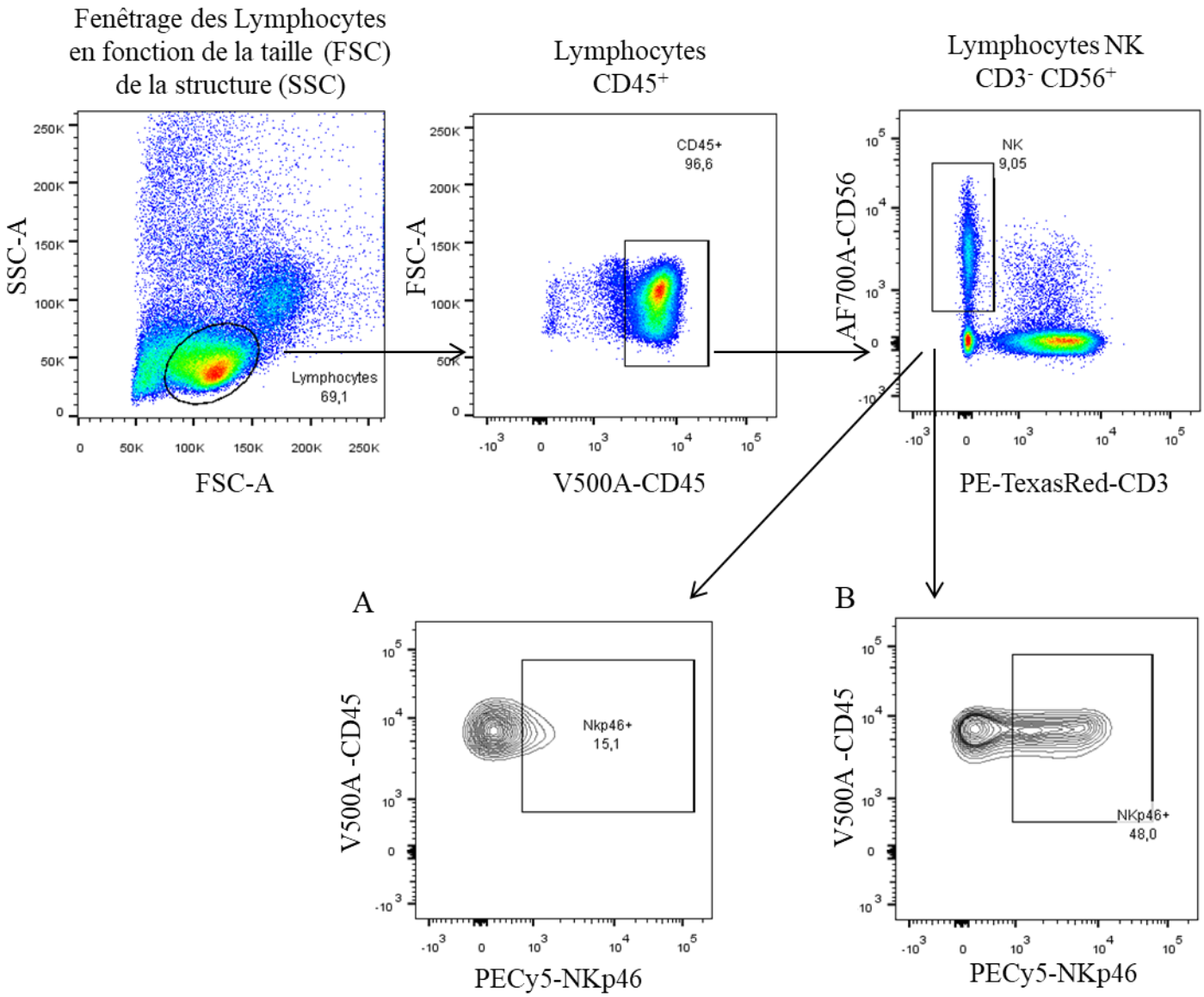
44. Kaech, S. M. & Cui, W. Transcriptional control of effector and memory CD8+ T cell differentiation. *Nat Rev Immunol* **12,** 749–761 (2012).
45. Willinger, T., Freeman, T., Hasegawa, H., McMichael, A. J. & Callan, M. F. C. Molecular signatures distinguish human central memory from effector memory CD8 T cell subsets. *J. Immunol.* **175,** 5895–5903 (2005).
46. Jiang, S. & Dong, C. A complex issue on CD4(+) T-cell subsets. *Immunol. Rev.* **252,** 5–11 (2013).
47. Mougiakakos, D., Choudhury, A., Lladser, A., Kiessling, R. & Johansson, C. C. Regulatory T cells in cancer. *Adv. Cancer Res.* **107,** 57–117 (2010).
48. Bates, G. J. *et al.* Quantification of regulatory T cells enables the identification of high-risk breast cancer patients and those at risk of late relapse. *J. Clin. Oncol.* **24,** 5373–5380 (2006).
49. Shen, Z. *et al.* Higher intratumoral infiltrated Foxp3+ Treg numbers and Foxp3+/CD8+ ratio are associated with adverse prognosis in resectable gastric cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **136,** 1585–1595 (2010).
50. Wolf, D. *et al.* The expression of the regulatory T cell-specific forkhead box transcription factor FoxP3 is associated with poor prognosis in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* **11,** 8326–8331 (2005).
51. Tao, H. *et al.* Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* **75,** 95–101 (2012).
52. Jang, J.-E. *et al.* Crosstalk between Regulatory T Cells and Tumor-Associated Dendritic Cells Negates Anti-tumor Immunity in Pancreatic Cancer. *Cell Rep* **20,** 558–571 (2017).
53. Ustun, C., Miller, J. S., Munn, D. H., Weisdorf, D. J. & Blazar, B. R. Regulatory T cells in acute myelogenous leukemia: is it time for immunomodulation? *Blood* **118,** 5084–5095 (2011).
54. Shenghui, Z. *et al.* Elevated frequencies of $CD4^+$ $CD25^+$ CD127lo regulatory T cells is associated to poor prognosis in patients with acute myeloid leukemia. *Int. J. Cancer* **129,** 1373–1381 (2011).
55. Benchetrit, F. *et al.* Les lymphocytes T CD8 : rôle dans l'immunosurveillance et l'immunothérapie antitumorale. *Bulletin du Cancer* **90,** 677–685 (2003).
56. Catros, V. *et al.* Lymphocytes Tγδ en cancérologie - Des lymphocytes tueurs non conventionnels. *Med Sci (Paris)* **26,** 185–192

