



HAL
open science

Étude du biomarqueur NKP46 dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte

Charlotte Cordier

► **To cite this version:**

Charlotte Cordier. Étude du biomarqueur NKP46 dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-02952866

HAL Id: dumas-02952866

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02952866>

Submitted on 29 Sep 2020

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.

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 25 septembre 2020

Par Mme **Charlotte CORDIER**
Née le 19 mars 1992 à Gap

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-----

**ETUDE DU BIOMARQUEUR NKP46 DANS LES LEUCEMIES
AIGUES MYELOIDES DE L'ADULTE**

-----oOo-----

JURY :

Président : M. le Professeur Jean-Paul BORG
Membres : M. le Professeur Daniel OLIVE
M. le Professeur Christophe DUBOIS
Mme le Docteur Anne-Catherine LHOUMEAU
Mme le Docteur Anne-Sophie CHRETIEN
Mme le Docteur Florence GOLESI

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

ADMINISTRATION :

<i>Doyen :</i>	Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
<i>Vice-Doyens :</i>	M. Jean-Paul BORG, M. François DEVRED, M. Pascal RATHELOT
<i>Chargés de Mission :</i>	Mme Pascale BARBIER, M. David BERGE-LEFRANC, Mme Manon CARRE, Mme Caroline DUCROS, Mme Frédérique GRIMALDI, M. Guillaume HACHE
<i>Conseiller du Doyen :</i>	M. Patrice VANELLE
<i>Doyens honoraires :</i>	M. Patrice VANELLE, M. Pierre TIMON-DAVID,
<i>Professeurs émérites :</i>	M. José SAMPOL, M. Athanassios ILIADIS, M. Henri PORTUGAL, M. Philippe CHARPIOT
<i>Professeurs honoraires :</i>	M. Guy BALANSARD, M. Yves BARRA, Mme Claudette BRIAND, M. Jacques CATALIN, Mme Andrée CREMIEUX, M. Aimé CREVAT, 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
<i>Chef des Services Administratifs :</i>	Mme Florence GAUREL
<i>Chef de Cabinet :</i>	Mme Aurélie BELENGUER
<i>Responsable de la Scolarité :</i>	Mme Nathalie BESNARD

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 COSMETOLOGIE

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

BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE ET BIOTHERAPIES
PHARMACO ECONOMIE, E-SANTE

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

Mme Françoise DIGNAT-GEORGE
Mme Laurence CAMOIN-JAU
Mme Florence SABATIER-MALATERRE
Mme Nathalie BARDIN

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	M. Thierry AUGIER M. Edouard LAMY Mme Alexandrine BERTAUD Mme Claire CERINI Mme Edwige TELLIER M. Stéphane POITEVIN
HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Aurélie LEROYER M. Romaric LACROIX Mme Sylvie COINTE
MICROBIOLOGIE	Mme Michèle LAGET Mme Anne DAVIN-REGLI Mme Véronique ROUX M. Fadi BITTAR Mme Isabelle PAGNIER Mme Sophie EDOUARD M. Seydina Mouhamadou DIENE
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

ATER

BIOCHIMIE FONDAMENTALE, MOLECULAIRE ET CLINIQUE	Mme Anne-Claire DUCHEZ
BIOLOGIE CELLULAIRE ET MOLECULAIRE	Mme Alexandra WALTON

A.H.U.

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE	Mme Mélanie VELIER
----------------------------	--------------------

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine BADENS
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. David BERGE-LEFRANC
CHIMIE MINERALE ET STRUCTURALE – CHIMIE THERAPEUTIQUE	M. Pascal RATHELOT M. Maxime CROZET
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE	M. Patrice VANELLE M. Thierry TERME
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOGNOSIE	Mme Evelyne OLLIVIER

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOLOGAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	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. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	M. Mathieu CERINO
--	-------------------

ATER

CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Duje BURIC
---	---------------

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

PHARMACIE CLINIQUE	M. Stéphane HONORÉ
PHARMACODYNAMIE	M. Benjamin GUILLET
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	M. Bruno LACARELLE Mme Frédérique GRIMALDI M. Joseph CICCOLINI

MAITRES DE CONFERENCES

PHARMACODYNAMIE	M. Guillaume HACHE Mme Ahlem BOUHLEL M. Philippe GARRIGUE
PHYSIOLOGIE	Mme Sylviane LORTET Mme Emmanuelle MANOS-SAMPOL
TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Raphaëlle FANCIULLINO Mme Florence GATTACECCA
TOXICOLOGIE GENERALE ET PHARMACIE CLINIQUE	M. Pierre-Henri VILLARD Mme Caroline SOLAS-CHESNEAU Mme Marie-Anne ESTEVE

A.H.U.

PHYSIOLOGIE / PHARMACOLOGIE PHARMACIE CLINIQUE	Mme Anaïs MOYON M. Florian CORREARD
---	--

ATER.

TOXICOLOGIE ET PHARMACOCINETIQUE	Mme Anne RODALLEC
----------------------------------	-------------------

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO,
Pharmacien-Praticien hospitalier Mme

Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-
Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET,
Pharmacien titulaire

Mme Florence
LEANDRO, Pharmacien
adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

M. Patrick REGGIO, Pharmacien conseil, DRSM de l'Assurance Maladie

Mme Clémence TABELLE,
Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG,
Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

Thom,

*Je te dédie cette thèse,
Pour m'avoir écouté, conseillé et soutenu depuis le début de ce master,
Et surtout pour m'avoir supporté quand j'étais insupportable.
Je te promets que tu n'entendras plus jamais parler de NKp46.*

*Je te remercie d'être une si belle personne,
Honnête, intègre, entière, franche, vraie et sincère.
Merci pour ton humour, ta générosité et ton si grand cœur.
Je te remercie de faire de moi, chaque jour, une personne meilleure.
Merci de m'aimer et de me rendre heureuse depuis plus de 8 ans.
Merci de te mettre en quinze pour me faire plaisir ...
Merci pour cette magnifique demande,
J'ai hâte de devenir ta femme.
Je t'aime.*

Remerciements

Aux membres du jury,

Monsieur le Professeur Jean-Paul BORG,

*Vous m'avez fait l'honneur de présider ce jury de thèse.
Je vous remercie de l'attention que vous avez bien voulue porter à ce travail.
Je vous assure ma sincère reconnaissance.*

Monsieur le Professeur Daniel Olive,

*Vous m'avez fait l'honneur d'accepter de diriger cette thèse.
Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein de votre laboratoire Immunologie des tumeurs
et de m'avoir permis de travailler dans un environnement scientifique de qualité.
Je vous exprime toute ma reconnaissance et vous assure mon profond respect.*

Monsieur le Professeur Christophe Dubois,

*Vous m'avez fait l'honneur de faire partie de ce jury.
Je vous remercie d'avoir accepté de juger ce travail.
Je vous assure ma parfaite considération.*

Madame le Docteur Anne-Catherine Lhoumeau,

*Je suis honorée et heureuse que tu aies accepté de faire partie de ce jury.
Je te remercie pour ton aide, ta disponibilité, ta gentillesse, ta bienveillance et ton écoute.
C'est un plaisir de travailler à tes côtés chaque jour.
Je t'assure ici mon profond respect.*

Madame le Docteur Anne-Sophie Chrétien,

*Je suis honorée que tu m'aies confié ce sujet de recherche il y a plus de 2 ans maintenant.
Je te remercie pour ton encadrement et ton expertise tout au long de ce master.
Je t'assure ici toute ma gratitude.*

Madame le Docteur Florence Golési,

*Je suis honorée et heureuse que tu aies accepté de faire partie de ce jury.
Je te remercie pour tes précieux conseils qui m'ont permis d'avancer.
Je te remercie d'apporter la joie et la bonne humeur tous les jours au laboratoire.
Je suis très heureuse de te connaître et de pouvoir apprendre à tes côtés.
Je t'assure ici ma parfaite reconnaissance.*

A toute l'équipe de l'IPC,

Je vous remercie pour votre accueil si chaleureux et votre bienveillance.

*Je vous remercie pour ces 3 semestres passés auprès de vous,
qui resteront les plus beaux de mon internat.*

Anne, Véro, Carine, Anne-Cath et Flo,

*Je vous remercie pour votre accueil si chaleureux parmi vous.
Je suis si heureuse de travailler et d'apprendre à vos côtés chaque jour.*

*Je vous remercie pour tout ce que vous m'enseignez au quotidien,
Pour votre humanité, votre compréhension et vos précieux conseils,
Dans ma vie professionnelle mais aussi personnelle.*

*Merci de la confiance que vous m'avez accordée.
J'aurai aimé de tout cœur continuer à travailler à vos côtés.*

Antoine,

*Je te remercie de partager ta passion pour la cytogénétique.
Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.
Travailler à tes côtés est un plaisir.*

A toute l'équipe de la « cave »,

*Je vous remercie infiniment pour votre accueil, votre disponibilité et votre aide.
Je vous remercie de m'avoir accompagné à chaque étape du master.
Merci de m'avoir fait découvrir votre univers, toujours dans la joie et la bonne humeur.
Merci pour votre gentillesse et vos sourires chaque jour.*

Un très grand merci à Aude, Marie-Sarah et Nassim,

*Pour votre soutien et tous nos fous-rires,
Je ne peux imaginer cette année de master sans vous à mes côtés.*

Un très grand merci :

A toi, maman,

*D'avoir toujours été là dans les moments difficiles.
Merci pour tous les sacrifices que tu as fait pour moi pendant cette P1,
d'être descendue tous ces week-ends, d'avoir préparé tous ces repas.*

*Merci pour ton soutien, tes petits cadeaux et attentions.
Sans toi, je n'aurai jamais pu réussir.*

*Merci de m'avoir accompagnée à Paris
pour ce concours si horrible et d'avoir stressé avec moi.*

Merci pour tous ces moments mère-fille partagés que j'aime tant.

A toi, Papa,

*Merci d'être toujours là quand j'ai besoin de toi.
Je n'arriverai jamais à écrire tout ce que je ressens
mais sache que je suis tellement reconnaissante de tout ce tu fais pour moi.*

*Tu es la première personne que j'appelle lorsque j'ai un problème parce que je sais que tu
vas toujours trouver une solution, même à des dizaines de kilomètres (« je suis pas magicien
moi, débrouilles toi » beh si un peu quand même...).*

Merci pour tout ce que tu as fait pour moi toutes ces années d'études.

*Tu en auras imprimé des diaporamas
et scanné des fiches pendant cette année de concours ...*

Je te remercie pour ta patience infinie.

Je peux enfin te répondre : « ça y est je ne suis plus étudiante !!! »

***Merci à vous 2 pour votre amour inconditionnel et
votre soutien inébranlable pendant ces longues études.***

Cette réussite je vous la dois.

Merci d'être les parents formidables que vous êtes, tout simplement.

J'ai une chance infinie de vous avoir.

J'ai beaucoup de mal à dire ces choses-là, mais je vous aime très fort.

A ma famille,

Mon petit frère,

Par où commencer ?

*Tellement de choses vécues ensemble,
ces moments hors du temps à Castellane avec nos courses de kart et de moto,
notre complicité lors de nos belles vacances en famille,
nos bêtises, ton front se souvient encore du pare-brise de la R5...
Je suis heureuse que tu te sois rapproché de nous et
que l'on se retrouve enfin après toutes ses années éloignées.*

Anne-Marie,

*Je suis heureuse d'être ta belle-sœur et que tu partages la vie de mon petit frère.
Je te souhaite beaucoup de bonheur, tu le mérites.*

Papy Robert,

*J'aurai tellement aimé profiter plus longtemps
de toi, de ton sourire et de ton humour.
J'adorais nos parties de cartes si animées.
Tu me manques tellement.*

Mamie Claire,

*Pour tout ce que tu fais pour moi depuis tant d'années.
Merci pour tous ces légumes, ces conserves et ces si bons plats.
Je me demande bien ce que j'aurai mangé sans toi.
Merci pour toutes nos conversations.
Merci de toujours m'écouter.*

Mamie Marie,

*Pour ces longues discussions quand ça n'allait pas.
De toujours m'avoir poussée à travailler et étudier pour atteindre l'excellence.*

Papy Roger,

*Pour ton humour et ton impatience,
pour tous ses moments passés ensemble à Castellane.
Merci de m'avoir appris à conduire sur tes genoux et passer les vitesses sur la Xsara.
Je suis impressionnée par ton incroyable combativité.*

Valou,

*Je suis admirative de ta force pour faire face à toutes les épreuves que tu as dû affronter
et de ton courage pour continuer malgré tout d'avancer et de profiter de la vie.
Je suis heureuse de t'avoir comme marraine.
Gardes ton sourire et continues de mettre les 2 pieds dans le plat,
c'est comme ça qu'on t'aime.*

A mes cousins,

Votre présence aujourd'hui me touche énormément.

A l'ensemble de ma famille,

*D'avoir toujours été là.
Vous êtes tellement important pour moi.*

A ma belle-famille,

Juju, Bapt', Bertrand et Sophie (sans oublier Pepper),

*Merci de m'avoir si bien accueillie parmi vous.
Merci pour tous ces bons moments partagés ensemble à Gap & Chalmazel.
Merci de me faire sentir comme dans ma propre famille.
Votre présence aujourd'hui me touche énormément.*

Virginie,

Pour ton extrême gentillesse et ta bienveillance.

Romain,

Pour ton sourire et ta générosité.

A tous mes amis,

Les coupaings,

*Eloïse, Prithvi, Nazim, Nahela, Etienne, Marine, Céline,
Arnaud, Paul, Lola, Adrien, Pierre-Lou, Rachel, Vincent et Camille.*

*Toutes ces vacances inoubliables, de Javea aux Baléares,
sans oublier nos folles aventures maltaises (comment oublier ce cher voisin mafieux italien),
nos parties de beach-volley, nos week-end ski que j'aime tant,
et tous les futurs moments que j'ai hâte de partager avec vous.*

*Merci à vous les mecs, sans toutes vos conneries,
nous n'aurions jamais partagés autant de fous rires.*

Les amis je vous aime, mais teeeeelleeeeeemeeennnnnt ...

Nazim, Elo et Prith,

*Ce voyage inoubliable restera gravé à jamais.
Je suis heureuse que vous ayez contribué au plus beau jour de ma vie.*

Nazim,

Tu es un ami en or.

*Je sais que je peux et que je pourrais toujours compter sur toi.
Merci de nous apporter ton aide et d'être toujours là pour nous.
« La mouche » est heureuse d'avoir participé à ton incroyable progression en ski.
Saches que je suis très fière de toi et que tu m'impressionnes.*

Elo,

*Je suis admirative et impressionnée par ta force et ton incroyable courage,
malgré tout ce que tu as enduré tu gardes ton sourire et ta joie de vivre communicative.
Je suis honorée d'avoir fait partie de tes témoins d'amour,
et d'avoir assisté au plus beau jour de ta vie.*

Prith,

*Merci pour ton humour, si léger et subtil (#TAX).
Tes remarques m'ont permis de changer et j'espère de m'améliorer,
Ça y est je vois le verre à moitié plein.
Meilleur joueur du time bomb,
je crois que je n'arriverai jamais à te cerner.*

Rouxoudou,

*Merci pour tous ces bons moments passés avec toi,
sur les pistes, dans la poudreuse, en soirée, dernière notre reflex,
autour d'une bière ou d'un bon verre de vin...
Chaque instant partagé avec toi n'est que bonheur et rigolade.*

Marine,

*Merci ton sourire à toute épreuve et ton humour.
J'admire ton énergie et la façon dont tu vois les choses, toujours du côté positif.
Cette thèse enfin finie je pourrais t'accompagner boire des cafés au soleil
et profiter avec toi de chaque instant que la vie a à nous offrir.*

Céline,

*Merci pour ton extrême gentillesse, ta sensibilité et ta bienveillance.
Merci pour tes attentions, tes excellents brunchs et tes blagues de pédiatre qui te font si rire !!
Merci pour toutes tes histoires que tu nous partages, avec tant de sincérité
et d'humour malgré toi ... (« moi un jour, en colonie de vacances ... »)*

Nahela,

*Merci pour ta joie de vivre, ton grain de folie et tes goûts musicaux,
J'ai enfin trouvé ma partenaire pour m'égosiller sur les chansons des années 2000 !!
Je compte sur toi ce soir pour tout déchirer sur Larusso ;)*

Vinçou,

*Merci pour toutes tes étourderies qui nous font tant rire,
ce gâteau à Malte et cette portière à Serre-Che font parties de mes number one.*

Jamon,

*Merci pour ta joie de vivre permanente,
tes danses endiablées sur Aya Nakamura,
tes chansons qui nous rendent tous fous (#quiveutdesbonbons),
tes dérapages en soirée qui nous font trembler (#pointsdesuturenCorse)...*

Lola,

*Je te remercie pour ton écoute, ton optimisme et ta bonne humeur.
J'ai hâte de retrouver tes petits sautilllements au volley et à la balle du prisonnier.*

Adri,

*Merci d'être toujours partant pour faire un jeu
et d'être si pointilleux sur le respect des règles !!
Merci pour toutes tes danses en soirée
mais surtout pour ta performance du « backpack kid ».*

Pilou,

*Merci pour tes cocktails et tous ces jeux de carte
qui nous auront achevés lors de nos soirées.*

A la fine équipe des radiologues,

Kawtar, Matthieu, Idir & Ahmed,

*Merci pour votre gentillesse et votre joie de vivre.
Chaque moment passé avec vous est un plaisir.*

Ne changez rien vous êtes au top !

Idir je compte sur ton déhanché de folie pour endiabler la piste de danse ce soir !!

A mes amis pharmaciens,

Marinette,

*Merci pour toutes nos soirées et ces bons moments passés ensemble,
ou moins bons ... Ce yaourt à la chèvre en lendemain de soirée on en parle ??*

*Ce premier choix d'internat avec toi aura été une évidence pour moi,
je suis heureuse de t'avoir comme amie.*

Que d'aventures depuis, Des Mées que l'on n'a jamais trouvés au fin fond de la Bolivie.

Merci pour ce magnifique voyage avec toi.

Cé,

*Merci pour toutes ces années partagées ensemble,
de nos soirées au Final, à Sigoyer, des bals de promo du lycée à la fac.*

Merci d'avoir toujours été là dans les moments les plus difficiles.

Emma,

*Je te remercie pour ton énergie débordante en toutes circonstances
et ton esprit de compétition sans faille (il vaut mieux t'avoir dans notre équipe !!).*

Merci pour ta bonne humeur permanente et tes magnifiques danses en soirée :)

Thom,

Mon acolyte de canoë, qu'est-ce que j'ai ramé ce jour-là mais qu'est-ce que j'ai ri.

Mon acolyte d'internat, on en aura chié mais on aura réussi ensemble.

Je te remercie pour ton humour et tes histoires à dormir debout.

Tu m'auras bien embêté avec ce bonnet de l'équipe de France ... fais-y honneur !

A moi de t'embêter maintenant, les chichis à l'Estaque je les attends toujours ...

*Et au fait on va clore le débat maintenant, tu ne m'en voudras pas,
mais les pneus neiges, ça suffit pour aller au ski !!!*

Flo,

Je te remercie pour ta flexibilité, ta gentillesse, ton sourire et ta bonne humeur.

Je ne peux oublier cette journée à Nylon.

Hâte que l'on repasse des moments si simples et si agréables ensemble.

A mes amis gapençais,

Quent',

Mon meilleur ami depuis plus de 10 ans.

Malgré la distance et notre manque de communication, tu es à mes côtés à chaque instant.

Chaque moment passé avec toi est un pur bonheur.

Merci d'être la personne que tu es.

Je t'aime très fort.

Virginie

Je suis si heureuse que tu partages la vie de Quentin, je sais qu'avec toi il est bien entouré.

Tu es une très belle personne, pétillante, la main sur le cœur et pleine d'humour.

Je suis heureuse de te connaître et j'ai hâte que l'on parte en voyage ensemble.

Nos week-ends tous les 4 sont indescriptibles mais tellement magique.

Domage que l'on soit si loin.

Romano,

Mon acolyte de fin de soirée :)

Qui l'eût cru que je m'attache autant à un petit geek.

J'ai découvert une personne attachante, pleine d'amour, de tendresse et tellement drôle.

Ne change rien Romano, tu es au top.

Ma petite Ana,

Je te remercie pour ton soutien, ton énergie positive et ta générosité.

Tous ces bons moments partagés ensemble, notre week-end dans le Luberon,

tous ces spectacles et concerts et il en reste tant encore à découvrir.

Chlo,

Merci pour ton sourire et ta joie de vivre permanents.

Merci pour ce super week-end parisien passé avec toi, j'ai hâte que l'on s'en refasse !!

A tout le groupe : Coco, Elo, Camille, Flo, Paul, Adri et Alex,

Merci pour tous ces réveillons endiablés et tous ces bons moments partagés.

A mes amies de longue date,

Elisa,

Je te remercie pour ton soutien et ton écoute depuis tant d'années.

Tu es une amie en or sur qui je pourrais toujours compter.

Je te remercie d'être toujours là pour moi.

Je suis si heureuse de ta présence aujourd'hui.

*Ça y est ces études sont terminées,
on va enfin pouvoir se programmer un week-end toutes les 2 :)*

Clé,

Mon amie d'enfance,

Je suis si heureuse que l'on se retrouve comme avant,

comme si rien n'avait changé, des années après.

Toutes ces discussions m'avaient manquées.

Je nous revois encore toutes les deux au Bosco sur nos planches à voile !!

Ces quelques jours à Marseille avec toi étaient super.

Sache que tu seras toujours la bienvenue :)

Raph,

Pour ton sourire, ta joie de vivre communicative et ta gentillesse.

Merci de continuer à prendre des nouvelles après toutes ses années, c'est grâce à toi qu'on

est toujours amie, je sais que la communication n'est pas mon point fort...

Tellement de bons moments partagés ensemble, à Saint-Léger où tout a commencé, à Embrun,

cette magnifique année de colocs de choc, sur des kilomètres de pistes de ski...

Je n'oublierai jamais les deux boulettes skiant l'une en face de l'autre,

et finissant immanquablement par se rentrer dedans !!!

A mes belles rencontres pendant ses études,

Ben,

*Ces 2 stages avec toi n'ont été que du bonheur.
Je n'ai jamais autant ri au travail qu'à tes côtés.
Je te remercie pour ta bonne humeur permanente mais aussi pour ton soutien.
Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu as fait pour moi,
pour que je puisse encore un peu profiter de mon papy.*

Bruno,

*Merci pour ton humour et ton grain de folie.
Et continues tes vidéos tu nous régales !*

Tress,

*Meilleure partenaire de squash & acolyte des ronéos.
Merci pour ta franchise, pour toutes nos discussions et pour ton écoute.
Merci pour tous ces fous-rires qui ont permis de rendre un peu plus fun ces cours de master.
Je suis heureuse d'avoir partagé ce semestre avec toi.*

Sandrine,

*Une très belle rencontre à mes yeux.
Merci pour ton soutien, ton écoute et tes encouragements pendant ce master.
Je te remercie pour ta gentillesse, ton sourire et ta positivité.
Tu es un petit rayon de soleil et je suis très heureuse de te connaître.*

Floflo, ma petite Corse,

*Ce semestre si épique !! Heureusement que je l'ai passé à tes côtés :)
Finalement je n'en garde que des bons souvenirs avec toi, avec toutes nos discussions et nos
revendications. Qu'est-ce que j'adore ton accent corse qui ressort quand tu t'énerves :)
Je suis vraiment heureuse de t'avoir rencontrée.*

Marc,

*Nos pauses café et apéros me manquent, on a formé une belle équipe tous les trois avec Ben.
Je suis heureuse que tu reviennes sur Marseille, on va pouvoir se voir un peu plus souvent !*

----oOo----

« 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. »

Table des matières

Table des matières	1
Liste des figures	6
Liste des tableaux	9
Liste des annexes	9
Abréviations	10
Introduction	13
Leucémies aiguës myéloïdes et cellules Natural Killer	15
I. Les leucémies aiguës myéloïdes	16
1. Généralités	16
a. Définition	16
b. Epidémiologie.....	16
c. Etiologie.....	17
d. Facteurs de risque	18
2. Diagnostic	20
a. Présentation clinique.....	20
✓ Circonstances de découverte.....	20
✓ Signes cliniques	20
✓ Complications aiguës.....	20
b. Diagnostic biologique	21
✓ Sanguin : hémogramme	21
✓ Médullaire.....	22
➤ Analyse cytologique : le myélogramme	22
❖ LAM avec particularités morphologiques.....	24
➤ Analyse phénotypique	27
➤ Analyse cytogénétique et moléculaire	28
c. Examens nécessaires au diagnostic.....	30

3. Pronostic.....	32
a. Facteurs pronostiques liés à la maladie	32
✓ Génétiques	32
➤ Cytogénétique	32
➤ Biologie moléculaire.....	35
✓ Caractère secondaire de la LAM	37
✓ Traitement.....	38
✓ Réponse au traitement et maladie résiduelle	40
✓ Autres.....	42
b. Facteurs pronostiques liés au patient	43
✓ Age.....	43
✓ Comorbidités.....	44
✓ Etat général	45
4. Prise en charge des patients atteints de LAM.....	46
a. Traitement symptomatique	46
b. Traitement étiologique.....	47
✓ Cas particulier des LAM promyélocyaires	48
✓ Sujets éligibles à un traitement intensif.....	50
➤ Traitement d'induction	50
➤ Traitement de consolidation	51
❖ Algorithme décisionnel	51
❖ Chimiothérapie	52
❖ Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques	53
✓ Réponse au traitement.....	55
5. Suivi des patients	58
a. Maladie résiduelle	59

II. Les cellules Natural Killer (NK)	60
1. Généralités	60
2. Définition.....	61
3. Phénotype	61
4. Maturation des cellules NK	62
5. Fonctions des cellules NK	63
a. Education et activation.....	63
b. Régulation : balance des signaux activateurs et inhibiteurs	64
c. Fonctions effectrices et immuno-régulatrices	66
✓ Cytotoxicité.....	66
✓ Rôle immunorégulateur	67
6. Récepteurs NK.....	69
a. Les récepteurs inhibiteurs	69
b. Les récepteurs activateurs.....	70
✓ Récepteur NKp46	71
7. Cellules NK dans les LAM.....	72
a. Contrôle des cellules leucémiques par les cellules NK	72
b. Altérations des cellules NK dans les LAM	73
Objectif de l'étude	78

PARTIE I : Caractérisation phénotypique des cellules NK par cytométrie de masse selon l'expression de NKp46 chez les patients atteints de LAM.....80

I. Matériels et Méthodes	81
1. Echantillons.....	81
2. Cytométrie de masse	83
a. Principe.....	83
b. Pré-traitement des échantillons.....	84
c. Marquage	84
d. Acquisition	85
e. Traitement et analyse des données	85

II.	Résultats	89
1.	Caractéristiques des patients.....	89
2.	Comparaison des deux groupes de patients : LAM NKp46 ^{high} et LAM NKp46 ^{low} 91	
a.	Fréquence des populations lymphocytaires	91
b.	Profil de maturation des cellules NK	92
c.	Caractérisation phénotypique du groupe LAM NKp46 ^{low}	94
3.	Analyse des sous-populations cellulaires NKp46 ⁺ et NKp46 ⁻	96
a.	Fréquence des sous-populations cellulaires NKp46 ⁺ et NKp46 ⁻	96
b.	Caractérisation phénotypique des sous-populations cellulaires NKp46 ⁺ et NKp46 ⁻ . 96	
✓	Analyse CITRUS®	96
✓	Analyse manuelle.....	98
III.	Discussion	100
IV.	Conclusion et perspectives	104

PARTIE II : Recueil et analyse des données obtenues depuis la mise en place de la caractérisation phénotypique des cellules NK dans les LAM au laboratoire de biopathologie de l'Institut Paoli-Calmettes..... 105

I.	Matériels et méthodes	106
1.	Etude monocentrique prospective	106
a.	Historique de l'étude	106
b.	Design de l'étude.....	106
2.	Patients	107
a.	Population étudiée	107
b.	Echantillons	107
3.	Cytométrie en flux.....	108
a.	Principe.....	108
b.	Pré-traitement et marquage des échantillons	109
c.	Acquisition	110
d.	Traitement et analyses des données.....	112
4.	Analyse statistique.....	114

II. Résultats	115
1. Analyse de la cohorte clinique globale.....	115
a. Caractéristiques des patients	115
✓ Patients ayant reçu un traitement d'induction intensif	117
b. Courbes de survie	118
✓ Selon le traitement d'induction.....	118
✓ Chez les patients ayant reçu un traitement d'induction intensif.....	119
2. Analyse de sous-groupe des patients induits, âgés de moins de 65 ans et ayant obtenus une rémission complète	120
a. Caractéristiques des patients	121
b. Comparaison des 2 groupes de patients NKp46 ^{high} et NKp46 ^{low}	124
✓ Fréquence des populations lymphocytaires NK	124
✓ Profil de maturation des cellules NK.....	124
✓ Courbes de survie	125
III. Discussion	127
IV. Conclusion	132
Conclusion	133
Bibliographie.....	135
Annexes.....	144
Résumé.....	152

Liste des figures

Figure 1 : Taux d'incidence des LAM en France selon la classe d'âge et le sexe.	17
Figure 2 : Répartition des principales causes de LAM secondaires.....	18
Figure 3 : Classification morphologique FAB des LAM. ¹⁹	23
Figure 4 : Principales particularités morphologiques et cytogénétiques des LAM.....	26
Figure 5 : Autres LAM ayant des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques.	27
Figure 6 : Complexité mutationnelle des LAM.	30
Figure 7 : Survie globale à 5 ans par type de cancers aux États-Unis, 2000-2016.	32
Figure 8 : Impact pronostic des anomalies cytogénétiques décrites dans la classification OMS 2008. D'après <i>Grimwade et al., Blood, 2010.</i> ³⁵	33
Figure 9 : Impact d'un caryotype complexe sur la survie des patients.	34
Figure 10 : La cytogénétique est un facteur pronostic majeur chez les patients traités par allogreffe de CSH. D'après <i>Yanada et al., Leukemia & Lymphoma, 2018.</i> ³⁸	35
Figure 11 : Impact du statut mutationnel sur la survie globale des patients atteints de LAM à risque intermédiaire. D'après <i>Patel et al., NEJM, 2012.</i> ³³	35
Figure 12 : Survie globale des patients atteints de LAM selon le caractère primaire ou secondaire de la LAM. D'après <i>Granfeldt Østgård, Journal of Clinical Oncology, 2015.</i> ⁵	38
Figure 13 : Amélioration de la survie globale des patients atteints de LAM au fil des décennies. D'après <i>Shallis et al., Blood, 2019.</i> ⁸	39
Figure 14 : L'allogreffe de CSH améliore le pronostic des patients atteints de LAM âgés de 50 à 70 ans. D'après <i>Kurosawa et al., BBMT, 2011.</i> ⁵²	39
Figure 15 : L'ATRA a révolutionné le pronostic des patients atteints de LAM3.	40
Figure 16 : La survie des patients en rémission complète dépend de leur récupération hématologique. D'après <i>Cheng et al., Blood, 2018.</i> ⁵⁷	41
Figure 17 : Impact pronostic de la maladie résiduelle.	42
Figure 18 : Survie globale des LAM <i>de novo</i> selon la classe d'âge.....	43
Figure 19 : Probabilité de survie selon le score HCT-CI (A) et le modèle composite LAM (B).	45
Figure 20 : L'indice de performance status de l'OMS influence la survie globale des patients atteints de LAM. D'après <i>Østgård et al., Leukemia, 2015.</i> ⁸⁰	45
Figure 21 : Prise en charge des LAM.....	48

Figure 22 : La midostaurine améliore la survie globale des patients présentant une LAM FLT3 muté. D'après <i>Stone et al., NEJM, 2017</i> . ⁸⁶	51
Figure 23 : Fenêtrage manuel des cellules NK circulantes par cytométrie en flux.....	61
Figure 24 : Maturation des cellules NK.	62
Figure 25 : Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.....	65
Figure 26 : Cytotoxicité médiée par les cellules NK.....	67
Figure 27 : Régulation de la réponse immune par les cellules NK.	68
Figure 28 : Exemple de récepteurs retrouvés à la surface des cellules NK.....	69
Figure 29 : Représentation de NKp46 et de ses molécules adaptatrices.....	71
Figure 30 : L'alloréactivité des cellules NK dans l'allogreffe de CSH.....	73
Figure 31 : Le phénotype NCR ^{dull} est associé à un pronostic sombre.	74
Figure 32 : Intégration du biomarqueur NKp30 à la stratification pronostique proposée par l'ELN en 2017. D'après <i>Chretien et al., Oncotarget, 2017</i>	75
Figure 33 : Valeur pronostique du biomarqueur NKp46 dans les LAM.....	76
Figure 34 : Estimation de Kaplan-Meier de la survie sans rechute chez les patients présentant une expression de NKp46 forte (A) ou faible (B) au diagnostic.....	77
Figure 35 : Flow chart.	82
Figure 36 : Principe de la cytométrie de masse.....	83
Figure 37 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de masse.	86
Figure 38 : Comparaison de l'intensité d'expression de NKp46 chez les volontaires sains et les patients atteints de LAM.....	87
Figure 39 : Fréquence des populations lymphocytaires T, B et NK chez les VS, les patients du groupe LAM NKp46 ^{high} et LAM NKp46 ^{low}	91
Figure 40 : Le profil de maturation des cellules NK est altéré chez les patients LAM NKp46 ^{low}	93
Figure 41 : Les cellules NK des patients LAM NKp46 ^{low} ont un phénotype hypoactivé.....	95
Figure 42 : La perte de NKp46 est fortement associée à la perte de CD16.	97
Figure 43 : La population cellulaire NK NKp46 ⁻ exprime un phénotype majoritairement hypoactivé.	99
Figure 44 : Anticorps trispécifique ciblant les récepteurs activateurs NKp46 et CD16 sur les cellules NK et un antigène tumoral sur les cellules cancéreuses.	103
Figure 45 : Principaux systèmes composant un cytomètre en flux.....	109
Figure 46 : Spectres d'émission des fluorochromes utilisés dans le panel de caractérisation phénotypique des cellules NK dans la LAM.....	111

Figure 47 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie en flux.	113
Figure 48 : Répartition des patients selon de leur réponse au traitement et leur niveau d'expression de NKp46.	117
Figure 49 : Survie globale des patients en fonction de leur traitement d'induction.	118
Figure 50 : Survie globale des patients induits en fonction de leur statut NKp46.	119
Figure 51 : Survie sans rechute (A) et incidence cumulative de rechute (B) des patients induits en fonction de leur statut NKp46.	119
Figure 52 : Flow chart de l'analyse de sous-groupe.....	120
Figure 53 : Comparaison de l'intensité d'expression de NKp46 entre les deux groupes de patients NKp46 ^{high} et NKp46 ^{low} et les volontaires sains.	122
Figure 54 : La population cellulaire NK NKp46 ⁺ est sous-représentée chez les patients du groupe NKp46 ^{low}	124
Figure 55 : Profils de maturation des cellules NK selon l'expression de NKp46.....	125
Figure 56 : Survie globale (A) et sans rechute (B) des patients selon leur statut NKp46.....	125
Figure 57 : Incidence cumulative de rechute des patients induits selon l'expression de NKp46.	126
Figure 58 : Survie sans rechute chez les patients NKp46 ^{high} (A) et NKp46 ^{low} (B).	126

Liste des tableaux

Tableau 1 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans les LAM secondaires à un traitement. D'après <i>McNerney et al., Nature Reviews Cancer, 2017.</i> ⁹	19
Tableau 2 : Classification OMS des LAM. D'après <i>Arber et al., Blood, 2016.</i> ²³	24
Tableau 3 : Anomalies cytogénétiques suffisantes pour poser le diagnostic de LAM-MRC. .	29
Tableau 4 : Analyses préconisées par l'ELN au diagnostic d'une LAM.	31
Tableau 5 : Stratification pronostique ELN des LAM.	37
Tableau 6 : Facteurs influençant la réponse à l'allogreffe de CSH.....	56
Tableau 7 : Caractéristiques des patients.	90
Tableau 8 : Caractéristiques de la cohorte globale.....	116
Tableau 9 : Caractéristiques des patients de l'analyse de sous-groupe.....	123

Liste des annexes

Annexe 1 : Panel n°1 d'anticorps utilisés en cytométrie de masse	145
Annexe 2 : Panel n°2 d'anticorps utilisés en cytométrie de masse	146
Annexe 3 : Etude des sous-populations cellulaires NKp46 ⁺ et NKp46 ⁻ à l'aide de l'algorithme CITRUS.....	147
Annexe 4 : Classification non supervisée des patients LAM selon le profil de maturation des cellules NK.....	148
Annexe 5 : Survie sans rechute des patients NKp46 ^{high} et NKp46 ^{low}	149
Annexe 6 : Survie globale (A) et sans rechute (B) des patients induits âgés de plus de 65 ans en fonction de leur statut NKp46 au diagnostic	150

Abréviations

A

ADCC : cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps, *antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity*

ATRA : acide tout-trans-rétinoïque

B

BFU : *Burst forming Unit*

BIG-1 : *Backbone Inter-Group-1*

Bright : forte intensité d'expression

C

CBF : *Core Binding Factor*

CD : Cluster de Différentiation

CEBP α : *CCAAT/enhancer-binding protein alpha*

CFU : *Colony Forming Unit*

CITRUS $\text{\textcircled{R}}$: *Cluster Identification, characterization, and regression*

CMF : cytométrie en flux

CMH : Complexe Majeur

d'Histocompatibilité (ou HLA)

CRCM : Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSM : *Maxpar Cell Staining buffer*

CyTOF : cytométrie de masse, *Cytometry by Time-Of-Flight*

D

2D : deux dimensions

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DNAM-1 : *DNAX Accessory Molecule-1*

E

EDTA : Éthylènediaminetétraacétique

ELN : *European Leukemia Network*

F

F : féminin

FAB : Franco-Américano-Britannique

Fc : fragment constant

FISH : *fluorescent in situ hybridization*

FLT3-ITD : *FMS-like tyrosine kinase 3 internal tandem duplication*

FLT3-ITD^{high} : ratio *FLT3-ITD* $\geq 0,5$

FLT3-ITD^{low} : ratio *FLT3-ITD* $< 0,5$

FLT3^{WT} : absence de mutation FLT3-ITD

FSC : taille relative de la cellule, *forward scatter*

G

GB : globules blancs

G-CSF : *Granulocyte Colony-Stimulating Factor*

GEMM : Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes et Mégacaryocytes

G/L : unité en Giga par litre

GVL : greffon *versus* leucémie, *graft versus leukemia*

H

HAS : Haute Autorité de Santé

HCT-CI : *Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index*

HLA : complexe majeur d'histocompatibilité, *Human Leukocyte Antigen*

HLA-DR : *human leukocyte antigen, D-related*

I

IFN γ : Interféron gamma

Ig : Immunoglobulines

ILC : Cellules Innées Lymphoïdes

IPC : Institut Paoli-Calmettes

ITAM : Motif d'Activation des récepteurs Immuns basé sur la Tyrosine

ITIM : Motif d'Inhibition des récepteurs

Immuns basé sur la Tyrosine

IV : intraveineuse

K

KAT6A : *lysine acetyltransferase 6A*

KIR : *Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*

L

LA : leucémie aiguë

LAIP : *leukemia associated aberrant immunophenotype*, profil phénotypique associé aux leucémies

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LAM4Eo : LAM4 à différenciation éosinophile

LAM-MRC : LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies (*AML with myelodysplasia-related changes*)

LAM NKp46^{high} : patients ayant une forte intensité d'expression de NKp46

LAM NKp46^{low} : patients ayant une faible intensité d'expression de NKp46

Ly : lymphocytes

M

M : masculin

MFI : intensité moyenne de fluorescence

MDR1 : *Multidrug Resistance gene-1*

MRD : maladie résiduelle

MYH11 : *Myosin Heavy Chain 11*

N

n = nombre

NCR : *Natural Cytotoxicity Receptors*

NCR^{bright} : MFI de NKp30 et NKp46 forte

NCR^{dull} : MFI de NKp30 et NKp46 faible

NK : Natural Killer

NKCE : *NK cell engagers*

NKp46⁺ : cellules NK exprimant le marqueur NKp46 à leur surface

NKp46⁻ : cellules NK n'exprimant pas le marqueur NKp46 à leur surface

NKp46^{high} : forte intensité d'expression de NKp46 à la surface des cellules NK

NKp46^{low} : faible intensité d'expression de NKp46 à la surface des cellules NK

NPM1 : nucléophosmine

NS : non significatif

P

p : P-value

PBMC : cellules mononuclées du sang périphérique

PCR : *polymerase chain reaction*

PML : *promyelocytic leukemia*

PNN : polynucléaires neutrophiles

PS : Performance status

R

RAR α : *retinoic acid receptor alpha*

RC : rémission complète

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute medium*

RT-qPCR : *Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*

RUNX1 : *Runt-related transcription factor1*

RUNX1T1 : *RUNX1 translocation partner1*

S

SD : écart type moyen

SSC : granularité relative, *side scatter*

SVF : Sérum de Veau Fœtal

SWOG : *Southwest Oncology Group*

T

TNF : facteur de nécrose tumorale, *tumor necrosis factor*

t-LAM : LAM secondaire à un traitement ; *therapy-related LAM*

t-SNE : *t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding*

V

VS : Volontaires Sains

Introduction

Parmi les hémopathies malignes, les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un ensemble hétérogène de pathologies tumorales agressives. Elles se caractérisent par une prolifération maligne de cellules immatures myéloïdes, appelées blastes, qui ont perdu leur capacité à se différencier. Ainsi, l'envahissement blastique de la moelle osseuse altère l'hématopoïèse normale, conduisant à des cytopénies périphériques responsables de complications hémorragiques et infectieuses. Bien que la chimiothérapie d'induction permette d'obtenir une rémission complète chez la majorité des patients, plus de la moitié d'entre eux vont par la suite rechuter. L'échappement des cellules blastiques aux cellules de l'immunité anti-tumorale est une des principales causes de cette résistance secondaire au traitement. En effet, l'immunité anti-tumorale joue un rôle majeur dans le contrôle et le maintien des rémissions complètes, comme en témoigne l'importance de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) dans les LAM.

Ces dernières années, l'immunothérapie a révolutionné la prise en charge en oncologie. Malgré ces avancées thérapeutiques majeures, le traitement des LAM a peu évolué au cours des dernières décennies. Les LAM représentent toujours un véritable enjeu de santé public, classées comme le 5^e cancer le plus agressif en termes de survie globale à 5 ans. Une meilleure connaissance des anomalies phénotypiques des effecteurs de l'immunité anti-leucémique est donc nécessaire afin d'adapter les thérapeutiques aux profils phénotypiques des patients ou de développer de nouvelles stratégies d'immunothérapies.

Parmi ces effecteurs, les cellules Natural Killer (NK) sont des cellules immunes intéressantes par leurs capacités effectrices et leur profil de tolérance. Elles participent activement à la défense anti-tumorale de l'organisme, de manière directe par leurs fonctions effectrices cytotoxiques, et de manière indirecte, par leurs fonctions sécrétrices permettant d'amplifier la réponse immunitaire globale en recrutant et activant d'autres cellules immunes effectrices. Cependant, des altérations phénotypiques et fonctionnelles des cellules NK ont été décrites dans les LAM. Ainsi, des travaux de l'équipe du Pr Olive ont mis en évidence une diminution d'expression du récepteur activateur NKp46 à la surface des cellules NK, dans plus de 80% des cas au diagnostic de LAM. De plus, ils ont montré que l'allogreffe de CSH apportait un réel avantage en termes de survie sans progression uniquement chez les patients présentant une forte expression de NKp46. Il s'agit donc du premier biomarqueur prédictif de réponse à l'allogreffe accessible dès le diagnostic de LAM.

Dans ce contexte, cette étude permet d'une part de caractériser les patients ayant une altération de NKp46 au diagnostic de LAM afin de décrire précisément les altérations phénotypiques des cellules NK associées à la perte d'expression de NKp46 ; et d'autre part, de confirmer sur une nouvelle cohorte prospective, sa valeur prédictive de réponse à l'allogreffe, afin d'utiliser ce biomarqueur en pratique clinique.

Leucémies aiguës myéloïdes et cellules Natural Killer

I. Les leucémies aiguës myéloïdes

1. Généralités

a. Définition

Les leucémies aiguës myéloïdes constituent un ensemble hétérogène de pathologies tumorales agressives. Classées parmi les hémopathies malignes aiguës, elles sont caractérisées par la prolifération monoclonale de progéniteurs ou précurseurs myéloïdes dont la différenciation est bloquée à un stade précoce de leur maturation. Ainsi, les LAM sont définies par une accumulation de ces cellules myéloïdes immatures, appelées « blastes », dépassant les 20% dans le sang et/ou la moelle osseuse.

L'envahissement blastique médullaire altère l'hématopoïèse normale, conduisant à des cytopénies périphériques (anémie, thrombopénie et neutropénie), responsables de complications hémorragiques et/ou infectieuses. Sans prise en charge thérapeutique, l'évolution des LAM est toujours fatale en quelques semaines à quelques mois, le plus souvent par syndrome de lyse tumorale ou coagulation intravasculaire disséminée (CIVD).

b. Epidémiologie

Selon le rapport 2015 de l'Institut National contre le cancer, les hémopathies malignes représentent environ 10% de l'ensemble des nouveaux cas de cancers, soit 35 000 nouveaux cas estimés en France métropolitaine en 2012.¹ En 2018, le nombre de nouveaux cas estimés de LAM est de 3 428² en France et 19 520 aux Etats-Unis.³

Selon la dernière étude réalisée à partir des registres des cancers du réseau Francim, le taux d'incidence standardisé monde est de 3,1 chez l'homme et de 2,3 chez la femme pour 100 000 personnes-années.²

L'incidence des LAM augmente avec l'âge mais de façon non linéaire. En effet, le taux d'incidence est très faible chez les adultes de moins de 50 ans alors qu'il augmente fortement chez les adultes âgés de plus de 65 ans (Figure 1).² Les LAM sont donc des pathologies du sujet âgé puisqu'en France, l'âge médian au diagnostic est de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme.²

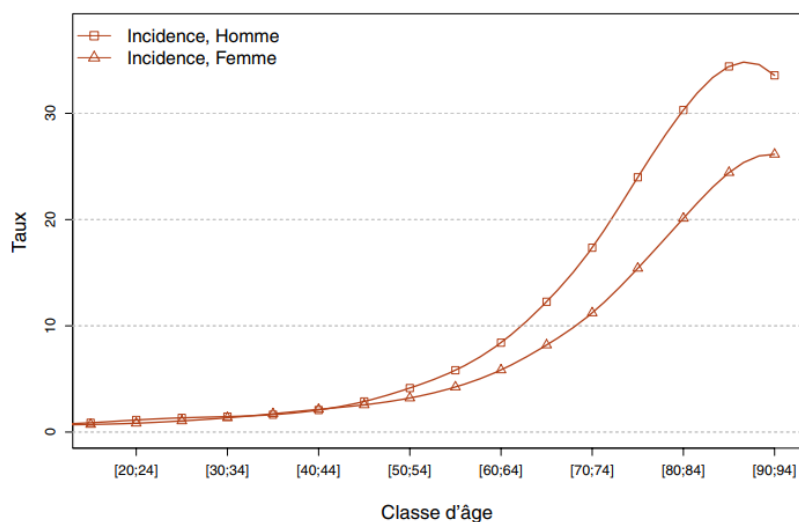


Figure 1 : Taux d'incidence des LAM en France selon la classe d'âge et le sexe.

D'après Sandra Le Guyader-Peyrou et al., 2019.²

c. Etiologie

La majorité des LAM sont dites « *de novo* », c'est-à-dire qu'elles surviennent chez des sujets n'ayant aucun antécédent ni facteur de risque sous-jacent. Par opposition aux LAM « *de novo* », les LAM secondaires résultent de dommages à l'ADN induits par une exposition antérieure à des traitements toxiques ou à des désordres hématologiques. Les LAM secondaires regroupent les LAM secondaires à l'administration d'un traitement par chimiothérapie cytotoxique ou radiothérapie, appelées t-LAM (*therapy-related*), et les LAM secondaires à une hémopathie myéloïde, comme les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les syndromes myéloprolifératifs (SMP).

Les LAM secondaires représenteraient environ 10 à 30% des cas de LAM⁴ ; ce chiffre étant difficile à estimer devant certains SMD non préalablement diagnostiqués. En 2015, une étude recensant les LAM de la population danoise, a identifié 19,8% de LAM secondaires à un antécédent hématologique et 6,6% secondaire à un traitement.⁵ Leur étude a permis d'identifier les expositions préalables. Parmi les LAM secondaires à une hémopathie, plus de la moitié des patients étaient atteints de SMD, suivi à part égale de la leucémie myéomonocytaire chronique (appartenant aux SMD/SMP), de la polyglobulie de Vaquez et de la myélofibrose (appartenant aux SMP) (Figure 2A).