57. Montagna, D. *et al.* Emergence of antitumor cytolytic T cells is associated with maintenance of hematologic remission in children with acute myeloid leukemia. *Blood* **108,** 3843–3850 (2006).
58. Ozkazanc, D., Yoyen-Ermis, D., Tavukcuoglu, E., Buyukasik, Y. & Esendagli, G. Functional exhaustion of CD4(+) T cells induced by co-stimulatory signals from myeloid leukaemia cells. *Immunology* **149,** 460–471 (2016).
59. Bandura, D. R. *et al.* Mass cytometry: technique for real time single cell multitarget immunoassay based on inductively coupled plasma time-of-flight mass spectrometry. *Anal. Chem.* **81,** 6813–6822 (2009).
60. Bendall, S. C. *et al.* Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. *Science* **332,** 687–696 (2011).
61. Fread, K. I., Strickland, W. D., Nolan, G. P. & Zunder, E. R. An updated debarcoding tool for mass cytometry with cell type-specific and cell sample-specific stringency adjustment. *Pac Symp Biocomput* **22,** 588–598 (2016).
62. Finck, R. *et al.* Normalization of mass cytometry data with bead standards. *Cytometry A* **83,** 483–494 (2013).
63. Muntasell, A. *et al.* Targeting NK-cell checkpoints for cancer immunotherapy. *Curr. Opin. Immunol.* **45,** 73–81 (2017).
64. Wherry, E. J. T cell exhaustion. *Nat. Immunol.* **12,** 492–499 (2011).
65. Hashimoto, M. *et al.* CD8 T Cell Exhaustion in Chronic Infection and Cancer: Opportunities for Interventions. *Annu. Rev. Med.* **69,** 301–318 (2018).
66. Topalian, S. L. *et al.* Safety, activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer. *N. Engl. J. Med.* **366,** 2443–2454 (2012).
67. Ansell, S. M. *et al.* PD-1 blockade with nivolumab in relapsed or refractory Hodgkin's lymphoma. *N. Engl. J. Med.* **372,** 311–319 (2015).
68. Mason, G. M. *et al.* Phenotypic Complexity of the Human Regulatory T Cell Compartment Revealed by Mass Cytometry. *J. Immunol.* **195,** 2030–2037 (2015).
69. Kordasti, S. *et al.* Deep phenotyping of Tregs identifies an immune signature for idiopathic aplastic anemia and predicts response to treatment. *Blood* **128,** 1193–1205 (2016).

Annexe 1 : Panels d'anticorps utilisés pour les marquages en cytométrie de masse.