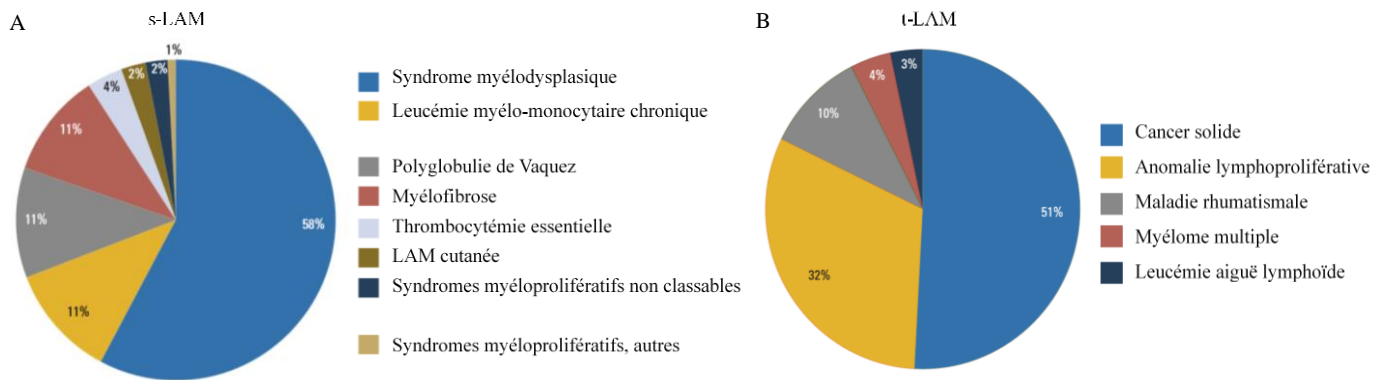


Figure 2 : Répartition des principales causes de LAM secondaires (A) à une hémopathie maligne et (B) à un traitement.

D'après Granfeldt Østgård, L. S. *et al.*, *Journal of Clinical Oncology*, 2015.⁵

d. Facteurs de risque

Certains facteurs de risque ont été décrits dans les LAM, comme des expositions environnementales ou des prédispositions génétiques. Parmi ces dernières, la trisomie 21 (ou syndrome de Down) est une prédisposition génétique majeure puisque les enfants atteints ont un risque relatif 500 fois plus élevé de développer une LAM mégacaryoblastique par rapport à la population générale.⁶

Concernant les facteurs de risque environnementaux, l'exposition antérieure à une chimiothérapie cytotoxique, au benzène ou aux rayonnements ionisants augmentent la probabilité de développer une LAM.⁷

Les LAM secondaires à un traitement par chimiothérapie cytotoxique ou radiothérapie, nommées t-LAM, représentent 7 à 15% des cas de LAM.⁸ Dans plus de 50% des cas, la radiochimiothérapie a été administrée pour traiter un cancer solide (Figure 2B).⁵ Les deux principales classes de chimiothérapies impliquées dans les t-LAM sont les agents alkylants (cyclophosphamide, busulfan, melphalan...) et les inhibiteurs de la topoisomérase (doxorubicine, daunorubicine, étoposide...).

Après une période de latence de 5 à 7 ans, l'exposition aux agents alkylants peut entraîner le développement d'un syndrome myélodysplasique (SMD) qui s'acutise fréquemment en LAM. Les principales anomalies cytogénétiques et moléculaires retrouvées sont des altérations des chromosomes 5 et 7 (délétion 5q et 7q, monosomie 7), un caryotype

complexe et une mutation TP53 ; de pronostic défavorable.^{9,10} Les inhibiteurs des topoisomérases sont eux directement responsables de LAM après une période de latence plus courte, d'environ 1 à 3 ans. Les principales anomalies génétiques retrouvées impliquent des réarrangements équilibrés de MLL (11q23), RUNX1 (21q22) et PML-RAR α (Tableau 1).⁹

D'autres molécules anticancéreuses peuvent augmenter le risque de t-LAM, comme par exemple le cisplatine et la fludarabine.⁹

Tableau 1 : Principales anomalies cytogénétiques retrouvées dans les LAM secondaires à un traitement. D'après *McNerney et al., Nature Reviews Cancer, 2017.*⁹

Cytogenetic abnormality	t-MN frequency (%)	De novo AML frequency (%)	Risk stratification
del(5q)*	42	5-16	Unfavorable
-7/del(7q)*	49	4-14	Unfavorable
Complex karyotype*	48	5-17	Unfavorable
del(17p)/t(17p)/-17*‡	20	4	Unfavorable
+8	3	10-13	Unfavorable
Normal karyotype	8	41-48	Intermediate
t(11q23.3)	3	3-4	Intermediate
inv(16), t(16;16)	2	1-7	Favorable
t(15;17)	2	3-13	Favorable
t(21q22.1)	3	2-7	Favorable

High Low

* Les anomalies del (5q), -7 / del (7q) et un caryotype complexe peuvent co-exister chez le même patient. Ces fréquences se chevauchent partiellement.

‡ Les délétions 17p sont souvent cryptiques et donc sous-estimées par l'analyse cytogénétique.

Comparaison des fréquences des anomalies cytogénétiques retrouvées dans les néoplasmes myéloïdes secondaires au traitement (t-MN) et les LAM « *de novo* » (de novo AML). L'intensité des couleurs de la carte thermique reflète la fréquence et varie de la fréquence basse (blanche) à haute (rouge vif).

L'exposition au benzène est souvent associée à des t-LAM présentant des anomalies cytogénétiques des chromosomes 5 et 7.¹¹ L'incidence des LAM est augmentée de 1,2 à 2,3 fois par le tabagisme, source la plus courante d'exposition au benzène.¹² Ces LAM induites par le tabagisme s'accompagnent également d'anomalies du chromosome 8, notamment de la translocation t(8 ;21).¹³

Concernant les rayonnements ionisants, l'incidence des LAM est augmentée de 5,1 fois chez les pilotes hommes ayant dépassé les 5 000 heures de vol.¹⁴ De plus, en 1995, Cardis et al. ont montré que la mortalité par leucémie était significativement associée à la dose de rayonnement externe cumulée.¹⁵

2. Diagnostic

a. Présentation clinique

✓ Circonstances de découverte

La présentation clinique des LAM est très disparate. En effet, certains patients sont asymptomatiques tandis que d'autres nécessitent un transfert en urgence en réanimation devant la présence de complications aiguës. Chez les patients asymptomatiques, la découverte se fait au décours d'un bilan biologique de contrôle, devant une ou plusieurs cytopénies et la présence de cellules anormales circulantes.

✓ Signes cliniques

La symptomatologie n'est pas spécifique des LAM. Les signes cliniques sont la conséquence de l'envahissement médullaire par des cellules anormales conduisant fréquemment à une altération de l'état général. L'insuffisance médullaire, due à une hématopoïèse normale altérée, conduit à des cytopénies sanguines périphériques responsable d'un syndrome anémique (asthénie, dyspnée, tachycardie, pâleur, acouphènes et vertiges), d'un syndrome hémorragique (purpura, épistaxis, gingivorragies, hématomes...) et/ou d'un syndrome infectieux (fièvre, pneumopathie, sepsis sévère...). Le syndrome tumoral est inconstant, plus fréquemment retrouvé dans les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL). Une splénomégalie est retrouvée dans environ 15% des LAM mais la présence d'adénopathies est rare. Certains signes cliniques sont plus fréquemment retrouvés dans les LAM à composante monocytaire comme les nodules dermiques (leucémides), l'hypertrophie gingivale ou l'atteinte neuro-méningée (nausées, vomissements, diplopie, méningite...). Enfin, dans de très rares cas, il existe des localisations exclusivement extra-médullaires comme le sarcome myéloïde.

✓ Complications aiguës

Certaines présentations cliniques comme la CIVD, la leucostase, le sepsis sévère ou le syndrome de lyse tumorale sont des urgences vitales qui nécessitent un transfert d'urgence vers des centres spécialisés. Les LAM hyperleucocytaires (généralement lorsque les leucocytes dépassent 50 G/L) sont à risque élevé de leucostase, responsable d'un syndrome de détresse respiratoire aiguë ou d'une encéphalopathie. La leucostase correspond à une accumulation anormale de globules blancs dans les vaisseaux capillaires sanguins.

Tout comme les LAM hyperleucocytaires, les LAM promyélocytaires peuvent se compliquer, dès le diagnostic, d'un syndrome de lyse tumorale ou d'une CIVD. Le diagnostic de ces deux syndromes correspond à un ensemble de critères clinico-biologiques.

La CIVD peut se manifester par des complications thrombotiques ou hémorragiques pouvant être responsable d'un syndrome hémorragique majeur et d'une défaillance multi-viscérale conduisant au décès précoce des patients.¹⁶

Le syndrome de lyse tumorale est la conséquence de la lyse massive et brutale des cellules leucémiques qui libèrent leurs composants toxiques en quantité importante dépassant les capacités d'excrétion rénale. Que sa survenue soit spontanée ou secondairement à l'introduction du traitement anti-leucémique, il est peut être responsable de complications cardiaques (arythmie), rénales (insuffisance rénale aiguë) ou neurologique (convulsions).¹⁷

b. Diagnostic biologique

Le diagnostic des LAM repose sur l'analyse cytologique du myélogramme, l'analyse phénotypique des cellules leucémiques afin de confirmer le caractère immature et myéloïde de la prolifération et sur l'analyse cytogénétique et moléculaire. Il est établi devant un excès de blastes myéloïdes supérieur ou égal à 20% dans le sang ou la moelle osseuse.

Indépendamment de ce compte cellulaire, le diagnostic de LAM peut être retenu devant la présence des anomalies cytogénétiques suivantes : translocation t(15;17), translocation t(8;21), translocation t(16;16) ou inversion du chromosome 16.¹⁸

✓ Sanguin : hémogramme

L'hémogramme est une analyse biologique systématiquement réalisée en cas de suspicion de leucémie aiguë (LA), permettant de poser le diagnostic devant une blastose circulante supérieure ou égale à 20%. La présence de blastes comportant des corps d'Auer permet quant à elle de confirmer l'origine myéloïde de la leucémie. En revanche, l'absence de blastes sanguins circulants ne permet pas d'exclure le diagnostic de LA.

La numération sanguine permet de rechercher les cytopénies périphériques : anémie (hémoglobine < 13 g/dL chez l'homme ou < 12 g/dL chez la femme), thrombopénie (plaquettes < 150 G/L) et neutropénie (polynucléaires neutrophiles, PNN < 1,5 G/L). Certaines LAM se présentent sous forme leucopénique (globules blancs : GB < 1 G/L), tandis que d'autres sont hyperleucocytaires (GB > 30 G/L).

✓ Médullaire

➤ Analyse cytologique : le myélogramme

Le myélogramme est l'analyse cytologique de la moelle osseuse après étalement sur lame et coloration au May-Grünwald-Giemsa. Il est souvent indispensable pour confirmer le diagnostic de LAM. Les recommandations préconisent un compte minimum de 500 cellules nucléées médullaires. Il existe différents types de blastes myéloïdes : les myéloblastes, les monoblastes, les proérythroblastes et les mégacaryoblastes. Parmi les LAM à composante monocytaire, les monoblastes ainsi que les promonocytes sont comptés en tant que blastes.

L'analyse du myélogramme comprend l'évaluation de la richesse médullaire (le plus souvent augmentée) et du nombre de mégacaryocytes (le plus souvent diminué). L'analyse morphologique des blastes permet d'orienter le diagnostic et la recherche d'antigènes cellulaires par immunophénotypage. Elle comprend notamment l'étude de la taille et l'aspect du noyau et de la chromatine des blastes ainsi que la recherche de granulations cytoplasmiques et de corps d'Auer. L'analyse morphologique porte aussi sur les cellules restantes issues de l'hématopoïèse normale afin de rechercher des signes de dysmyélopoïèse associés.

En 1976, le groupe coopératif franco-américano-britannique (FAB) propose la première classification cyto-morphologique des LAM les séparant en 8 groupes (Figure 3)¹⁹ :

- LAM0 : myéloblastique avec différenciation minimale
- LAM1 : myéloblastique sans maturation
- LAM2 : myéloblastique avec maturation
- LAM3 : promyélocytaire
- LAM4 : myélo-monocytaire
- LAM5 : monocytaire
 - LAM5a : monoblastique
 - LAM5b : avec différenciation monocytaire
- LAM6 : érythrocytaire
- LAM7 : mégacaryocytaire

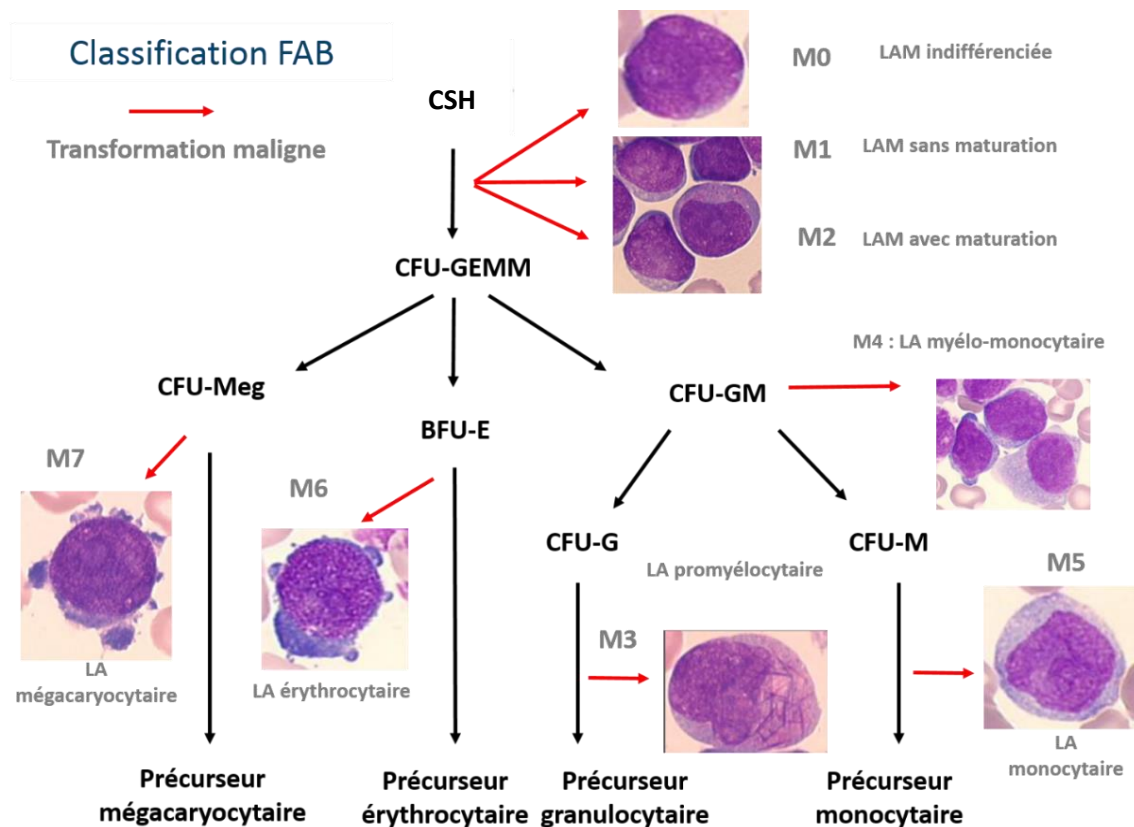


Figure 3 : Classification morphologique FAB des LAM.¹⁹

Abréviations : BFU : Burst forming Unit ; CFU : Colony Forming Unit ; CSH : cellules souches hématopoïétiques GEMM : Granulocytes, Erythrocytes, Monocytes et Mégacaryocytes.

Cette classification est basée sur l'appartenance à une lignée myéloïde et le stade de différenciation des cellules. Avec l'évolution des connaissances, cette classification a été révisée en 1985²⁰ puis d'autres classifications ont été développées afin d'intégrer de nouveaux facteurs pronostiques majeurs : les anomalies cytogénétiques et le statut mutationnel de plusieurs gènes. Ainsi, la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) a été établie en 2002²¹ puis révisée 2008²² et 2016²³ ; et la classification de l'European Leukemia Network (ELN) a été fondée en 2010²⁴ puis révisée en 2017¹⁸.

Actuellement, l'édition 2016 de l'OMS constitue la référence en termes de classification diagnostique des LAM (Tableau 2)²³ et l'édition 2017 de l'ELN constitue la référence en termes de stratification pronostique des patients atteints de LAM.¹⁸

Tableau 2 : Classification OMS des LAM. D'après Arber et al., Blood, 2016.²³

LAM avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; <i>RUNX1 - RUNX1T1</i> LA promyélocytaire avec <i>PML - RARα</i> LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1q22) ; <i>CBFB - MYH11</i> LAM avec t(9;11) (p22;q23) ; <i>MLLT3 - KMT2A (MLL)</i> LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; <i>DEK - NUP214</i> LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; <i>GATA2, MECOM</i> LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22) (p13;q13) ; <i>RBM15 - MKL1</i> LAM avec mutation <i>NPM1</i> LAM avec mutation bi allélique <i>CEBPA</i> Entités provisoires : LAM avec mutation <i>RUNX1</i>
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies (LAM-MRC)
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie
LAM sans autre spécification par ailleurs
LA Myéloblastique avec différenciation minimale LA Myéloblastique sans maturation LA Myéloblastique avec maturation LA myélo-monocytaire LA monoblastique / monocytaire LA érythroïde pure LA mégacaryoblastique LA Myéloblastique à composante basophile LA avec myélofibrose (panmyélose aiguë)
Sarcome granulocytaire
Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle
Réaction leucémoïde transitoire LAM associée à la trisomie 21 constitutionnelle

❖ LAM avec particularités morphologiques

La classification FAB est toujours utilisée pour l'analyse cyto-morphologique du myélogramme. Les cytologistes se basent sur l'analyse morphologique des blastes afin de classer les LAM. Certaines entités ont des spécificités morphologiques permettant d'orienter la recherche d'anomalies cytogénétiques spécifiques.

Parmi elles, la LAM3 ou leucémie aiguë promyélocytaire est une urgence thérapeutique en raison du risque élevé de CIVD par libération de molécules procoagulantes contenues dans les blastes. Les caractéristiques morphologiques de ces blastes permettent d'établir un diagnostic précis et de mettre en place un traitement spécifique, l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA), sans attendre les résultats du caryotype médullaire. Il existe deux entités de LAM3 : la forme classique et la forme variante. La forme classique se présente sous forme

leucopénique. Les blastes sont des promyélocytes atypiques, hypergranuleux (granulations azurophiles), à chromatine plus dense, dont certains contiennent plusieurs corps d'Auer dits « en fagots » (Figure 4a). La forme variante, plus rare (15 à 20% des LAM3), se présente plus fréquemment sous forme hyperleucocytaire avec de nombreux blastes microgranulaires à noyau bilobé (Figure 4b). Parmi eux, il est nécessaire de rechercher les rares blastes hypergranuleux ou contenant des corps d'Auer en fagots. Au niveau cytogénétique, la LAM3 est caractérisée par la translocation réciproque entre les chromosomes 15 et 17, ayant pour conséquence la fusion entre les gènes *PML* (*promyelocytic leukemia*) et *RARα* (*retinoic acid receptor alpha*) (Figure 4c).²⁵

La translocation t(8;21) est retrouvée dans un tiers des LAM2 diagnostiquées. Cytologiquement, les LAM à translocation t(8;21) se caractérisent par la présence de blastes contenant un corps d'Auer unique, long et fin, « piqué » dans le noyau, dit « en boussole » (Figure 4d). L'aspect pseudo-monocytaire des blastes et la présence de signes de dysgranulopoïèse (Figure 4e) doit faire rechercher la présence de ces corps d'Auer spécifiques. La translocation t(8;21) induit la formation d'un gène de fusion entre le gène *RUNX1* (*Runt-related transcription factor 1*) localisé sur le chromosome 21 et le gène *RUNX1T1* (*RUNX1 translocation partner 1*) localisé sur le chromosome 8 (Figure 4f).²⁶

La LAM4 à différenciation éosinophile (LAM4Eo) est une entité particulière des LAM4 de la classification FAB. La caractéristique morphologique ne porte pas sur les cellules leucémiques mais sur les éosinophiles qui présentent de volumineuses granulations pourpres anormales (Figure 4g). Au niveau cytogénétique, les LAM4Eo présentent une inversion du chromosome 16 ou une translocation t(16;16) induisant la formation d'un transcrite de fusion CBFβ-MYH11 (Figure 4h).²⁶

Ces trois types de LAM ayant des caractéristiques morphologiques spécifiques appartiennent au groupe des LAM avec anomalies génétiques récurrentes selon la classification OMS 2016²³ et sont de pronostic favorable selon la stratification ELN.^{18,27} L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) est possible par RT-qPCR (*reverse transcription quantitative polymerase chain reaction*) grâce à la présence de transcrits de fusion spécifiques.

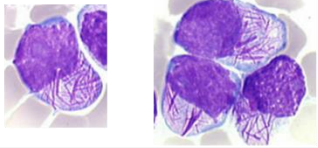
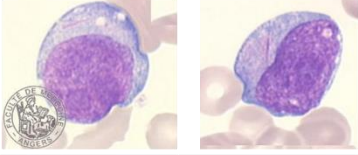
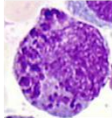
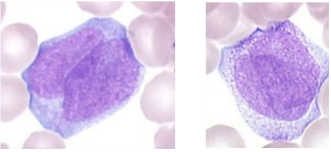
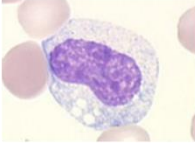
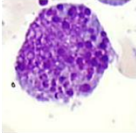
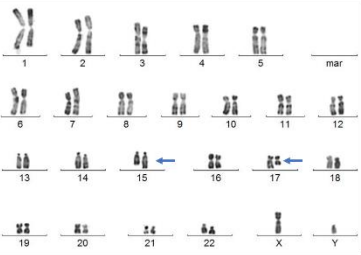
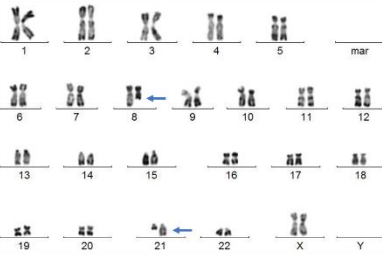
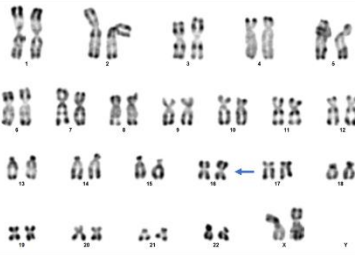
LAM3 promyélocytaire	LAM t(8;21)	LAM4 à différenciation éosinophile
a 	d 	g 
b 	e 	f 
c  <p>46,XY,t(15;17)(q24;q21)</p>	f  <p>46,XX,t(8;21)(q22;q22)</p>	h  <p>46,XX,inv(16)(p13q22)</p>

Figure 4 : Principales particularités morphologiques et cytogénétiques des LAM.

Les images a/b/d/e/g sont issues de la faculté de médecine d'Angers (disponible sur le site : <http://www.hematocell.fr/confrontationsabp/>). Les caryotypes (c/f/h) sont issus du laboratoire de cytogénétique de l'IPC.

Il existe d'autres LAM ayant des spécificités morphologiques. Par exemple, la présence de plus de 10% de blastes à noyau type « cup-like » (inclusion en coupelle : figure 5a) fait évoquer une LAM avec mutation *NPM1* (nucléophosmine) ou *FLT3* (*FMS-like tyrosine kinase 3*). Bien que non spécifique, cette particularité morphologique est retrouvée dans plus de 80% des LAM présentant une mutation *NPM1* ou *FLT3*. Dans 60 à 80% des cas, ces blastes n'expriment pas les marqueurs HLA-DR et CD34 à leur surface, respectivement.²⁸

L'érythrophagocytose par les blastes est une anomalie morphologique rare (moins de 1% des LAM), orientant vers une translocation t(8;16) impliquant le réarrangement de *KAT6A* (*lysine acetyltransferase 6A*).²⁹ Des images d'hémophagocytose sont visibles, non pas par les macrophages, mais par les blastes myéloïdes (Figure 5b).

Enfin, la présence de mégacaryocytes ou micromégacaryocytes anormaux, le plus souvent petits et hypolobés, oriente vers une inversion ou une translocation du chromosome 3 (Figure 5c).³⁰ Cette anomalie cytogénétique récurrente selon la classification OMS²³ est classée parmi les LAM de pronostic défavorable selon l'ELN.¹⁸



Figure 5 : Autres LAM ayant des caractéristiques morphologiques et cytogénétiques.

L'image a est issue de la faculté de médecine d'Angers (disponible sur le site : <http://www.hematocell.fr/confrontationsabp/>). Les images b/c sont issues du Département de Biologie du Cancer de l'IPC.

➤ Analyse phénotypique

L'immunophénotypage des blastes médullaires permet de confirmer le diagnostic de leucémie aiguë par l'expression faible du marqueur CD45 (par rapport aux leucocytes normaux ; aire de « Bermudes ») et/ou la présence de marqueurs d'immaturité (CD34, HLA-DR). La présence de marqueurs myéloïdes (MPO, CD13, CD33, CD117)^{18,19} permet de confirmer l'appartenance à la lignée myéloïde des cellules blastiques ; l'origine myéloïde ou lymphoïde étant parfois difficile à déterminer en cytologie, notamment lorsqu'il s'agit d'une LA indifférenciée.

L'analyse est effectuée sur un cytomètre en flux multi-couleurs après marquage des blastes par des anticorps monoclonaux fluorescents (voir Matériels et Méthodes). L'immunophénotypage permet de déterminer l'appartenance des blastes à une lignée cellulaire myéloïde et de préciser le niveau de différenciation des blastes¹⁸ :

- lignée granuleuse : CD11b, CD15, CD65
- lignée monocyttaire : CD4, CD11b, CD14, CD36, CD64
- lignée érythrocytaire : CD36, CD71, CD235a ou glycophorine A
- lignée mégacaryocytaire : CD41 ou glycoprotéine IIb/IIIa, CD42, CD61 ou glycoprotéine IIIa.

L'immunophénotypage permet de classer les LAM appartenant au groupe des LAM sans autre spécification par ailleurs de la classification OMS 2016.²³ Il permet également de détecter des marqueurs aberrants à la surface des blastes afin de définir un profil antigénique

particulier (nommé LAIP : *leukemia associated aberrant immunophenotype*) pouvant être utile pour suivre la maladie résiduelle par cytométrie en flux. Les LAM ayant des particularités morphologiques présentent aussi des particularités phénotypiques : expression aberrante du CD19 et du CD56 dans les LAM à translocation t(8;21), du CD2 dans les LAM4 à différenciation éosinophile et absence d'expression des marqueurs CD34 et HLA-DR dans les LA promyélocyaires.¹⁹

Au-delà de son utilité diagnostique, l'immunophénotypage présente une utilité thérapeutique par la recherche au diagnostic d'antigènes à la surface des cellules leucémiques pouvant être ciblés par anticorps monoclonaux. Actuellement, un essai clinique est en cours à l'Institut Paoli-Calmettes (IPC) sur l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti-CD71 chez les patients atteints de LAM dont les blastes expriment le marqueur CD71 (Protocole INA 03). Par ailleurs, le Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicine) a obtenu l'AMM en avril 2018 dans le traitement des LAM *de novo* (hors LAM3), dont les blastes expriment le marqueur CD33 à leur surface, en association à la daunorubicine et la cytarabine.³¹ Le Mylotarg® est un conjugué-médicament qui associe un anticorps monoclonal anti-CD33, permettant de cibler les blastes myéloïdes, à un agent cytotoxique (N-acétylgamma-calichéamicine), permettant la mort cellulaire par apoptose.

➤ Analyse cytogénétique et moléculaire

L'analyse cytogénétique et moléculaire est indispensable pour la classification diagnostique des LAM (Tableau 2).²³ Les techniques conventionnelles les plus utilisées au laboratoire sont le caryotype et la FISH (*fluorescent in situ hybridization*) pour l'étude cytogénétique et la PCR et RT-PCR pour l'étude moléculaire.

Le caryotype permet de rechercher des anomalies cytogénétiques acquises. Cet examen permet d'identifier des anomalies de nombre et/ou de structure touchant les chromosomes, notamment des translocations ou inversions qui sont récurrentes dans les LAM. Cependant, une proportion non négligeable de LAM (environ 45%) présentent un caryotype normal au diagnostic.³² Il convient d'analyser au minimum vingt métaphases sans anomalie chromosomique pour conclure à un caryotype normal. La FISH est utilisée lorsque des anomalies cytogénétiques sont fortement suspectées au myélogramme mais cryptiques au caryotype.

Le caryotype permet de confirmer les anomalies morphologiques identifiées au myélogramme, comme par exemple la LAM3 promyélocytaire et les LAM CBF (*core binding factor*). Les LAM CBF regroupent les LAM à translocation t(8;21) et les LAM4 à différenciation éosinophile avec inversion ou translocation du chromosome 16. Elles sont ainsi nommées devant une anomalie de fonction du facteur de transcription CBF : le gène codant pour la sous-unité CBF α 2 (ou *RUNX1*) étant situé sur le chromosome 21 tandis que le gène codant pour la sous-unité CBF β est situé sur le chromosome 16.

Certaines anomalies cytogénétiques retrouvées au caryotype permettent de classer les LAM dans le groupe des LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies, nommée LAM-MRC (*AML with myelodysplasia-related changes*), selon la classification OMS 2016.²³ En effet, la présence d'une seule des anomalies cytogénétiques citées dans le tableau 3 est suffisante pour établir le diagnostic de LAM-MRC lorsqu'au minimum 20% de blastes sont retrouvés dans le sang ou la moelle osseuse et qu'un traitement préalable par radiochimiothérapie pour une maladie non apparentée a été exclu ; ces anomalies cytogénétiques ne devant pas être associées aux anomalies cytogénétiques récurrentes définies par la classification OMS 2016. Le diagnostic de LAM-MRC peut aussi être retenu devant la présence d'un antécédent documenté de SMD ou SMD/SMP ou devant la présence d'une dysplasie multilignée (qui est définie par au moins 50% de cellules médullaires dysplasiques sur au minimum 2 lignées cellulaires, en l'absence d'une mutation *NPM1* ou d'une mutation bi-allélique de *CEBP α*).

Tableau 3 : Anomalies cytogénétiques suffisantes pour poser le diagnostic de LAM-MRC.

D'après Arber *et al.*, *Blood*, 2016.²³

Caryotype complexe	Anomalies non équilibrées	Anomalies équilibrées
Minimum 3 anomalies chromosomiques ; en l'absence d'une des translocations ou inversions récurrentes désignées par l'OMS, à savoir t(8;21), inv (16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23,3), t(6;9), inv (3) ou t(3;3) ou d'une LAM avec BCR- ABL1	Monosomie 7 ou del(7q) del(5q) ou t(5q) Isochromosome (17q) ou t(17p) Monosomie 13 ou del(13q) del(11q) del(12p) ou t(12p) idic(X)(q13)	t(11; 16)(q23.3;p13.3) t(3;21)(q26.2;q22.1) t(1;3)(p36.3;q21.2) t(2;11)(p21;q23.3) t(5;12)(q32;p13.2) t(5;7)(q32;q11.2) t(5;17)(q32;p13.2) t(5;10)(q32;q21.2) t(3;5) (q25.3;q35.1).

La biologie moléculaire permet quant à elle de détecter des mutations récurrentes qui affectent la pathogénie et donc le pronostic de la maladie. Des altérations somatiques sont retrouvées dans 97% des LAM, qui se caractérisent par une importante hétérogénéité et complexité mutationnelle.^{18,33} En effet, des dizaines de mutations ont été décrites dans cette pathologie, pouvant co-exister chez un même malade (Figure 6).

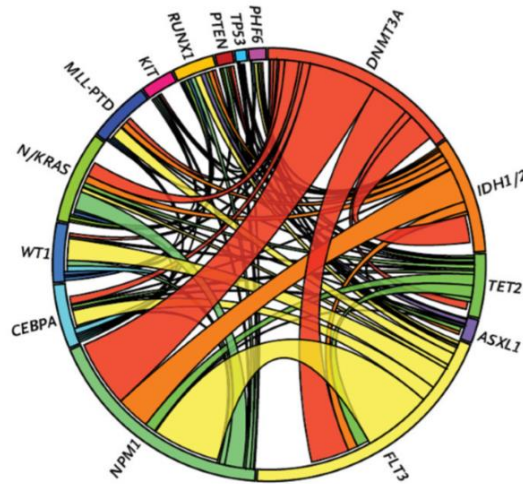


Figure 6 : Complexité mutationnelle des LAM.

D'après *Patel et al., NEJM, 2012.*³³

Lorsqu'une anomalie de structure est retrouvée au caryotype et qu'il existe un transcrite moléculaire correspondant, il est important, dès le diagnostic, de quantifier ce transcrite afin de pouvoir suivre sa décroissance au cours du temps. Ainsi, lorsque le diagnostic d'une LAM2 à translocation t(8;21), d'une LAM3 ou d'une LAM4 à différenciation éosinophile est établi, les transcrits correspondants sont quantifiés par RT-qPCR : RUNX1-RUNX1T1, PML-RAR α et CBF β -MYH11, respectivement.

c. Examens nécessaires au diagnostic

Selon les recommandations de l'ELN¹⁸, au diagnostic, il est indispensable d'effectuer toutes les analyses précédemment décrites. Des examens complémentaires sont utiles afin de rechercher ou documenter la présence de complications aiguës (CIVD, syndrome de lyse tumorale) par un bilan biochimique (ionogramme, créatinine, acide urique, LDH...) et de coagulation (TP, TCA, fibrinogène, monomères de fibrine).

Afin d'orienter la prise en charge thérapeutique, il est nécessaire d'évaluer l'éligibilité des patients à recevoir une polychimiothérapie intensive (âge, performance status, comorbidités) et de rechercher la présence d'éventuelles contre-indications au traitement

(certaines atteintes cardiaques contre indiquant l'utilisation d'anthracyclines devant leur cardiotoxicité). Chez les patients potentiellement éligibles à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH), sa faisabilité doit systématiquement être réalisée au diagnostic (sérologies virales, typage HLA...); la recherche d'un donneur HLA compatible pouvant prendre plusieurs semaines. Les analyses préconisées sont détaillées dans le tableau 4.

Tableau 4 : Analyses préconisées par l'ELN au diagnostic d'une LAM.

D'après Döhner et al., *Blood*, 2017.¹⁸

Tests permettant de poser le diagnostic
<ul style="list-style-type: none"> - Numération formule sanguine avec frottis sanguin - Myélogramme - Biopsie de moelle osseuse (uniquement en cas de ponction blanche) - Immunophénotypage
Analyses génétiques
<ul style="list-style-type: none"> - Cytogénétique (20 métaphases au minimum sont requises pour définir un caryotype normal) - Recherche de mutations dont : <i>NPM1</i>, <i>CEBPA</i>, <i>RUNX1</i>, <i>FLT3</i>, <i>TP53</i>, <i>ASXL1</i> - Recherche de réarrangement génique : <i>PML-RARA</i>, <i>CBFB-MYH11</i>, <i>RUNX1-RUNX1T1</i>, <i>BCR-ABL1</i> et autres gènes de fusion (si disponible)
Autres tests et procédures pour le diagnostic
<ul style="list-style-type: none"> - Démographie - Historique médical, hématologique et familial - Performans status (échelle OMS) - Analyse des comorbidités - Bilan biochimique et de coagulation - Tests urinaires - Test sérique de grossesse : β-HCG - Information sur les cryoconservations d'ovocytes et de sperme - Évaluation de l'éligibilité pour une allogreffe de CSH (y compris le typage HLA et la sérologie CMV) - Tests VIH-1, hépatites A, B, C - Radiographie thoracique, ECG 12 dérivations, ETT (ou ventriculographie isotopique sur indication) - Ponction lombaire (imagerie cérébrale préalable en cas de symptomatologie neurologique) - Stockage à la biothèque
Evaluation de la réponse
<ul style="list-style-type: none"> - En biologie moléculaire par RT-qPCR pour les mutations <i>NPM1</i> et les transcrits de fusion <i>CBFB-MYH11</i>, <i>RUNX1-RUNX1T1</i>, <i>BCR-ABL1</i> - En immunophénotypage par cytométrie en flux multiparamétrique

3. Pronostic

Les LAM sont des pathologies de mauvais pronostic. Aux Etats-Unis, en 2016, la survie globale médiane estimée des LAM était de 8,5 mois et la survie globale à 5 ans était seulement de 24%, ce qui place la LAM au 5^e rang des cancers les plus agressifs en termes de survie globale à 5 ans (Figure 7).⁸

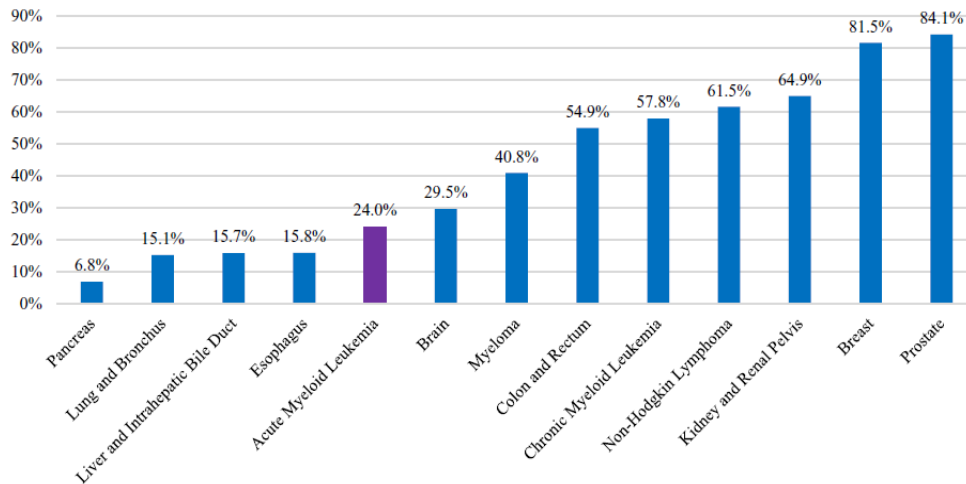


Figure 7 : Survie globale à 5 ans par type de cancers aux États-Unis, 2000-2016.

D'après *Shallis et al., Blood Reviews, 2019*.⁸

Chez les sujets de plus de 65 ans, population la plus touchée par cette pathologie, le pronostic est encore plus sombre. En effet, près de 80% de ces patients décéderont l'année suivant le diagnostic, avec une survie globale médiane de 2,7 mois.⁸ L'âge est donc un facteur pronostic majeur, mais il existe d'autres facteurs influençant le pronostic des LAM, qu'ils soient liés au patient, à la maladie ou au traitement administré.

a. Facteurs pronostiques liés à la maladie

✓ Génétiques

➤ Cytogénétique

La cytogénétique est un facteur indispensable dans la stratification pronostique des LAM. En 2002, Byrd et al. montrent l'intérêt majeur de la cytogénétique dans l'obtention d'une rémission complète, la survie à long terme et le taux de rechutes.³⁴ Les patients ont été classés en 3 groupes pronostiques selon les anomalies retrouvées à leur caryotype : favorable, intermédiaire et défavorable. Entre ces 3 groupes, les taux de rémission complète (88%, 67%, 32%) et la survie globale à 5 ans (55%, 24% et 5%) décroissent tandis que l'incidence

cumulative de rechute augmente (54%, 67%, 92%), respectivement.³⁴ Concernant le groupe à risque défavorable, la probabilité d'atteindre la rémission complète (RC) est 4,0 fois plus faible alors que la probabilité de rechute et le risque de décès sont 3 fois et 2,1 fois plus élevés que ceux du groupe intermédiaire, respectivement.³⁴

Plusieurs essais cliniques menés au Royaume Uni entre 1988 et 2009 chez 5876 patients atteints de LAM âgés de moins de 60 ans ont montré des résultats similaires. En effet, la survie globale à 10 ans est supérieure à 55% pour les anomalies cytogénétiques classées dans le groupe favorable alors qu'elle est inférieure à 10% pour celles classées dans le groupe défavorable.³⁵ Ainsi, Grimwade et al. ont évalué l'impact pronostic des anomalies cytogénétiques reconnues dans l'édition 2008 de la classification OMS. Ainsi, les LAM à translocation t(15;17), à translocation t(8;21) et à inversion du chromosome 16 sont des anomalies cytogénétiques de bon pronostic, ayant une survie globale à 10 ans de 81%, 61% et 55%, respectivement. La présence d'une translocation t(9;11) classe les LAM dans le groupe pronostic intermédiaire avec une survie globale à 10 ans de 39%. Enfin, les LAM ayant une translocation t(9;22), une monosomie 7 (ou une délétion 7q), une monosomie 5 (ou une délétion 5q) ou une inversion du chromosome 3 sont classées dans le groupe pronostic défavorable, avec des survies globales à 10 ans de 11%, 10%, 6% et 3%, respectivement (Figure 8).³⁵

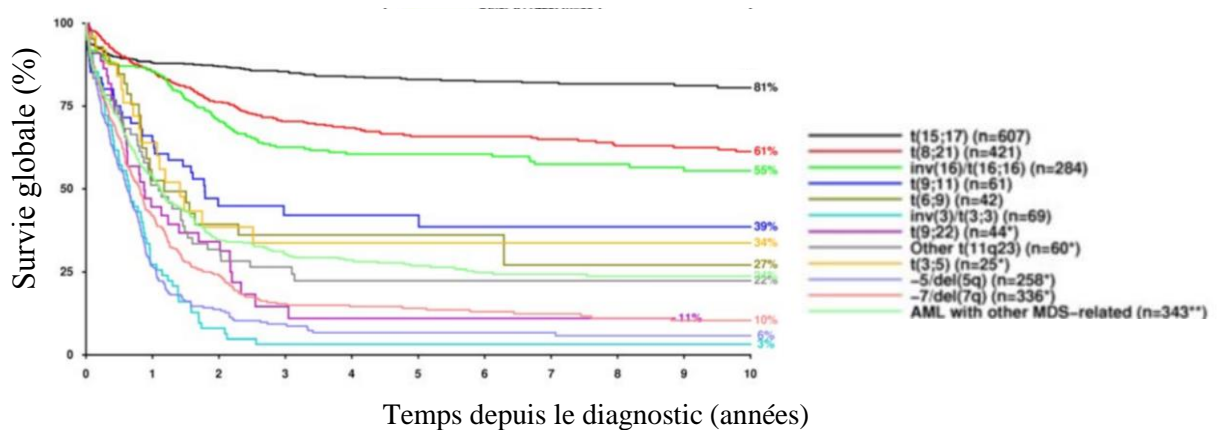


Figure 8 : Impact pronostic des anomalies cytogénétiques décrites dans la classification OMS 2008. D'après Grimwade et al., Blood, 2010.³⁵

Enfin, lorsque ces anomalies ne sont pas retrouvées, la présence d'au minimum 4 anomalies cytogénétiques confère un pronostic péjoratif, avec une survie globale à 10 ans de 18% comparée à 39% lorsque le caryotype présente entre 0 et 3 anomalies (Figure 9).

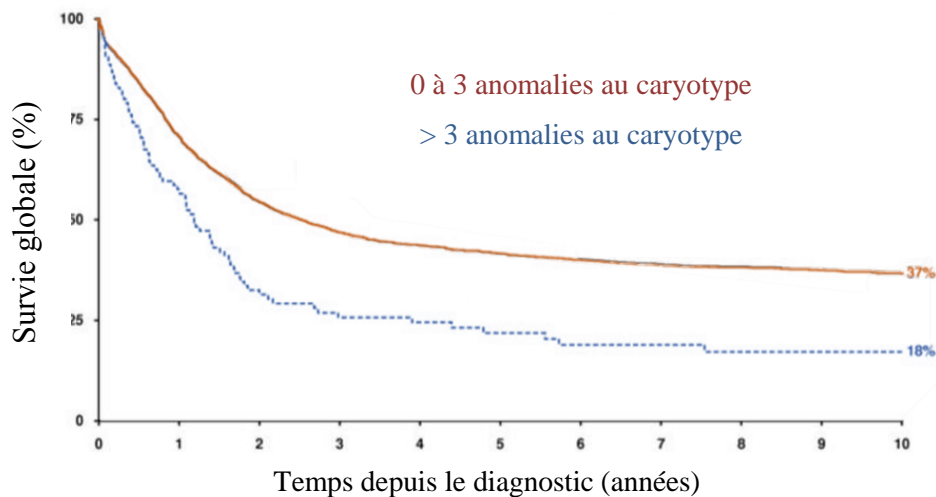


Figure 9 : Impact d'un caryotype complexe sur la survie des patients.

D'après *Grimwade et al., Blood, 2010*.³⁵

Patients dépourvus d'anomalies cytogénétiques conférant un pronostic favorable ou défavorable.

La classification ELN révisée en 2017 est la classification pronostique actuellement utilisée en pratique clinique en France.¹⁸ Elle reprend la majorité de ces anomalies cytogénétiques décrites ; hormis la délétion 7q qui ne permet plus à elle seule de classer les LAM dans le groupe pronostic défavorable.

La présence d'un caryotype complexe ou monosomique classe les LAM dans le groupe pronostic défavorable. Un caryotype complexe est défini par la présence d'au moins 3 anomalies cytogénétiques (à la différence de 4 anomalies cytogénétiques dans les recommandations du *Medical Research Council*) ; en l'absence d'une des translocations ou inversions récurrentes désignées par l'OMS (à savoir les translocations t(8;21), t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23,3), t(6;9), t(3;3) et les inversions des chromosomes 3 ou 16). Un caryotype monosomique est défini par la présence d'au minimum 2 monosomies sur des chromosomes autosomes distincts ou d'une seule monosomie associée à la présence d'une anomalie chromosomique structurale. En 2008, une équipe belge avait montré l'impact pronostic très péjoratif des caryotypes monosomiques avec une survie globale à 4 ans de 4% comparée à 26% chez les LAM à risque défavorable ne présentant pas de caryotype monosomique.³⁶

En 2018, une équipe américaine fait une analyse rétrospective d'une cohorte de 715 patients atteints de LAM âgés de moins de 60 ans, selon les recommandations ELN 2017 : 27% de ces patients sont classés dans le groupe favorable, 46% dans le groupe intermédiaire et 27% dans le groupe défavorable. Leur probabilité de survie globale à 5 ans est de 57%, 37% et 18%, respectivement.³⁷

Enfin, en 2017, une équipe japonaise démontre l'importance et la robustesse du risque cytogénétique sur la survie globale et l'incidence cumulative de rechutes après allogreffe de CSH chez 7812 patients atteints de LAM (Figure 10).³⁸

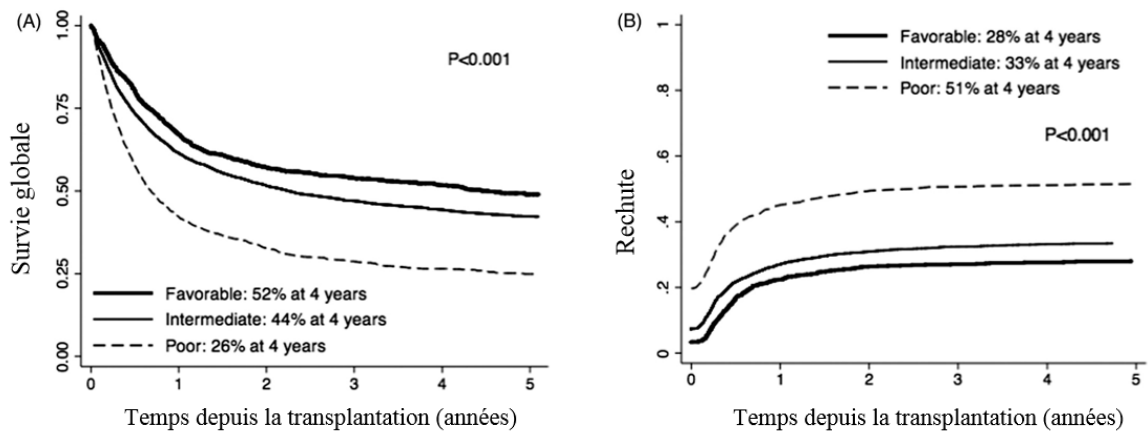


Figure 10 : La cytogénétique est un facteur pronostic majeur chez les patients traités par allogreffe de CSH. D'après Yanada et al., *Leukemia & Lymphoma*, 2018.³⁸

➤ Biologie moléculaire

De nombreuses mutations ont été décrites dans les LAM : en 2016, Papaemmanuil et al. ont identifié 5234 mutations « driver ». ³⁹ Parmi ces anomalies moléculaires, certaines sont de puissants facteurs pronostiques : les mutations *FLT3-ITD*, *MLL* avec duplication partielle en tandem et *ASXL1* sont associées à une survie globale réduite. ³³ Parmi les patients à risque intermédiaire non mutés *FLT3-ITD*, la survie globale à 3 ans est de 6,3% chez les patients ayant une mutation *TET2*, *ASXL1*, *PHF6* ou *MLL* avec duplication partielle en tandem contre 89% chez les patients porteurs d'une double mutation *NPM1-IDH* (Figure 11).³³

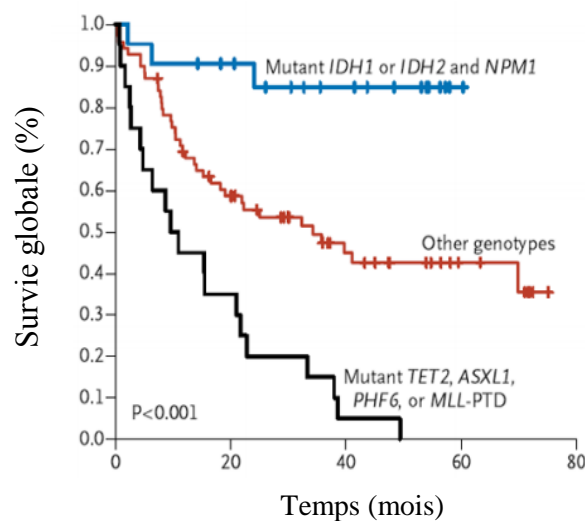


Figure 11 : Impact du statut mutationnel sur la survie globale des patients atteints de LAM à risque intermédiaire. D'après Patel et al., *NEJM*, 2012.³³

Survie globale chez les patients à risque intermédiaire non mutés *FLT3-ITD*.