Panel 1					Panel 2			
Marquage extracellulaire								
Anticorps	**canal**	**Metal**	**Titre**		**Anticorps**	**canal**	**Métal**	**Titre**
CD45	89	Y	100		CD45	89	Y	100
CD3	115	In	200		CD3	115	In	200
TCRVδ2	141	Pr	400		CD45RA	143	Nd	400
CD19	142	Nd	400		CD270 (HVEM)	144	Nd	400
CD45RA	143	Nd	400		CD8a	146	Nd	100
CD4	145	Nd	100		CD25 (IL-2R)	149	Sm	100
CD8	146	Nd	100		OX 40	150	Nd	100
NKG2C	152	Sm	100		CD278 (ICOS)	151	Eu	100
TCRpanγδ	153	Eu	100		TIM-3	153	Eu	100
CD158b1/b2j	154	Sm	100		TIGIT	154	Sm	100
CD27	155	Gd	200		CD279 (PD-1)	155	Gd	100
NKG2D	160	Gd	100		CD274 (PD-L1)	156	Gd	100
NKp46	162	Dy	100		4-1BB	158	Gd	100
DNAM-1	164	Dy	200		CD197 (CCR7)	159	Tb	100
NKG2A	165	Ho	400		CD28	160	Gd	100
CD96	166	Er	100		CD272 (BTLA)	163	Dy	100
CD158a/h	168	Er	50		CD95	164	Dy	800
NKp30	169	Tm	100		CD127 (IL-7Rα)	165	Ho	100
CD57	172	Yb	1600		CD44	166	Er	100
CD56	176	Yb	400		CD27	167	Er	200
CD13	biotinylé	X	22		CD69	168	Er	200
CD33	biotinylé	X	100		TCRVδ2	169	Tm	400
CD34	biotinylé	X	50		CD226 (DNAM-1)	171	Yb	100
					CD57	172	Yb	1600
					CD4	174	Yb	100
					LAG3	175	Lu	100
					CD56	176	Yb	400
					CD16	209	Bi	100
					CD13	biotinylé	X	22
					CD33	biotinylé	X	100
					CD34	biotinylé	X	50
Marquage secondaire								
anti-biotinylé	170	Er	50		anti-biotinylé	170	Er	50
Marquage intracellulaire								
Bcl2	150	Nd	400		CD152 (CTLA-4)	161	Dy	100
Bcl-XL	158	Gd	100		Ki67	141	Pr	800
Ki67	159	Tb	800					

Annexe 2 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de flux (BD FACSCanto II®).



On sélectionne les lymphocytes en fonction de leur taille et de leur granulosité sur le graphe SSC/FSC qui n'existe pas en cytométrie de masse, puis on sélectionne les $CD45^+$, puis les NK sont définis par l'expression de CD56 et l'absence de CD3. On peut ensuite étudier l'expression de NKp46, comme en cytométrie de masse, chez un patient atteint de LAM au diagnostic (A) et chez un volontaire sain (B).

Résumé

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) représentent la première hémopathie aiguë de l'adulte, avec près de 3000 nouveaux cas par an en France. La chimiothérapie d'induction permet d'obtenir une rémission complète (RC) chez la majorité des patients. Toutefois nombre d'entre eux rechutent dans les deux ans suivant la RC. La stratification pronostique des patients selon les recommandations de l'European Leukemia Network (ELN) sur des critères de biologie moléculaire et de cytogénétique permet d'identifier en particulier un groupe de patients au pronostic défavorable, pour lesquels l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est la meilleure option thérapeutique. Cependant la stratification actuelle ne permet pas encore d'identifier tous les patients à haut risque de rechute. Il est donc nécessaire de rechercher de nouveaux biomarqueurs pronostiques.

Dans le contexte tumoral, les lymphocytes NK constituent des acteurs privilégiés de l'immunosurveillance. Des altérations phénotypiques associées à des anomalies fonctionnelles ont été largement décrites dans les LAM et sont corrélées avec l'évolution clinique des patients. L'étude approfondie des Natural Cytotoxicity Triggering Receptor (NCR) a abouti au développement de deux biomarqueurs : NKp30, pronostique de survie, et NKp46, prédictif de réponse à l'allogreffe de CSH.

Néanmoins la complexité et la multiplicité des interactions entre système immunitaire et cellules tumorales nécessitent d'étudier le profil immunologique de chaque patient dans son ensemble. Le développement d'une nouvelle technique multiparamétrique, la cytométrie de masse, permet à ce jour d'étudier simultanément près de 40 marqueurs, sur un échantillon unique de cellules mononuclées du sang périphérique. Ainsi, en étudiant conjointement les altérations portant sur les populations NK, mais également d'autres populations immunes impliquées dans l'immunité antitumorale, comme les lymphocytes T CD8 et T γδ cytotoxiques, ou encore des populations immunosuppressives comme les T régulateurs qui jouent un rôle dans l'échappement tumoral, il devient possible de développer des signatures immunologiques complexes qui serviront à élaborer de nouveaux critères de stratification pronostique.

SERMENT DE GALIEN

Je jure, en présence de mes maîtres de la Faculté, des conseillers de l'Ordre des pharmaciens et de mes condisciples :

- *D'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.*
- *D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.*
- *De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.*
- *En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.*

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois couvert d'opprobre, méprisé de mes confrères, si j'y manque.

Université d'Aix-Marseille – Faculté de Pharmacie – 27 boulevard Jean Moulin – CS 30064 - 13385 Marseille cedex 05 - France
Tél. : +33 (0)4 91 83 55 00 - Fax : +33 (0)4 91 80 26 12