En 2017, la révision de la classification ELN a permis d'intégrer de nouveaux marqueurs pronostiques moléculaires : *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53*.¹⁸ La présence d'une mutation de l'un de ces 3 gènes classe la LAM dans le groupe pronostic défavorable, devant l'impact pronostic péjoratif démontré dans la littérature.⁴⁰⁻⁴² En revanche, la présence d'une mutation du gène *RUNX1* ou *ASXL1* ne modifie pas le pronostic favorable des LAM3 et des LAM CBF.¹⁸

La stratification pronostique ELN 2017 prend aussi en compte les mutations *NPM1*, *FLT3* et *CEBPα* (*CCAAT/enhancer-binding protein alpha*). Ces mutations présentent un impact pronostic fort en l'absence des anomalies cytogénétiques décrites précédemment. En effet, la présence d'une double mutation dans le gène *CEBPα* confère un pronostic favorable même en présence d'anomalies chromosomiques ajoutées.⁴³

De plus, la présence d'une mutation *NPM1* est de bon pronostic⁴⁴ tandis qu'une mutation *FLT3-ITD* (*internal tandem duplication*) est de mauvais pronostic.⁴⁵ La cooccurrence de ces 2 mutations permet de stratifier les patients. Les dernières études ont rapporté l'importance du ratio *FLT3-ITD* muté sur l'impact pronostic.⁴⁶ Ainsi, seuls les ratios *FLT3-ITD* mutés supérieur ou égal à 0,5 (nommé *FLT3-ITD^{high}*) présentent un pronostic péjoratif. Dans la classification ELN 2017, les patients ayant un ratio *FLT3-ITD* muté strictement inférieur à 0,5 (nommé *FLT3-ITD^{low}*) sont regroupés avec les patients ne présentant pas de mutation *FLT3-ITD* (nommé *FLT3^{WT}*). La présence d'une mutation *NPM1* sans mutation *FLT3-ITD^{high}* permet de classer les LAM dans le groupe pronostic favorable alors qu'en association avec une mutation *FLT3-ITD^{high}*, elles sont classées dans le groupe pronostic intermédiaire. En l'absence de mutation *NPM1*, la présence d'une mutation *FLT3-ITD^{high}* classe les LAM dans le groupe pronostic défavorable et la présence d'une mutation *FLT3-ITD^{low}* classe les LAM dans le groupe pronostic intermédiaire (Tableau 5).

Tableau 5 : Stratification pronostique ELN des LAM.

D'après Döhner et al., *Blood*, 2017.¹⁸

Favorable
<ul style="list-style-type: none">▪ t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>▪ inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>▪ Mutation <i>NPM1</i> sans mutation <i>FLT3-ITD</i> ou avec <i>FLT3-ITD</i>^{low}▪ Mutation biallélique <i>CEBPα</i>
Intermédiaire
<ul style="list-style-type: none">▪ Mutation <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i>^{high}▪ <i>NPM1</i> non muté sans mutation <i>FLT3-ITD</i> ou avec <i>FLT3-ITD</i>^{low} en l'absence de lésions génétiques à risque défavorable▪ t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>▪ Anomalies cytogénétiques non classées en risque favorable ou défavorable
Défavorable
<ul style="list-style-type: none">▪ t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>▪ t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> réarrangé▪ t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i>▪ inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM (EVII)</i>▪ Monosomie 5 ou délétion 5q▪ Monosomie 7▪ Monosomie 17 ou anomalie 17p▪ Caryotype complexe ou monosomique▪ <i>NPM1</i> sauvage et <i>FLT3-ITD</i>^{high}▪ Mutation <i>RUNX1</i>▪ Mutation <i>ASXL1</i>▪ Mutation <i>TP53</i>

✓ Caractère secondaire de la LAM

Les LAM secondaires à un traitement ou une pathologie myéloïde sont des entités particulières, dont le pronostic est plus sombre. En effet, la médiane de survie globale est plus courte chez les patients atteints de t-LAM (10 mois) comparée aux LAM *de novo* (15 mois).⁴⁷ De plus, en 2015, une étude danoise montre que la survie est abaissée chez les patients atteints de LAM secondaire comparée aux LAM *de novo* (Figure 12).⁵

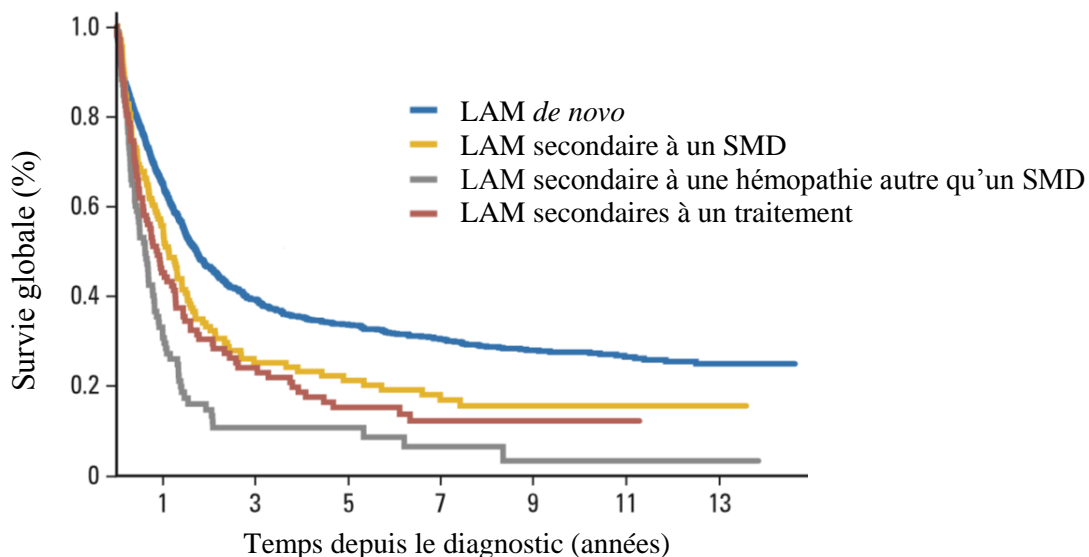


Figure 12 : Survie globale des patients atteints de LAM selon le caractère primaire ou secondaire de la LAM. D'après Granfeldt Østgård, *Journal of Clinical Oncology*, 2015.⁵

Ce pronostic péjoratif peut s'expliquer en partie devant l'âge élevé de la population atteinte et la proportion plus importante d'anomalies cytogénétiques et moléculaires retrouvées dans ces pathologies, reconnues comme étant des facteurs indépendants de mauvais pronostic.^{5,8,9,47} Des caryotypes complexes et monosomiques sont ainsi plus fréquemment retrouvés dans les LAM secondaires.⁴⁸

✓ Traitement

Le pronostic des patients atteints de LAM dépend aussi du traitement qui leur est administré. Sans traitement, la maladie est mortelle dans 100% des cas. L'administration d'une chimiothérapie intensive a nettement amélioré le pronostic des patients, notamment au fil des décennies (Figure 13).⁸ Bien que le traitement classique par chimiothérapie ait peu évolué, l'amélioration observée dépend notamment des soins supports (prophylaxie, traitements anti-infectieux...) et des progrès effectués dans l'allogreffe de CSH (gestion des traitements immunosuppresseurs...). Entre 1991 et 2009, les taux de mortalité liée au traitement sont passés de 18% à 3%, selon l'étude du groupe SWOG (*Southwest Oncology Group*) portant sur 1409 patients atteints de LAM.⁴⁹

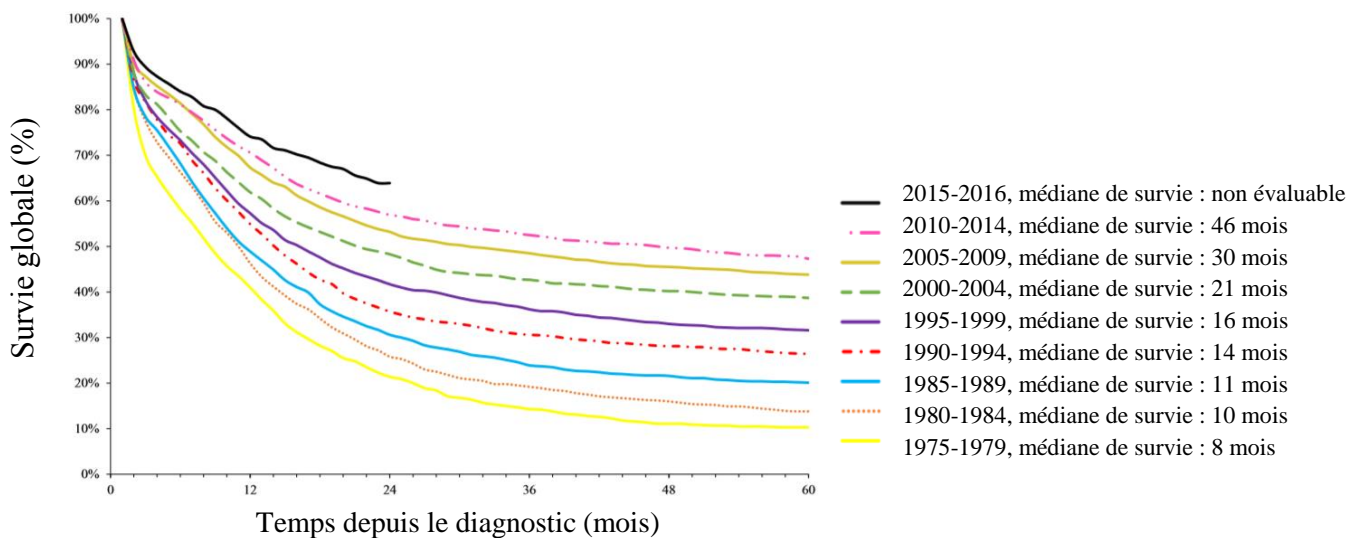


Figure 13 : Amélioration de la survie globale des patients atteints de LAM au fil des décennies. D’après *Shallis et al., Blood, 2019.*⁸

Survie globale chez les patients atteints de LAM âgés de moins de 65 ans.

L’allogreffe, seul traitement curatif des LAM, améliore significativement la survie globale et sans rechute, chez les patients jeunes mais aussi chez les patients plus âgés.⁵⁰ En effet, le développement de conditionnement à intensité réduite a permis d’étendre l’indication d’allogreffe aux sujets plus âgés.⁵¹ En 2011, une étude japonaise portant sur les patients âgés de 50 à 70 ans, a montré que la survie sans rechute à 3 ans chez les patients allogreffés était significativement supérieure à celle des patients n’ayant reçu qu’une chimiothérapie (56% *versus* 29%, respectivement ; Figure 14A).⁵² De plus, l’incidence cumulative de rechutes dans le groupe de patients allogreffés est significativement inférieure à celle du groupe de patients traités par chimiothérapie seule (22% *versus* 62%, respectivement ; Figure 14B).

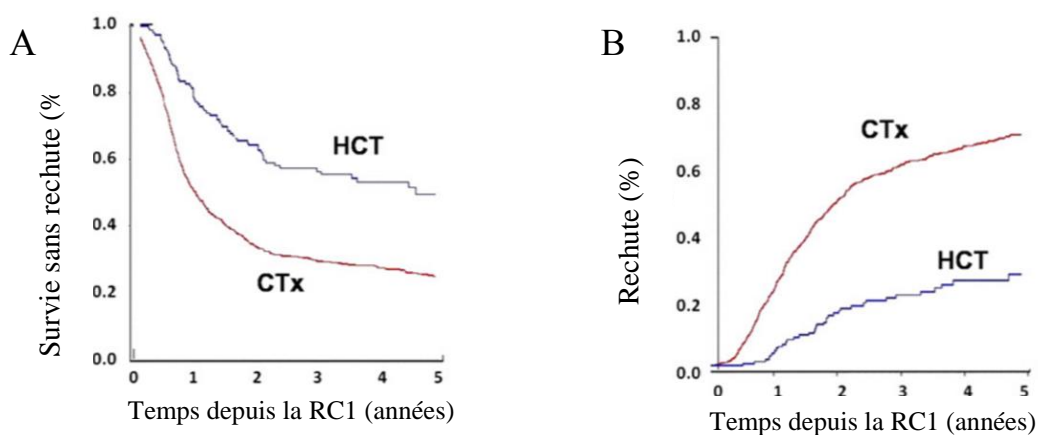


Figure 14 : L’allogreffe de CSH améliore le pronostic des patients atteints de LAM âgés de 50 à 70 ans. D’après *Kurosawa et al., BBMT, 2011.*⁵²

CTx : patients traités par chimiothérapie seule (n=838) ; HCT : patients traités par allogreffe de CSH (n=152).

L'allogreffe est recommandée uniquement chez les patients ayant un risque cytogénétique intermédiaire ou défavorable, devant leur risque de rechute élevé. Chez les patients du groupe favorable de l'ELN, les risques liés à l'allogreffe dépassent leur faible risque de rechute.⁵³ Le traitement par chimiothérapie seule est alors suffisant.

Le pronostic des patients atteints de leucémie aiguë promyélocytaire a radicalement changé depuis l'arrivée d'une thérapie ciblée spécifique. Considérée comme la forme la plus agressive des LAM, l'utilisation de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) depuis 1988 a permis de classer cette leucémie parmi les LAM de pronostic favorable. En effet, la survie sans leucémie à 5 ans est passée de 29% chez les patients traités par chimiothérapie standard à 69% chez les patients ayant reçu une induction par ATRA (Figure 15).⁵⁴ Depuis, la LAM3 est étudiée séparément des autres LAM dans les études épidémiologiques. De plus, l'arrivée du trioxyde d'arsenic en 1996 a permis d'améliorer le pronostic des LAM3 réfractaires ou en rechute.²⁵

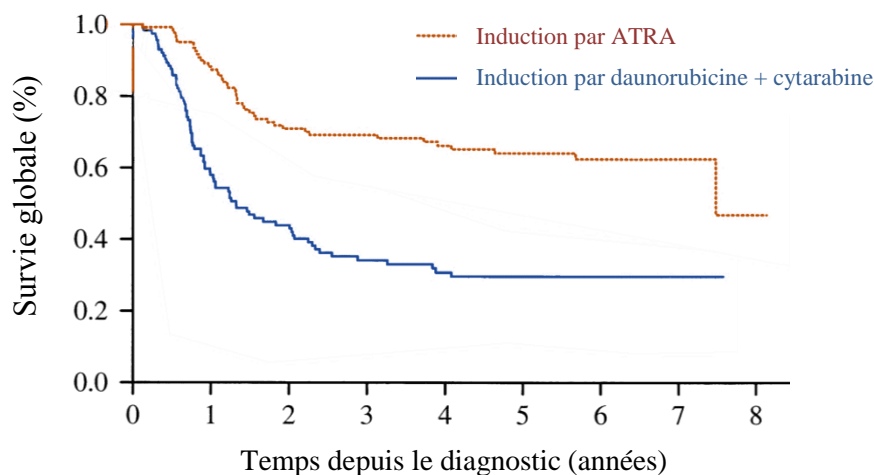


Figure 15 : L'ATRA a révolutionné le pronostic des patients atteints de LAM3.

D'après Tallman *et al.*, *Blood*, 2002.⁵⁴

✓ Réponse au traitement et maladie résiduelle

Le pronostic dépend de la réponse au traitement. Les patients atteignant une rémission complète (RC) ont une survie significativement augmentée comparée à ceux résistants au traitement⁵⁵ ; la RC cytologique étant définie par un pourcentage de blastes inférieur à 5% dans la moelle osseuse. De plus, il a été montré que les patients atteignant une RC ont des survies globales et sans rechute significativement plus élevées que les patients atteignant une RC avec récupération hématologique incomplète, à savoir les patients ayant une neutropénie ou une thrombopénie persistante après le traitement d'induction ou le premier cycle de consolidation (Figure 16).^{56,57}

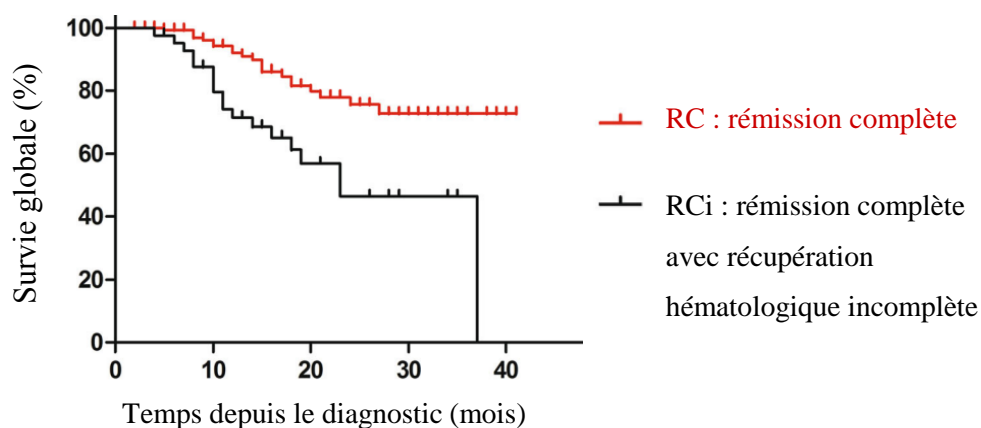


Figure 16 : La survie des patients en rémission complète dépend de leur récupération hématologique. D'après *Cheng et al., Blood, 2018*.⁵⁷

La maladie résiduelle (MRD) permet aussi d'évaluer la réponse au traitement, mais de manière plus sensible que la réponse cytologique. Elle prédit le risque de rechute et permet donc d'adapter la stratégie thérapeutique. Ainsi, une MRD positive est associée à un risque de rechute plus élevé et une survie plus courte comparé à une MRD négative.⁵⁸

Chez les patients ayant une LAM à translocation t(8;21), la persistance d'un taux élevé du transcrit RUNX1-RUNX1T1 après la chimiothérapie d'induction augmente l'incidence de rechutes.⁵⁹ De plus, Jourdan et al. ont montré qu'une réduction de la MRD supérieure à 3 log après la première consolidation était un puissant facteur pronostic.⁶⁰ Chez ces patients, à 36 mois, l'incidence cumulée de rechutes est de 22% (*versus* 54%) et la survie sans rechute de 73% (*versus* 44%), par rapport aux patients n'ayant pas obtenu une réduction de la MRD d'au moins 3 log.

Chez les patients allogreffés, une MRD négative avant l'allogreffe permet d'obtenir une survie globale et sans progression significativement plus longue comparé à une MRD positive (survie globale : 73% *versus* 26%, respectivement).⁶¹ De plus, les patients ayant obtenu une rémission cytologique dont la MRD reste positive ont une probabilité de rechute similaire à ceux n'ayant pas atteint la rémission cytologique (Figure 17).

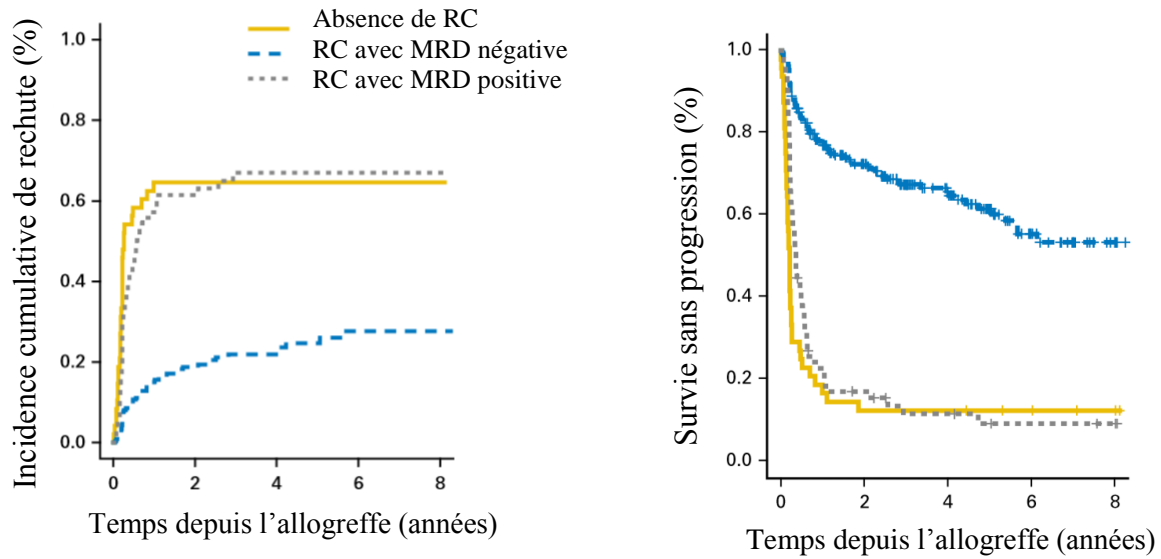


Figure 17 : Impact pronostic de la maladie résiduelle.

D'après Araki et al., *Journal of Clinical Oncology*, 2016.⁶¹

La maladie résiduelle est donc un facteur pronostic indépendant, puissant et sensible, permettant d'adapter au mieux la stratégie thérapeutique à chaque patient.

✓ Autres

L'hyperleucocytose, généralement définie par un taux dépassant les 100 G/L de globules blancs, est un facteur de mauvais pronostic. Concernant les LAM3, classiquement leucopéniques, ce seuil est abaissé à 10 G/L. L'hyperleucocytose est un facteur de risque de leucostase, de syndrome de lyse tumorale et de CIVD, augmentant le risque de mortalité précoce.^{62,63} Ainsi, pour les LAM non promyélocytaire, une cytoréduction par Hydrea® est réalisée avant de commencer la chimiothérapie d'induction, afin d'abaisser le taux de leucocytes circulants.

Enfin, la présence d'un sarcome granulocyttaire confère un pronostic péjoratif.⁶⁴ Il s'agit d'une prolifération extra-médullaire de cellules myéloïdes immatures. Ces localisations extra-médullaires sont plus fréquemment retrouvées dans les LAM CBF à translocation t(8;21).⁶⁵

b. Facteurs pronostiques liés au patient

✓ Age

L'âge est un facteur de mauvais pronostic dans les LAM puisque les taux de survie globale diminuent lorsque l'âge des patients augmente (Figure 18).^{66,67} En 2004, l'étude allemande réalisée sur 1225 patients atteints de LAM *de novo* a montré qu'à partir de 50 ans, l'âge était un facteur pronostic indépendant dans les LAM.⁶⁶ En effet, l'âge influence peu le pronostic des patients âgés de moins de 50 ans tandis que l'impact pronostic est majeur au-delà de 75 ans. En 2006, ces résultats sont confirmés chez 968 patients où la médiane de survie globale est seulement de 3,5 mois chez les patients âgés de plus de 75 ans *versus* 18,8 mois chez les patients âgés de moins de 56 ans.⁶⁸

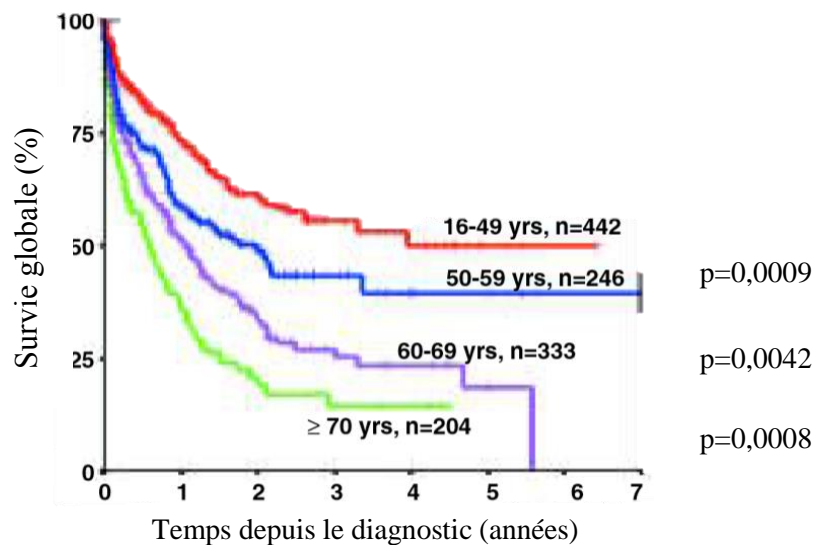


Figure 18 : Survie globale des LAM *de novo* selon la classe d'âge.

D'après Schoch et al., *Haematologica*, 2004.⁶⁶

Chez les patients âgés de plus de 65 ans, les taux de rémission complète sont abaissés.⁶⁶⁻⁶⁹ Plusieurs hypothèses sont avancées pour expliquer cette difficulté à atteindre une rémission complète.

Avec l'âge, les anomalies chromosomiques sont plus fréquentes, notamment sur les chromosomes 5 et 7 (monosomie ou délétions) qui sont des anomalies cytogénétiques de pronostic défavorable.^{66,69} De plus, les LAM CBF (translocation t(8;21) et inversion du chromosome 16), de bon pronostic, sont sous-représentées chez les patients âgés de plus de 65 ans.^{66,68,69} Deux études britanniques, réalisées sur 1065 patients âgés de plus de 65 ans d'une part et 1612 patients âgés de moins de 55 ans d'autre part, montrent des résultats similaires : les LAM présentant un caryotype favorable sont plus rares chez les personnes âgées de plus de 65 ans (7% *versus* 24%, respectivement) alors que les caryotypes complexes sont plus fréquemment retrouvés (13% *versus* 6%, respectivement).^{70,71}

La difficulté à obtenir une RC chez les patients âgés peut aussi s'expliquer par une résistance aux traitements. Il a été montré que la présence du gène MDR1 (*Multidrug Resistance gene-1*) à la surface de cellules leucémiques était associée à un mauvais pronostic.⁷² Ce gène MDR1 code pour la P-glycoprotéine, qui fait sortir certains anticancéreux de la cellule.⁷³ Ce gène confère donc une résistance accrue au traitement. Chez les sujets âgés, la fréquence du gène MDR1 est augmentée.⁷⁴

Les sujets âgés sont les plus à risque de développer un syndrome myélodysplasique, ce qui augmente le risque d'évoluer en LAM secondaire. De plus, l'âge est étroitement lié au *performans status* (PS), à l'état général et à la présence de comorbidités.⁶⁸

L'âge est donc un critère pronostic majeur dans les LAM mais doit systématiquement être confronté aux autres facteurs pronostiques.

✓ Comorbidités

Les comorbidités représentent le principal obstacle pour le traitement des LAM.^{75,76} Avec l'utilisation d'anthracyclines, l'induction par chimiothérapie intensive est notamment contre indiquée chez les patients ayant une cardiomyopathie. De plus, certains patients sont inéligibles à l'allogreffe en raison d'un risque trop élevé de complications. Enfin, la présence de certaines comorbidités peut empêcher l'inclusion de patients dans des essais cliniques. La prise en charge de ces patients se fait donc au cas par cas, selon le nombre de comorbidités et les organes atteints. Le pronostic de ces patients est variable, le plus souvent péjoratif.⁷⁷

Il existe des scores couramment utilisés dans le bilan pré-greffe permettant d'évaluer la faisabilité de l'allogreffe. En 2005, Sorror et al. ont proposé un score, le HCT-CI (*Hematopoietic Cell Transplantation-specific Comorbidity Index*), permettant d'évaluer la présence de dysfonctions organiques qui influent le pronostic de l'allogreffe : pathologie cardiaque, hépatique, rénale, cérébrale, infections...⁷⁸ Ce score permet de prédire la mortalité non liée à la rechute ; la mortalité étant d'autant plus importante chez les patients ayant un score élevé. Le HCT-CI, largement utilisé, a été amélioré afin d'intégrer de nouveaux paramètres. En 2017, Sorror et al. ont proposé un modèle composite permettant d'évaluer les comorbidités des patients tout en prenant en compte les caractéristiques de la maladie.⁷⁹ Ainsi, ce nouveau modèle prend en compte l'âge, les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires de la LAM ainsi que 3 nouvelles comorbidités, à savoir l'hypoalbuminémie, la thrombopénie et le taux élevé de lactate déshydrogénase. Ce nouveau modèle permet une meilleure discrimination du risque de mortalité comparé aux précédents scores développés (Figure 19).⁷⁹

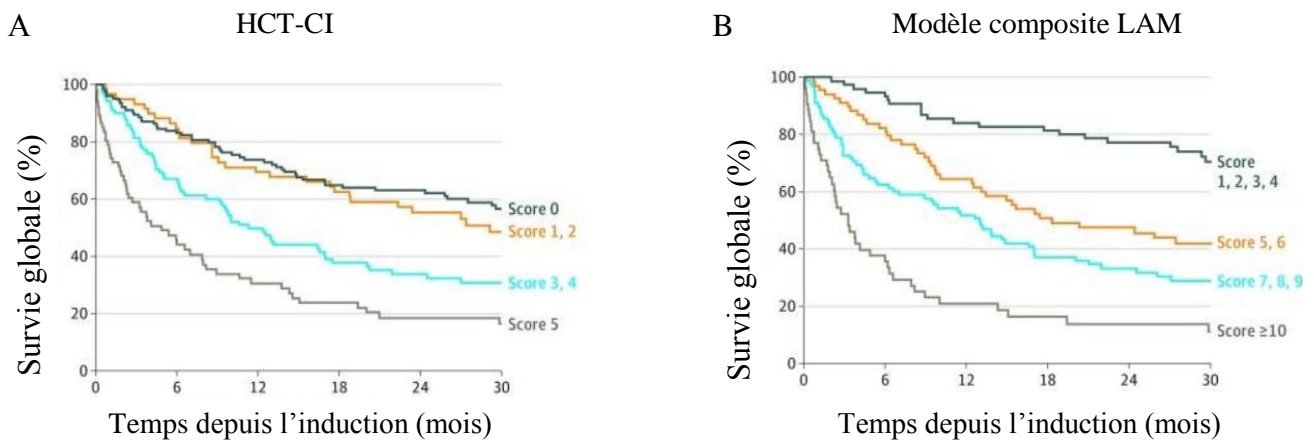


Figure 19 : Probabilité de survie selon le score HCT-CI (A) et le modèle composite LAM (B).
D'après *Sorrer et al., JAMA Oncology, 2017*.⁷⁹

✓ Etat général

Parallèlement à l'âge et aux comorbidités, l'état général est un facteur à prendre en compte dans la décision thérapeutique. Il existe différentes échelles permettant d'évaluer la capacité des patients à recevoir des traitements lourds. L'OMS a développé l'indice de performance status (PS) allant de 0 à 4 selon l'état de dépendance (Figure 20). Plusieurs études ont montré l'impact pronostic du PS. En 2015, Østgård et al. ont évalué l'effet du PS sur 2792 patients. Ainsi, ils ont pu mettre en évidence qu'un mauvais PS était fortement associé à une augmentation de la mortalité à court et long terme (Figure 20).⁸⁰

Indice de performance status (O.M.S.)	
0	Capable d'avoir une activité normale sans restriction
1	Activité physique discrètement réduite, mais ambulatoire moins de 25% du temps de jour au lit
2	Ambulatoire, indépendant, mais incapable d'activité soutenue, debout moins de 50% du temps de jour
3	Capable uniquement de satisfaire ses besoins propres. Confiné au lit près de 75% du temps de jour
4	Invalide, ne peut satisfaire seul à ses besoins propres. Alité toute la journée

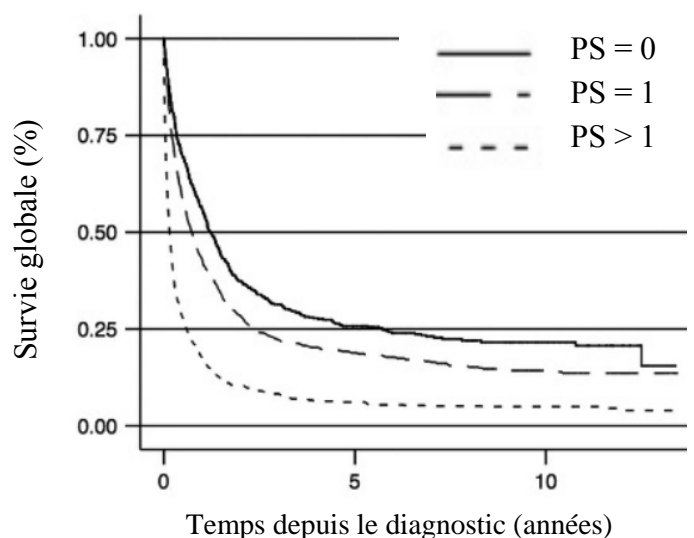


Figure 20 : L'indice de performance status de l'OMS influence la survie globale des patients atteints de LAM. D'après *Østgård et al., Leukemia, 2015*.⁸⁰

L'indice de performance status est étroitement lié à l'âge. En effet, Appelbaum et al. ont montré que l'âge avait un effet majeur chez les patients ayant un PS élevé. Dans leur étude, chez les patients ayant un PS à 3, la probabilité de décès dans les 30 jours suivant l'induction allait de 0% chez les sujets âgés de moins de 56 ans à 82% chez les sujets âgés de plus de 75 ans.⁶⁸

Ainsi, l'évaluation de l'ensemble des facteurs pronostiques est essentielle pour adapter la stratégie thérapeutique à chaque patient.

4. Prise en charge des patients atteints de LAM

Le traitement des LAM nécessite une prise en charge multidisciplinaire dans des centres spécialisés. Contrairement aux tumeurs solides, une résection chirurgicale suivie d'une radiothérapie n'est pas indiquée en première intention. Le traitement repose essentiellement sur une polychimiothérapie intensive. La prise en charge est adaptée à chaque pathologie, afin de prendre en compte les différentes aberrations cytogénétiques et moléculaires retrouvées, ainsi qu'à chaque patient, afin d'évaluer leur capacité à recevoir un traitement intensif (âge, comorbidités, performance status...). La décision thérapeutique dépend du risque pronostic de chaque patient. Elle est prise en réunion de concertation pluridisciplinaire, afin de proposer la meilleure stratégie thérapeutique personnalisée.

a. Traitement symptomatique

Les patients présentant des complications aiguës au diagnostic nécessitent une prise en charge en urgence. Ainsi, une cytoréduction par Hydrea® fortes doses et dexaméthasone est instaurée avant de débiter la chimiothérapie d'induction chez les patients présentant une LAM non promyélocytaire hyperleucocytaire. Dans de rares cas, la présence associée de signes de leucostase peut nécessiter une leucaphérèse, ainsi qu'une ventilation respiratoire et oxygénothérapie.⁶² Dans les LAM hyperleucocytaires, la prévention du syndrome de lyse tumorale est indispensable. Elle passe par le maintien d'une diurèse satisfaisante par remplissage vasculaire (sérum salé isotonique NaCl 0,9%) et la prévention de l'hyperuricémie par des traitements hypo-uricémiants (Rasburicase®). En cas de syndrome de lyse, des diurétiques et chélateurs de phosphate peuvent être ajoutés ; l'épuration extra rénale étant le dernier recours possible.¹⁷

En cas d'hémorragie, l'anémie et la thrombopénie sont corrigées en urgence par des transfusions de culots globulaires et de concentrés plaquettaires. En cas de CIVD, l'administration de plasma frais congelé est souvent nécessaire afin d'apporter les facteurs de la coagulation consommés.¹⁶ Dans tous les cas, le traitement étiologique doit être instauré le plus rapidement possible.

Le traitement symptomatique est utile tout au long de la prise en charge du patient afin de corriger les cytopénies, qu'elles soient liées à la maladie ou induites par la chimiothérapie. Des transfusions sanguines permettent de corriger les anémies et thrombopénies sévères. Concernant la neutropénie, une hospitalisation en secteur protégé et chambre isolée est mise en place et une prophylaxie fongique par des antifongiques azolés est instaurée. La présence d'une infection ou d'un sepsis requiert des prélèvements microbiologiques afin d'identifier le germe responsable, suivis d'une antibiothérapie à spectre large en attendant les résultats de l'antibiogramme.

b. Traitement étiologique

Le traitement étiologique varie selon la capacité des patients à recevoir une chimiothérapie intensive. Les recommandations préconisent de prendre en compte l'âge des patients, leurs comorbidités et leur état général (performance status), ainsi que le caractère secondaire de la LAM et le risque cytogénétique et moléculaire.¹⁸ Les LAM promyélocyaires suivent un schéma thérapeutique particulier devant la présence d'un traitement spécifique.

La stratégie thérapeutique actuellement préconisée est résumée figure 21.⁸¹ Les patients éligibles à un traitement intensif reçoivent un traitement d'induction par polychimiothérapie suivi d'un traitement de consolidation qui varie selon le risque de rechutes des patients. Les patients inéligibles à un traitement intensif peuvent être inclus dans des essais cliniques, traités par chimiothérapie à faible dose, par des agents hypométhylants ou seulement recevoir des soins supports.

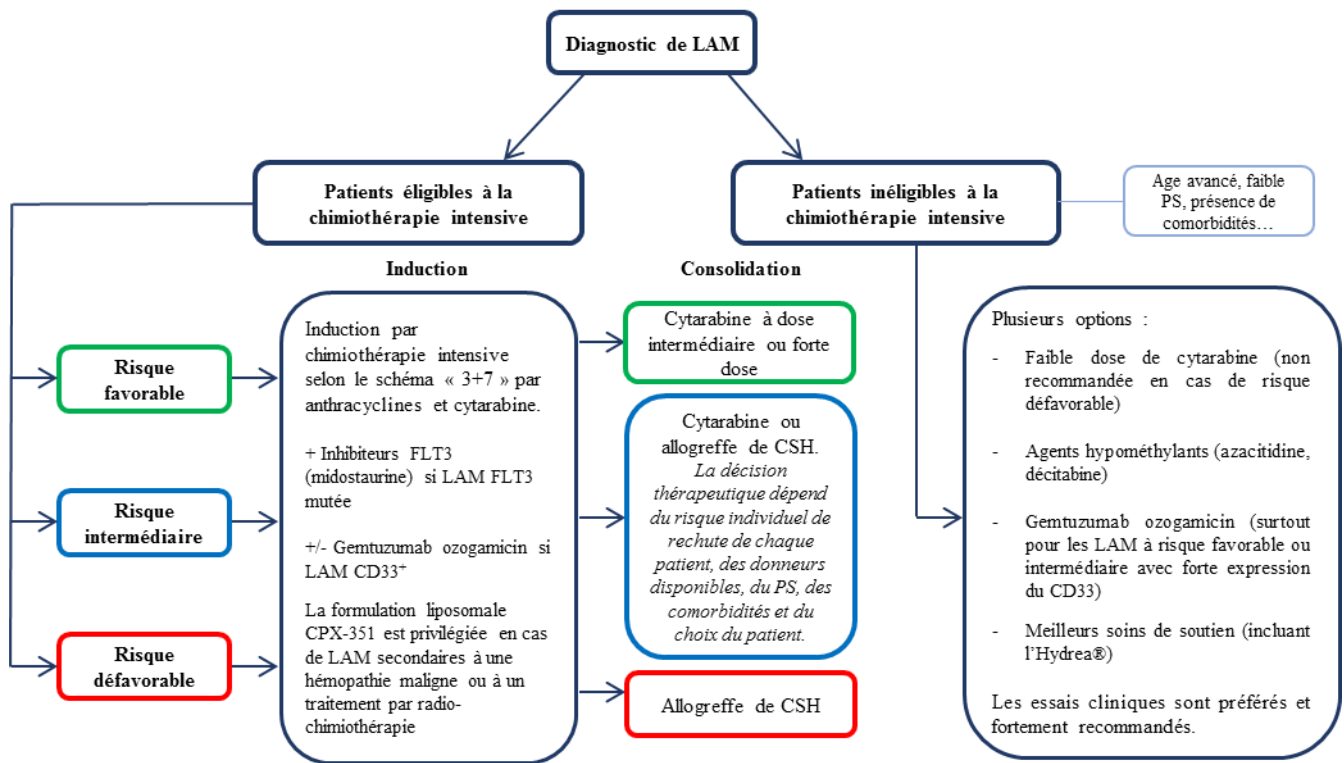


Figure 21 : Prise en charge des LAM.

D'après Short et al., *The Lancet*, 2017.⁸¹

✓ Cas particulier des LAM promyélocyaires

Dans les LAM3, la coagulopathie de consommation, relativement fréquente, est responsable d'hémorragies intracérébrales et pulmonaires, qui sont des complications mortelles. Des soins supports sont donc rapidement nécessaires pour contrer la CIVD afin de maintenir un taux de fibrinogène supérieur à 1-1,5 g/L et une numération plaquettaire supérieure à 30-50 G/L.

Devant la gravité de ces complications hémorragiques, le traitement spécifique par acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) doit être démarré dès que le diagnostic de LAM3 est suspecté, sans même attendre la confirmation génétique du diagnostic chez les patients présentant une LAM3 hyperleucocytaire (GB > 10 G/L). Ces recommandations se basent sur un rapport bénéfice/risque favorable. En effet, l'ATRA est supposé peu délétère chez les patients dont le diagnostic de LAM3 n'est finalement pas confirmé. En revanche, ce traitement permet d'améliorer considérablement les signes biologiques, et donc les conséquences cliniques, liés à la coagulopathie des LAM3.⁸²

D'après les recommandations ELN 2019,²⁷ le traitement d'induction dépend du risque pronostic de la LAM3. Ce risque est basé sur le taux de leucocytes dans le sang. Ainsi, les patients ayant une hyperleucocytose au diagnostic, à savoir un taux de leucocytes supérieur à 10 G/, sont considérés comme des patients à haut risque. Il existe deux schémas d'induction pour ces patients à haut risque : le premier associant de l'ATRA, du trioxyde d'arsenic (ATO) et de la chimiothérapie, le second associant un traitement conventionnel par ATRA à une anthracycline.

Le traitement d'induction recommandé chez les patients ne présentant pas un risque élevé, à savoir ceux ayant des leucocytes inférieurs à 10 G/L au diagnostic, repose sur l'administration concomitante d'ATRA et de trioxyde d'arsenic. L'association d'ATRA à une anthracycline étant proposée aux sujets présentant une contre-indication à l'utilisation d'ATO. Le traitement par ATRA doit être poursuivi jusqu'à l'obtention d'une rémission complète et d'une différenciation terminale des blastes. Ce traitement d'induction n'est pas modifié en fonction des caractéristiques moléculaires et phénotypique de la LAM.

Le traitement de consolidation dépend du schéma d'induction reçu. Ainsi, 4 cures d'ATO et 7 cures d'ATRA sont recommandées chez les patients n'ayant pas reçu de chimiothérapie conventionnelle. Pour les autres patients, 2 à 3 cycles d'anthracyclines sont recommandés en association avec l'ATRA, dont au moins un cycle de cytarabine à dose intermédiaire ou élevée chez les patients à haut risque de moins de 60 ans. Enfin, un traitement d'entretien par ATRA n'est pas utile chez les patients à faible risque.²⁷

L'instauration d'un traitement par ATRA et ATO entraîne un risque de développer un syndrome de différenciation, aussi connu sous le nom de syndrome à l'acide rétinoïque.⁸³ Ce traitement induit une différenciation des blastes qui entraîne une migration cellulaire et une activation endothéliale : la libération d'interleukines et de facteurs vasculaires sont ainsi responsables de lésions tissulaires. L'apparition de fièvre ou hypotension inexplicables, dyspnée, prise de poids, œdème périphérique, insuffisance rénale aiguë ou insuffisance cardiaque congestive sont des signes devant faire suspecter un syndrome de différenciation. Etant mortel, un traitement par dexaméthasone par voie intraveineuse doit immédiatement être instauré (à raison de 10 mg deux fois par jour) ; l'arrêt temporaire de l'ATRA ou de l'ATO n'étant indiqué qu'en cas de syndrome de différenciation sévère.²⁷

La prise en charge symptomatique des leucémies aiguës promyélocytaire reste similaire aux autres LAM, hormis en cas d'hyperleucocytose. En effet, la leucaphérèse n'est pas recommandée en raison du risque élevé de précipitation et de décès par hémorragie ; la chimiothérapie cytoréductrice devant être commencée le plus rapidement possible.

✓ Sujets éligibles à un traitement intensif

➤ Traitement d'induction

L'objectif du traitement d'induction est d'obtenir une rémission complète et de restaurer une hématopoïèse efficace. Malgré les progrès réalisés ces dernières années dans la prise en charge des patients atteints de LAM,⁴⁹ le schéma d'induction reste inchangé depuis des décennies. Ce traitement d'induction repose sur l'administration d'une polychimiothérapie intensive, basée sur l'utilisation d'anthracyclines (daunorubicine ou idarubicine) et d'un antimétabolite (la cytarabine).⁸⁴ L'administration se fait par voie intraveineuse selon un schéma « 3+7 », reposant sur l'administration concomitante d'anthracyclines et de cytarabine les 3 premiers jours, suivie de l'administration de cytarabine seule du 4^e au 7^e jour. Ce traitement d'induction permet d'obtenir une rémission complète chez 60 à 85% des patients âgés de moins de 60 ans.⁸⁵

Actuellement, des essais cliniques sont en cours afin d'évaluer la supériorité d'une anthracycline par rapport à l'autre et la posologie optimale. En France, les patients atteints de LAM non CBF âgés de moins de 60 ans sont actuellement inclus dans le protocole BIG-1 (*Backbone Inter-Group-1*). Cet essai compare l'efficacité de la daunorubicine forte dose (90 mg/m²/j) en schéma « 3+7 » à l'idarubicine (9 mg/m²/j) en schéma « 5+7 » en association à une perfusion IV continue de cytarabine (200 mg/m²/j). Les sujets âgés de plus de 65 ans peuvent être inclus dans l'essai clinique LAM-SA07 et bénéficier d'un protocole d'induction « 5+7 » par idarubicine (8 mg/m²/j) et cytarabine faible dose (100 mg/m²/j).

La midostaurine est un inhibiteur de kinase à cibles multiples, notamment actif contre FLT3, mutation présente dans environ 30% des LAM.³³ L'étude RATIFY a montré que l'addition de midostaurine à la chimiothérapie standard prolongeait significativement la survie globale des patients atteints de LAM ayant une mutation FLT3 (Figure 22). Ainsi, la médiane de survie globale du groupe de patients traités par midostaurine est de 74,7 mois comparée à 25,6 mois pour le groupe placebo.⁸⁶ Depuis, la midostaurine (Rydapt®) est commercialisée et indiquée dans le traitement des LAM nouvellement diagnostiquées avec mutation du gène FLT3, en association à la chimiothérapie standard d'induction.

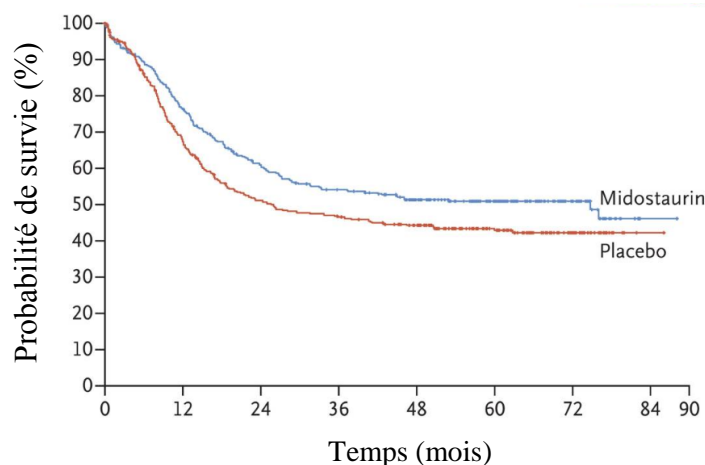


Figure 22 : La midostaurine améliore la survie globale des patients présentant une LAM FLT3 muté. D’après Stone *et al.*, *NEJM*, 2017.⁸⁶

Enfin, une formulation encapsulée liposomale de cytarabine et de daunorubicine (nommée CPX-351 ou Vyxeos liposomal®) permettant de préserver un rapport molaire de 5:1, est indiquée dans l’induction des LAM secondaires à un traitement et des LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies.⁸⁷

➤ Traitement de consolidation

Le traitement de consolidation ou post-rémission permet de prolonger la rémission complète obtenue après la chimiothérapie d’induction et d’éviter la survenue de rechutes. La phase de consolidation est séparée en deux groupes : certains patients sont traités uniquement par chimiothérapie alors que d’autres sont traités par chimiothérapie suivie d’une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

❖ Algorithme décisionnel

Un ensemble de critères doit être pris en compte pour choisir la stratégie thérapeutique optimale à adopter.¹⁸ La décision d’effectuer une allogreffe de CSH dépend de l’évaluation du rapport bénéfice/risque, c’est-à-dire de la mortalité non liée à la rechute en fonction de la morbidité et de la réduction du risque de rechute. Cette décision se base sur les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires de la LAM ainsi que sur la faisabilité de la greffe, dépendant des caractéristiques du patient (âge, comorbidités, performance status) et de la présence ou non d’un donneur HLA compatible.

L'allogreffe est un traitement lourd responsable d'une morbi-mortalité liée à la transplantation non négligeable. Ce risque est accepté lorsque l'incidence de rechute attendue est supérieure à 35% ou 40%. Ainsi, l'allogreffe est systématiquement recommandée chez les patients à risque défavorable ; leur risque de rechute étant proche de 70 à 90%.⁸⁸ En revanche, le traitement par allogreffe n'est pas retenue chez les patients à risque favorable.^{18,53,88} Chez ces patients, l'indication à l'allogreffe est réévaluée devant la présence d'une maladie résiduelle trop élevée après la première cure de consolidation (nommée MRD2). En effet, une décroissance de la MRD2 inférieure à 3 log par rapport au diagnostic (ou inférieure à 4 log en cas de mutation *NPM1*) est un facteur de risque de rechute : dans ce cas, l'allogreffe est indiquée.^{60,89} Le groupe à risque intermédiaire étant très hétérogène, il n'existe pas de recommandation précise. Pour ces patients pris en charge à l'institut Paoli-Calmettes, un traitement par allogreffe est systématiquement discuté en réunion de concertation pluridisciplinaire.

❖ Chimiothérapie

Débutée après l'obtention d'une rémission complète, la phase de consolidation correspond à l'administration de plusieurs cures de cytarabine. Actuellement, il n'existe pas de consensus quant au nombre de cures nécessaires. Habituellement, les patients reçoivent entre 2 et 4 cures de chimiothérapie. La dose de cytarabine est elle aussi discutée. L'étude AML15 du *Medical Research Council* n'a montré aucun bénéfice en termes de survie à l'utilisation de fortes doses de cytarabine comparé à des doses intermédiaires de cytarabine.⁹⁰

L'essai prospectif BIG-1 randomise également les patients en deux groupes afin de confirmer ces résultats : cytarabine forte dose (à 3000 mg/m²) et cytarabine à dose intermédiaire (à 1500 mg/m²), à raison de trois doses par cycle (au 1^{er}, 3^e et 5^e jour du cycle). Dans ce protocole, trois cures de consolidation sont effectuées chez les patients dont l'indication d'allogreffe n'est pas retenue. Du G-CSF (*Granulocyte Colony-Stimulating Factor*) est administré aux patients à partir du 8^e jour jusqu'à la sortie d'aplasie (c'est-à-dire lorsque le taux de polynucléaires neutrophiles dépasse 1 G/L).

❖ Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques

L'allogreffe est un procédé d'immunothérapie cellulaire. Des cellules souches hématopoïétiques issues d'un donneur sain sont injectées au receveur afin de reconstituer son hématopoïèse et d'obtenir un effet immun anti-leucémique. L'efficacité de la greffe allogénique repose principalement sur l'effet du conditionnement, permettant de réduire le nombre de cellules leucémiques, et sur l'action anti-tumorale médiée par les cellules immunes du donneur, appelé effet GVL (*graft versus leukemia*).

Depuis la première transplantation de moelle osseuse réalisée chez l'homme en 1957,⁹¹ le nombre de patients atteints de LAM recevant une allogreffe de CSH n'a cessé d'augmenter, faisant de la LAM la première indication de greffe allogénique.⁹² Grâce aux progrès thérapeutiques réalisés, la mortalité liée au traitement a diminué et les taux de survie se sont améliorés. Chez les patients à risque élevé de rechutes, l'allogreffe est la seule option thérapeutique curative, permettant d'augmenter leur taux de survie globale et sans rechute.

D'abord réservée aux sujets âgés de moins de 60 ans, l'indication d'allogreffe s'est étendue aux sujets plus âgés notamment grâce au développement des conditionnements à intensité réduite. En 2011, Farag et al. ont démontré la supériorité de l'allogreffe chez les sujets âgés de 60 à 70 ans par rapport à la chimiothérapie seule, en termes de survie sans leucémie (32% *versus* 15%, respectivement) et du risque de rechutes (32% *versus* 81%, respectivement).⁹³ La faisabilité d'une allogreffe chez ces patients reste tout de même délicate devant l'incidence plus élevée de comorbidités, d'altération de l'état général et de polymédication. Plusieurs scores existent, dont le HCT-CI, afin d'optimiser la prise de décision sur les sujets aptes à recevoir une greffe allogénique.^{78,79,94}

La faisabilité d'une greffe allogénique dépend principalement de la présence d'un donneur compatible. Cette compatibilité génétique entre le donneur et le receveur se base sur le système HLA (*Human Leukocyte Antigen*). Il existe trois types de donneurs : les donneurs apparentés géno-identique (retrouvés dans la fratrie), les donneurs non apparentés phéno-identique (donneur volontaire sain inscrit sur un registre et ayant une compatibilité HLA 10 sur 10) et les donneurs dits « alternatifs » (ayant une compatibilité HLA partielle) regroupant les donneurs non apparentés « *mismatch* » et les donneurs apparentés haplo-identiques. Ces dernières années, le développement de greffes haplo-identiques a permis d'augmenter

considérablement le nombre d'allogreffes réalisées chez les patients n'ayant pas de donneurs HLA compatibles. Les donneurs haplo-identiques étant semi-compatibles (compatibilité HLA 5 sur 10), les parents et enfants deviennent des donneurs potentiels.

Les cellules souches hématopoïétiques, issues du donneur, peuvent être récoltées à partir de la moelle osseuse, du sang périphérique ou du sang placentaire. La majorité des allogreffes réalisées aujourd'hui sont issues de cellules souches périphériques obtenues par cytophérèse après injection sous-cutanée pendant 4 à 5 jours d'un facteur de croissance hématopoïétique, le G-CSF, chez le donneur.

Avant l'injection de ces cellules souches, le receveur reçoit un conditionnement possédant à la fois un pouvoir myéloablatif (permettant une cytoréduction des cellules leucémiques et de son système hématopoïétique) et un pouvoir immunosuppresseur (permettant la prise de greffe et d'éviter le rejet).

Il existe plusieurs types de conditionnement : les conditionnements myéloablatifs, d'intensité réduite et non myéloablatifs. L'action anti-leucémique des conditionnements à intensité réduite repose principalement sur la réaction immunologique du greffon contre la leucémie : l'effet GVL. Ces conditionnements ont été développés afin d'étendre l'indication d'allogreffe aux patients ne pouvant pas tolérer la toxicité accrue des conditionnements myéloablatifs, à savoir les sujets âgés ou présentant d'importantes comorbidités. De nombreuses études ont comparé l'efficacité de ces deux types de conditionnements, notamment l'essai clinique randomisé de phase III, mené par le BMT CTN (*Blood and Marrow Transplant Clinical Trials Network*) chez des sujets âgés de moins de 65 ans atteints de LAM et SMD, qui a mis en évidence des différences majeures. En effet, les patients ayant reçu un conditionnement à intensité réduite ont une incidence de rechutes significativement plus élevée (48,3% *versus* 13,5%) avec une survie sans rechute significativement plus courte (47,3% *versus* 67,8%) comparé aux patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif, respectivement.⁹⁵ Bien que la mortalité liée au traitement soit plus élevée chez les patients ayant reçu un conditionnement myéloablatif, ce dernier est recommandé comme standard chez les sujets jeunes, âgés moins de 45 ans, ne présentant pas de comorbidités.⁹⁶ L'âge et la présence de comorbidités sont les deux principaux critères permettant d'orienter le type de conditionnement. Ainsi, les recommandations ELN 2017 préconisent l'utilisation des conditionnements myéloablatifs chez les sujets jeunes ; les conditionnements à intensité réduite étant réservés aux sujets âgés et aux sujets jeunes présentant des comorbidités sévères.

Traditionnellement, le conditionnement myéloablatif était composé de cyclophosphamide et d'une dose élevée d'irradiation corporelle totale. Compte tenu du risque de cancers secondaires, l'irradiation est progressivement remplacée par du busulfan. Dans l'essai clinique BIG-1, actuellement en cours à l'IPC, le conditionnement myéloablatif se compose de busulfan quatre jours (voie IV, 3,2 mg/kg/jour) suivi de cyclophosphamide deux jours (voie IV, 60 mg/kg/jour). Du sérum anti-lymphocytaire est ajouté en cas de greffe phéno-identique pour limiter le risque de rejet. Le conditionnement à intensité réduite est quant à lui composé de fludarabine cinq jours (voie IV, 30 mg/m²), de busulfan deux jours (voie IV, 3,2 mg/kg/jour) et de sérum anti-lymphocytaire deux jours (voie IV, 2,5 mg/kg).

Le choix du conditionnement est donc un facteur très important, notamment devant les complications graves qu'il peut engendrer. Il peut notamment être responsable d'une microangiopathie thrombotique et d'une toxicité hépatique, appelée maladie veino-occlusive. Cette complication précoce, causée par l'accumulation de métabolites hépatotoxiques, peut être très sévère et conduire au décès du patient après défaillance multi-viscérale. L'intensité du conditionnement fait aussi partie des facteurs de risque de survenue d'une réaction du greffon contre l'hôte (GVH). La GVH est une complication immunologique majeure de la greffe, secondaire à une alloréactivité entre les lymphocytes du donneur et les cellules présentatrices d'antigène du receveur. Il existe deux types de GVH : la GVH aigüe, survenant dans les 100 jours post-greffe, responsable d'une mortalité précoce, et la GVH chronique, survenant après ce délai de 100 jours, responsable d'une morbidité à long terme. L'allogreffe est donc un traitement lourd, responsable d'un nombre important de complications infectieuses (bactériennes, virales, fongiques et parasitaires) mais aussi de complications à long terme, physiques et psychiques, avec un risque augmenté de cancers solides secondaires.

✓ Réponse au traitement

En 2015, Döhner et al. définissent un ensemble de facteurs influençant la réponse à l'allogreffe de CSH (Tableau 6).⁸⁵

Tableau 6 : Facteurs influençant la réponse à l'allogreffe de CSH.

D'après *Döhner et al, NEJM, 2015.*⁸⁵

Statut de la maladie
<ul style="list-style-type: none">▪ La première rémission complète est optimale (plus de rechutes ont été observées après l'allogreffe chez les patients présentant une RC tardive, un échec de la première induction ou une rechute).▪ Présence d'un risque accru de rechute en cas d'un long délai depuis la RC ou de première rechute dans les 12 mois
Maladie résiduelle persistante
<ul style="list-style-type: none">▪ Risque accru de rechute lorsque la MRD est positive avant l'allogreffe ; l'amélioration de la survie par un traitement supplémentaire pour réduire la MRD est incertaine étant donné qu'une MRD positive peut indiquer une LAM résistante.
Facteurs génétiques à haut risque
<ul style="list-style-type: none">▪ Risque accru de rechute pour les LAM présentant des anomalies cytogénétiques ou moléculaires de haut risque.▪ Le risque de rechute peut être maîtrisé par l'allogreffe dans certains groupes, cependant la présence d'anomalies à haut risque entraîne toujours des taux de rechute plus élevés après l'allogreffe.
Âge et performance status
<ul style="list-style-type: none">▪ Effet modeste de l'âge sur la mortalité liée au traitement chez certains patients.▪ Le performance status ou le score HCT-CI prédisent la mortalité liée au traitement.▪ Risque plus faible de rechute avec traitement par allogreffe de CSH, cependant les résultats publiés d'études impliquant des patients âgés atteints de LAM sont limités et sélectionnés.▪ Les indices de gériatrie ou de fragilité peuvent aider à identifier des candidats pour l'allogreffe.▪ Malgré des indications claires, trop peu de patients âgés atteints de LAM subissent une allogreffe.
Régime de conditionnement à intensité réduite
<ul style="list-style-type: none">▪ Il convient aux patients plus âgés ou plus ayant des comorbidités majeures▪ Les taux de mortalité précoce liée au traitement sont plus faibles avec ce type de conditionnement, mais les taux de mortalité tardive liée au traitement (GVH aiguë ou chronique) sont similaires à ceux retrouvés par les conditionnements standards.▪ Augmentation du risque de rechute avec les conditionnements à intensité réduite▪ Les conditionnements myéloablatifs et à intensité réduite entraînent des survies similaires chez les patients âgés et ceux présentant des comorbidités.
Type de greffon et effet GVL
<ul style="list-style-type: none">▪ Risque accru de GVH (particulièrement chronique) en utilisant des cellules souches périphériques mobilisées par du filgrastim (Neupogen®).▪ L'effet GVL est similaire après allogreffe réalisée à partir d'un donneur non apparenté ou issu de la fratrie.▪ La greffe de CSH à partir de sang de cordon ombilical entraîne une mortalité liée au traitement plus élevée mais permet d'obtenir un effet GVL puissant.▪ La présence d'une GVH aiguë et/ou chronique est associée à un risque de rechute plus faible.
Ajout de traitements anti leucémiques (à l'étude)
<ul style="list-style-type: none">▪ La réactivation du cytomégalovirus est associée à une activité anti leucémique immunitaire.▪ Traitement d'entretien post-transplantation▪ Infusions de lymphocytes du donneur : traitement préventif ou thérapeutique en cas de persistance d'une MRD positive ou de rechute▪ Anticorps, vaccins anti leucémiques...

Les critères de réponse au traitement dans la LAM, initialement décrits par Cheson et al. en 1990⁹⁷ et révisés en 2003⁹⁸ ont été réactualisés par l'ELN en 2017¹⁸ afin d'y intégrer la notion de maladie résiduelle et d'harmoniser les définitions pour les essais cliniques.

Selon les recommandations 2017 de l'ELN, un patient répond au traitement lorsqu'il obtient une rémission complète, une rémission complète avec maladie résiduelle négative, une rémission complète avec récupération hématologique incomplète ou une rémission partielle. Un patient est considéré en échec de traitement lorsque sa maladie est stable, en progression ou réfractaire primaire.

Une rémission complète (RC) est définie par l'absence de maladie extra-médullaire, de blastes circulants et de blastes contenant des corps d'Auer, un compte cellulaire médullaire retrouvant un pourcentage de blastes inférieur à 5% ainsi qu'une amélioration des cytopénies sanguines périphériques, avec un taux de plaquettes supérieur à 100 G/L et un taux de PNN dépassant 1 G/L.

Une rémission complète avec maladie résiduelle négative (RC_{MRD}-) correspond aux critères de la rémission complète avec négativation du transcrit moléculaire spécifique en biologie moléculaire ou absence de détection en cytométrie en flux de la combinaison d'antigènes spécifiquement retrouvée à la surface des cellules leucémiques au diagnostic.

Une rémission complète avec récupération hématologique incomplète (RCi) correspond aux critères de la RC à l'exception d'une thrombopénie ou neutropénie résiduelle (définie par des plaquettes < 100 G/L ou des PNN < 1 G/L, respectivement).

Une rémission partielle (RP) correspond aux critères de la RC à l'exception du compte cellulaire médullaire retrouvant un pourcentage de blastes compris entre 5 et 25%. Une rémission partielle est définie par une diminution d'au moins 50% du pourcentage de blastes médullaires par rapport au diagnostic.

La maladie réfractaire primaire se définit par l'absence de rémission complète ou de RCi après deux cures de traitement d'induction intensif.

Les rechutes peuvent être cytologiques ou moléculaires. La rechute cytologique survient après l'obtention d'une rémission complète (RC, RC_{MRD}- ou RCi) lors de l'apparition d'une blastose sanguine, du développement d'une maladie extra-médullaire ou d'une élévation du pourcentage de blastes médullaires supérieure ou égale à 5%. La rechute moléculaire, survenant après l'obtention d'une RC_{MRD}-, est uniquement objectivée devant la positivité de la maladie résiduelle en biologie moléculaire ou immunophénotypage.

5. Suivi des patients

Le suivi des patients démarre dès l'initiation d'un traitement et se prolonge cinq ans après l'obtention de la rémission complète. Passé ce délai, les patients sont considérés comme guéri de leur maladie.

Selon la Haute Autorité de Santé (HAS),⁹⁹ le suivi des patients atteints de LAM permet de veiller à leur qualité de vie, de rechercher l'apparition d'une éventuelle rechute, de détecter des effets indésirables tardifs liés au traitement, de prévenir ou détecter précocement l'apparition d'un cancer solide secondaire, d'organiser les soins de support nécessaires et enfin, de permettre un accompagnement social et psychologique ainsi qu'une aide à la réinsertion professionnelle.

Ce suivi est effectué par l'équipe référente du traitement dans un centre hématologique spécialisé, en alternance avec le médecin généraliste. Il repose sur un examen clinique et biologique. L'examen clinique est réalisé à un mois, puis tous les deux à trois mois la première année, puis tous les six mois. Il permet de surveiller l'apparition d'effets indésirables provoqués par la chimiothérapie, notamment les atteintes cardiaques provoquées par les anthracyclines, l'apparition d'une fibrose pulmonaire ou d'une artériosclérose prématurée et les troubles de la fertilité. Il s'accompagne donc d'examens paracliniques comme la réalisation d'une échographie cardiaque tous les trois à cinq ans, d'une exploration fonctionnelle respiratoire en cas de dyspnée, d'un bilan biologique permettant l'évaluation du risque cardio-vasculaire, d'un spermogramme chez l'homme un an après la fin de la chimiothérapie et d'un bilan de ménopause précoce chez la femme. Le suivi des patients ayant reçu une allogreffe de CSH comprend de nombreux autres examens complémentaires afin de rechercher des complications liées à la maladie du greffon contre l'hôte (atteinte cutanée, oculaire, pulmonaire, osseuse, thyroïdienne...). Ce suivi est effectué par l'équipe spécialisée ayant réalisée cette greffe allogénique.

Le suivi biologique comprend la réalisation d'un hémogramme tous les un à trois mois les deux premières années puis tous les trois à six mois les années suivantes. La réalisation d'un myélogramme est nécessaire après la phase d'induction afin d'évaluer la réponse au traitement puis uniquement en cas d'apparition d'anomalies sur l'hémogramme. Enfin, l'évaluation de la maladie résiduelle est conseillée tous les trois mois pendant deux ans.¹⁸

a. Maladie résiduelle

Le suivi est important tout au long de la prise en charge des patients afin d'identifier précocement les patients réfractaires ou à risque élevé de rechutes, et d'adapter la stratégie thérapeutique à adopter. L'évaluation de la maladie résiduelle reste la méthode la plus sensible pour évaluer le risque de rechutes. Mais la diversité des méthodes et des tests utilisés pour la mesurer ainsi que l'effet néfaste de la qualité de l'échantillon sont autant d'obstacles empêchant la standardisation de cette évaluation.

La maladie résiduelle est mesurée par deux méthodes couramment utilisées : l'immunophénotypage (par cytométrie en flux multiparamétrique) et la biologie moléculaire (par RT-qPCR en temps réel). Les sensibilités obtenues par ces techniques, de l'ordre de 10^{-4} et 10^{-5} respectivement, sont largement supérieures à celle obtenue par une analyse cytologique ou cytogénétique.

L'évaluation de la maladie résiduelle par biologie moléculaire est réalisable chez un nombre restreint de patients : les patients atteints de LAM CBF, de LA promyélocytaire ou de LAM présentant une mutation *NPM1* au diagnostic. Ainsi, un transcrite de fusion spécifique peut être quantifié par RT-qPCR :

- *RUNX1-RUNX1T1* pour les LAM2 à translocation t(8;21)
- *CBFB-MYH11* type A, B et D pour les LAM4 à différenciation éosinophile
- *PML-RAR α* type BCR1, 2 et 3 pour les LAM3 ou promyélocytaires.

L'évaluation de la maladie résiduelle par immunophénotypage n'est pas restreinte à un type de LAM. L'analyse de la MRD par cytométrie en flux repose notamment sur le principe que les cellules leucémiques expriment au diagnostic une combinaison unique et spécifique d'antigènes, appelée LAIP (profil phénotypique associé aux leucémies), permettant de les différencier des progéniteurs et précurseurs myéloïdes physiologiques. La présence de blastes exprimant des marqueurs aberrants au diagnostic facilite donc le suivi de la maladie résiduelle par cytométrie en flux. Il est tout de même important de noter qu'une modification des LAIP est observée dans 70% des rechutes.¹⁰⁰ L'évaluation de la maladie résiduelle par immunophénotypage nécessite donc une expertise et des compétences spécifiques dans ce domaine afin d'interpréter correctement les résultats obtenus.

Les recommandations ELN 2018 préconisent l'utilisation d'un cytomètre en flux multiparamétrique (8 couleurs minimum). Un panel d'anticorps est conseillé, permettant d'étudier en plus des caractéristiques de taille et granularité, les antigènes de surface CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117 et HLA-DR. Pour les LAM monocytaires, un tube supplémentaire peut être ajouté contenant les marqueurs CD64, CD11b, CD14, CD4, CD34, HLA-DR, CD33 et CD45.¹⁰¹ Afin de séparer les patients en deux groupes « MRD négatif » et « MRD positif », un seuil de 0,1% est recommandé.

II. Les cellules Natural Killer (NK)

1. Généralités

Les cellules Natural Killer (NK) ont été identifiées par Kiessling et al. dans les années 1970. Leur capacité à lyser spontanément des cellules tumorales a été rapportée pour la première fois chez la souris.¹⁰² Chez l'Homme, les cellules NK ont d'abord été décrites comme de grands lymphocytes granuleux devant la présence d'inclusions cytoplasmiques en microscopie optique. Ces granulations correspondant aux molécules granzymes et perforine, responsable de la cytotoxicité.

Les cellules NK se développent dans la moelle osseuse. Elles appartiennent à la famille des lymphocytes puisqu'elles dérivent d'un progéniteur lymphoïde commun capable de se différencier en lymphocytes T, B ou NK. A la différence des lymphocytes T et B, les cellules NK ne possèdent pas de récepteur à l'antigène à leur surface, TCR ou BCR, respectivement.¹⁰³

Plus récemment, les cellules NK ont été regroupées parmi les « cellules lymphoïdes innées » (ILC) qui sont des effecteurs de la réponse immunitaire primaire. Les ILC ont une morphologie lymphoïde classique. Elles ne possèdent pas de marqueurs spécifiques de surface permettant de les distinguer des autres cellules immunes. Les ILC ont des capacités à produire des cytokines. Elles expriment donc à leur surface des récepteurs aux cytokines, notamment les sous-unités α des récepteurs à l'interleukine 2 et 7, nommés CD25 et CD127, respectivement.¹⁰⁴ Les ILC ont été séparées en trois groupes, définis notamment sur leur capacité sécrétrice. Ainsi, les cellules NK ont été classées dans le groupe 1 des ILC notamment par leur capacité à sécréter de l'interféron gamma (IFN γ). Parmi ces ILC1, les cellules NK appartiennent au sous-groupe cytotoxique qui les différencient des ILC auxiliaires.¹⁰⁵

2. Définition

Les cellules NK sont des acteurs majeurs du système immunitaire inné, qui participent à la défense antivirale et anti-tumorale de l'organisme, par leur capacité à reconnaître et lyser les cellules transformées. Leur nom, « Natural Killer », reflète leur cytotoxicité naturelle, c'est-à-dire leur capacité à lyser les cellules cibles sans immunisation préalable. Les cellules NK permettent aussi d'amplifier la réponse immunitaire en recrutant et activant d'autres cellules effectrices par la sécrétion de cytokines et chimiokines.

3. Phénotype

Les cellules NK appartiennent aux leucocytes sanguins : elles expriment donc le marqueur pan-leucocytaire CD45. Elles représentent 5 à 15% des lymphocytes du sang circulant. Phénotypiquement, elles se distinguent des lymphocytes T et B par l'absence d'expression de leurs marqueurs spécifiques de lignée. En effet, les lymphocytes T et B expriment les antigènes CD3 et CD19 à leur surface, respectivement, contrairement aux lymphocytes NK.

Les cellules NK se définissent par l'absence du complexe TCR/CD3 et par l'expression d'une isoforme de la molécule d'adhérence neuronale NCAM (*neural cell adhesion molecule*) ou CD56. Elles sont donc de phénotype CD3⁻CD56⁺ (Figure 23). La majorité des cellules NK expriment aussi le marqueur CD16, correspondant au récepteur de faible affinité des immunoglobulines.

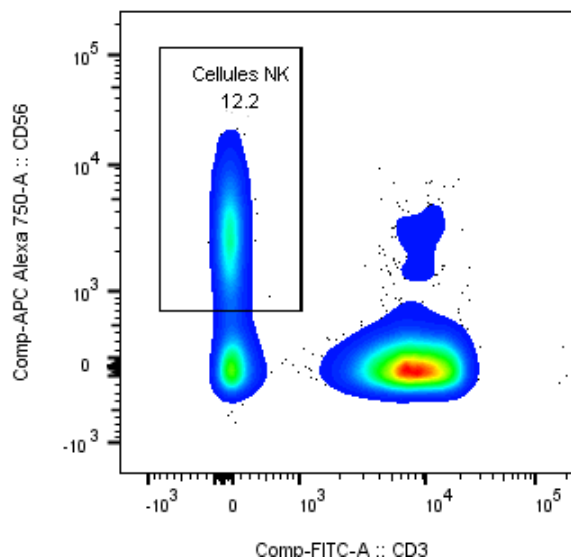


Figure 23 : Fenêtrage manuel des cellules NK circulantes par cytométrie en flux.

Les cellules NK sont de phénotype CD3⁻CD56⁺.

(dot plot issu du laboratoire immunologie des tumeurs, logiciel FlowJo®).

4. Maturation des cellules NK

Classiquement, les cellules NK circulantes sont séparées en deux groupes de maturation selon l'intensité d'expression du marqueur CD56 : les cellules NK CD56^{bright}, ayant une forte expression, et les cellules NK CD56^{dim}, ayant une expression plus faible. Ces deux sous-groupes possèdent des propriétés fonctionnelles distinctes : les cellules NK CD56^{bright} ont une capacité proliférative importante et produisent une quantité importante de cytokines, tandis que les cellules NK CD56^{dim} possèdent une forte cytotoxicité naturelle.¹⁰⁶

Les cellules NK CD56^{bright} sont minoritaires dans le sang. En effet, elles représentent moins de 10% des cellules NK circulantes. Leur rôle est cependant primordial étant donné qu'elles maintiennent l'homéostasie des cellules NK. La demi-vie des cellules NK étant de 7 à 10 jours, un renouvellement constant est nécessaire. Ainsi, en présence d'IL2, les cellules NK CD56^{bright} renouvellent le pool cellulaire.

Cependant, l'état de maturation des cellules NK circulantes ne peut se restreindre à ces deux sous-ensembles. Parmi les cellules NK CD56^{dim}, plusieurs sous-populations peuvent être définies. Au cours de leur différenciation et maturation, les cellules NK CD56^{dim} vont progressivement perdre l'expression du marqueur NKG2A (*Natural Killer Group 2*) et acquérir, de façon séquentielle, les marqueurs KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*), CD57 puis NKG2C (Figure 24).¹⁰⁷

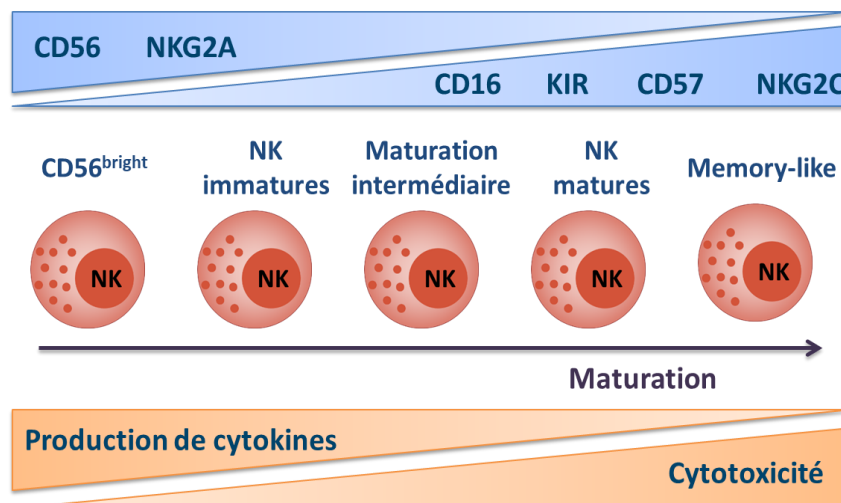


Figure 24 : Maturation des cellules NK.

Le processus de maturation des cellules NK s'établit selon la baisse d'expression de CD56 et NKG2A et l'acquisition des marqueurs CD16, KIR, CD57 puis NKG2C. Les fonctions effectrices des cellules NK diffèrent selon leur état de maturation : les cellules NK CD56^{bright}, ayant des capacités prolifératives élevées, jouent un rôle immunorégulateur par la sécrétion de cytokines alors que les cellules NK CD56^{dim} sont fortement cytotoxiques.

Acquis à des stades tardifs de maturation, le marqueur CD57 définit un sous-groupe de cellules NK possédant un fort potentiel cytotoxique et de faibles capacités prolifératives.¹⁰⁸

Les cellules NK NKG2C positives, co-exprimant le marqueur CD57, définissent une nouvelle sous-population cellulaire : les « cellules NK memory-like ». Il a été montré, chez l'Homme, que ces cellules NK memory-like étaient maintenues à long terme chez les patients ayant déjà été infectés par le cytomégalovirus.¹⁰⁹ De plus, lors d'une réinfection, cette population cellulaire prolifère. La découverte de la mémoire immunologique complexifie donc la biologie des cellules NK, cette notion ayant longtemps été réservée à l'immunité adaptative.¹¹⁰

5. Fonctions des cellules NK

a. Education et activation

Les cellules NK jouent un rôle majeur au sein du système immunitaire. Grâce à leur cytotoxicité naturelle et leurs fonctions régulatrices par sécrétion de cytokines, les cellules NK participent activement à la défense anti-infectieuse et anti-tumorale de l'organisme. Afin d'exercer leurs différentes fonctions effectrices, les cellules NK doivent dans un premier temps être éduquées, afin de reconnaître les cellules du soi des cellules du non soi, puis être activées.

L'éducation des cellules NK leur permet d'acquérir une tolérance envers les cellules du soi afin d'éviter une auto-réactivité et de reconnaître les cellules malignes afin d'exercer leurs fonctions effectrices. Cette éducation passe notamment par la régulation de l'expression des récepteurs inhibiteurs à la surface des cellules NK. Ces récepteurs inhibiteurs, comme les récepteurs KIR, reconnaissent les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I, présentes à la surface des cellules du soi. Cette éducation permet donc aux cellules NK de lyser les cellules ayant perdu les molécules CMH de classe I (sur les cellules pathogènes) tout en épargnant les cellules du soi exprimant les molécules CMH de classe I. Il a ainsi été montré que les cellules NK exprimant faiblement les récepteurs KIR à leur surface étaient hypo-réactives, tout comme les cellules NK évoluant dans un environnement dépourvu de molécules CMH classe I.¹¹¹

Afin de développer entièrement leurs capacités effectrices, une activation préalable des cellules NK est indispensable. Différentes cytokines interviennent dans l'activation des cellules NK, notamment l'IL15, qui contribue à la maintenance et à la prolifération des cellules NK.¹¹² L'acquisition des récepteurs aux cytokines représente une étape importante dans le processus de différenciation des cellules NK.¹¹³

b. Régulation : balance des signaux activateurs et inhibiteurs

Le fonctionnement des cellules NK est contrôlé par une large gamme de récepteurs exprimés à leur surface : les récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs, les récepteurs aux cytokines et chimiokines et les molécules d'adhésion.

Leur activité cytolytique est régulée par une balance entre des signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par les cellules cibles.¹¹⁴ Ce mécanisme permet de préserver les cellules saines de l'organisme. En effet, les cellules du soi délivrent un signal inhibiteur via les molécules de CMH de classe I du soi (HLA-A/B/C et HLA-E). Ces molécules sont alors reconnues par les récepteurs inhibiteurs des cellules NK (les récepteurs KIR et l'hétérodimère CD94/NKG2A, respectivement).

Les cellules tumorales ou infectées par des pathogènes présentent une altération de leurs ligands de surface permettant aux cellules NK de les différencier des cellules saines de l'organisme. Ces cellules peuvent présenter une perte ou une diminution de l'expression des molécules CMH classe I et/ou augmentation des ligands induits par le stress. Ces modifications délivrent un signal activateur prépondérant qui est reconnu par les récepteurs activateurs présents à la surface des cellules NK. Les cellules NK peuvent ainsi lyser leur cible (Figure 25).

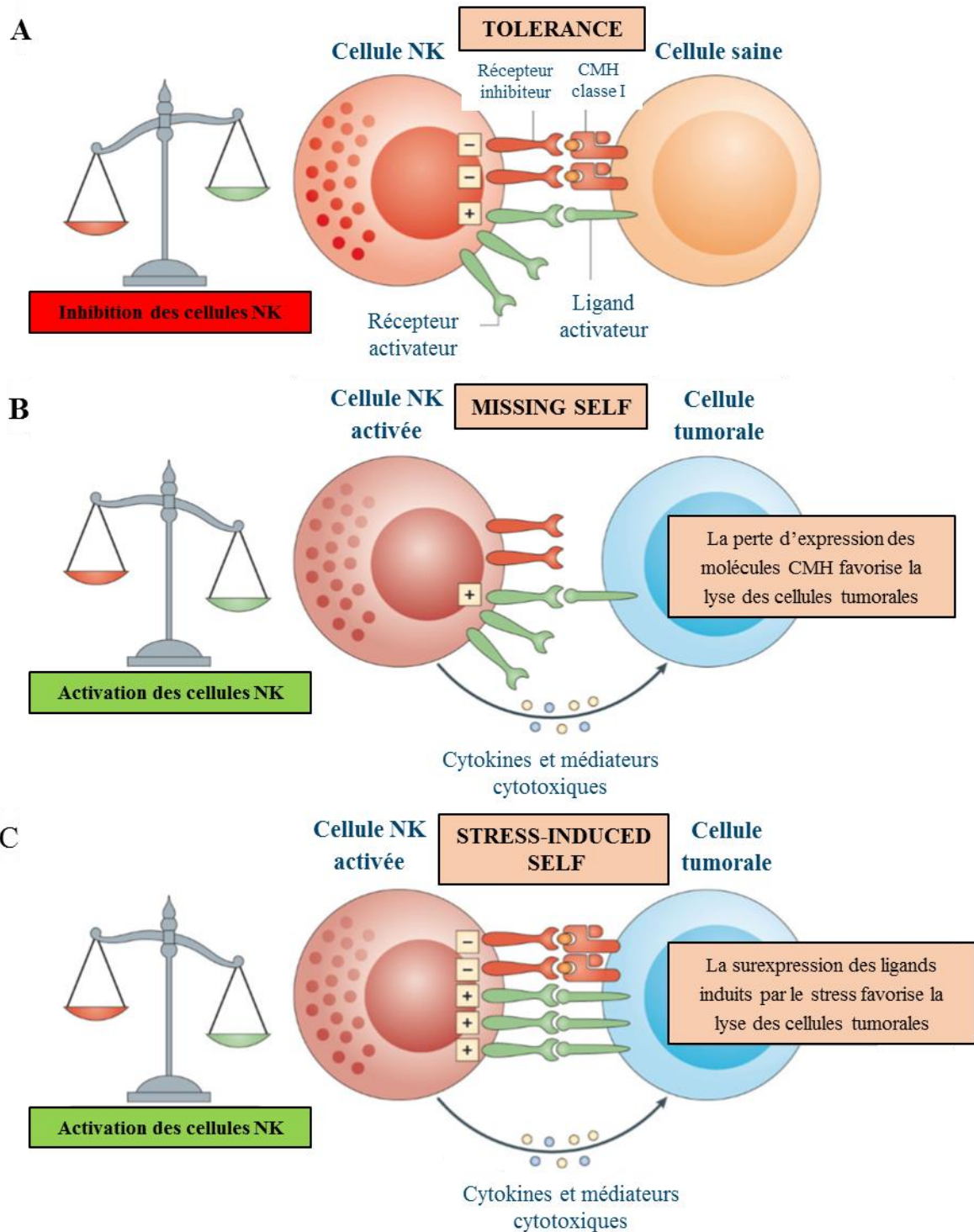


Figure 25 : Reconnaissance des cellules tumorales par les cellules NK.

D'après Vivier et al., *Nature Rev Immunol*, 2012

- (A) Les cellules NK sont tolérantes aux cellules du soi devant un excès de signal inhibiteur.
- (B) Le signal activateur est prépondérant devant la diminution de l'expression des molécules CMH classe I.
- (C) Le signal activateur est prépondérant devant la surexpression de ligands induits par le stress.
- (B) et (C) L'activation des cellules NK conduit à l'élimination tumorale de façon directe par cytotoxicité ou indirecte par production de cytokines telles que l'IFN- γ .

c. Fonctions effectrices et immuno-régulatrices

✓ Cytotoxicité

Après intégration des différents signaux activateurs et inhibiteurs présents sur les cellules rencontrées, les cellules NK peuvent exercer leurs différentes fonctions effectrices. Elles sont dotées de cytotoxicité pouvant s'exercer par divers mécanismes : la dégranulation par exocytose de granules lytiques ou l'interaction avec les récepteurs de morts à la surface des cellules cibles.

La libération des granules lytiques peut survenir avec un contact direct ou indirect des cellules NK avec leur cellule cible. Le contact direct, appelé cytotoxicité naturelle, résulte de l'intégration des différents signaux activateurs et inhibiteurs vus précédemment. Le contact indirect nécessite une opsonisation préalable des cellules cibles par des immunoglobulines (Ig). Après reconnaissance du fragment constant (Fc) des Ig par le récepteur CD16, récepteur de faible affinité du fragment constant Fc des Ig, les cellules sont lysées par un mécanisme d'ADCC (cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps).

L'ADCC et la cytotoxicité naturelle dépendent de la libération par exocytose des granules cytoplasmiques, contenant de la perforine et des granzymes. Lors du contact des lymphocytes NK avec leur cible cellulaire, un réarrangement membranaire a lieu pour créer une synapse immunologique (Figure 26).¹¹⁵ Le cytosquelette d'actine ainsi que les microtubules sont réorganisés pour orienter les granules lytiques vers cette synapse formée avec la cellule cible. La perforine va créer des pores dans la membrane plasmique permettant la libération des granzymes à l'intérieur de la cellule cible. Les granzymes sont des enzymes qui vont induire l'apoptose de leur cible par divers mécanismes, notamment des mécanismes caspases-dépendants.¹¹⁶

Enfin, les cellules NK peuvent lyser leurs cellules cibles par interaction avec des récepteurs de mort. Ces derniers sont des récepteurs cellulaires capables d'induire la mort de leur propre cellule lorsqu'ils sont activés par leurs ligands correspondants. Ces ligands sont exprimés par diverses cellules immunes, notamment les cellules NK. L'expression de ces ligands à la surface des cellules NK peut être constitutive ou induite après stimulation par des cytokines. De plus, la sécrétion d'IFN γ par les cellules NK peut induire l'expression d'un récepteur de mort à la surface des cellules tumorales, permettant ainsi d'augmenter l'activité anti-tumorale des cellules NK.¹¹⁷

Les récepteurs de mort appartiennent à la famille du récepteur du TNF (facteur de nécrose tumorale ou *tumor necrosis factor*). Les ligands FasL ou CD95L, TRAIL et TNF α se lient spécifiquement aux récepteurs de mort Fas ou CD95, TRAIL-R et TNFR1, respectivement. Cette interaction active divers mécanismes intracellulaires dont la cascade d'activation des caspases qui conduit *in fine* à la mort de la cellule cible par apoptose.¹¹⁸

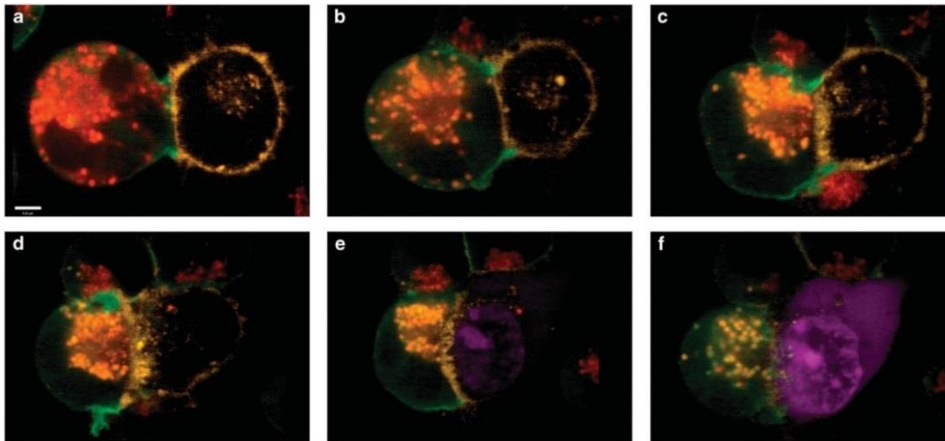


Figure 26 : Cytotoxicité médiée par les cellules NK.

D'après Mace et al., *Immunol Cell Biol*, 2014.¹¹⁵

Les cellules NK (en vert) contiennent des granules lytiques marquées en rouge. La couleur jaune représente la membrane plasmique et le colorant bleu permet de détecter la mort cellulaire.

(A) Interaction de la cellule NK avec la cellule cible. Les granules lytiques sont dispersés à l'intérieur de la cellule NK. (B) Les granules convergent au centrosome. (C) Polarisation des granules lytiques vers la synapse immunologique. (D) Réorganisation majeure de l'actine ; les granules lytiques sont ancrées à la membrane plasmique. (E) La libération des granules lytiques déclenche la mort de la cellule cible. (F) Apoptose de la cellule cible et détachement de la cellule NK après changement de conformation.

✓ Rôle immunorégulateur

Une fois activées, les cellules NK sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines et chimiokines, permettant de recruter et d'activer d'autres cellules immunes.

Les cytokines sont des petites molécules sécrétées afin de réguler l'activité et la fonction d'autres cellules à distance. Il existe différentes familles de cytokines, dont les interférons (IFN), les interleukines (IL), les chimiokines, les facteurs de croissances (CSF), les facteurs de croissance de transformation (TGF) et la famille du facteur de nécrose tumorale (TNF). Les principales cytokines sécrétées par les cellules NK sont l'interféron γ et le TNF α , ainsi que les cytokines immunosuppressives IL-5, IL-10, IL-13 et les facteurs de croissance G-CSF et GM-CSF.¹¹⁹ L'interféron γ possède une puissante activité antivirale et anti-tumorale notamment via la stimulation antigénique des lymphocytes T et l'activation des

cellules NK et macrophages. Le TNF α est une puissante cytokine pro-inflammatoire impliquée notamment dans la phase aiguë de l'inflammation, permettant de recruter les PNN, de stimuler la phagocytose des macrophages et d'induire l'apoptose.

Les chimiokines possèdent une activité chimiotactique indispensable à la migration et l'activation des leucocytes circulants. Ainsi, les cellules NK peuvent sécréter les chimiokines MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES et IL-8.¹¹⁹

La sécrétion de ces cytokines et chimiokines permet d'amplifier la réponse immunitaire en recrutant et activant d'autres cellules NK, des lymphocytes T, des cellules dendritiques et des macrophages. Ces cellules immunes, notamment les cellules dendritiques, vont à leur tour sécréter des cytokines, dont l'IL12, l'IL15 et l'IL18, permettant d'activer les cellules NK afin d'exercer leurs fonctions cytotoxiques (Figure 27).¹²⁰

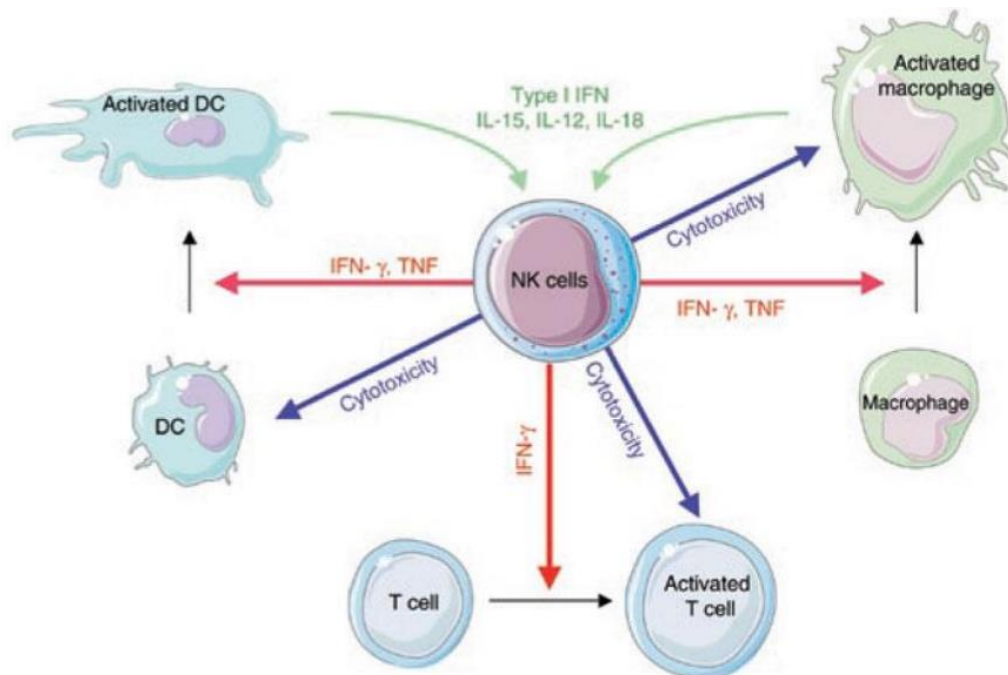


Figure 27 : Régulation de la réponse immunitaire par les cellules NK.

D'après Vivier et al., Nature Immunology, 2008.

Une fois activées (flèches vertes), les cellules NK peuvent exercer des rôles opposés afin de réguler la réponse immunitaire. Ainsi, les cellules NK peuvent favoriser la maturation et l'activation des lymphocytes T, des cellules dendritiques et des macrophages (flèches rouges) ou éliminer les lymphocytes TCD4 activés, les cellules dendritiques immatures et les macrophages hyper-activés (flèches bleues).

Abréviations : activated : activé ; cell : cellule ; cytotoxicity : cytotoxicité ; DC : cellules dendritiques.

La régulation de la réponse immunitaire est donc un processus complexe et réciproque, mettant en jeu de nombreuses cellules immunes qui interagissent entre elles de façon directe ou indirecte via la sécrétion des cytokines.

6. Récepteurs NK

Les cellules NK possèdent une large gamme de récepteurs exprimés à leur surface : les récepteurs activateurs, les récepteurs inhibiteurs, les récepteurs aux cytokines et chimiokines, les molécules d'adhésion... (Figure 28). Les cellules NK ne possèdent pas l'intégralité de ces récepteurs à leur surface. Chaque cellule NK possède donc son propre panel de récepteurs lui permettant de reconnaître un nombre important de molécules, régulant étroitement ses fonctions. Les fonctions des cellules NK sont régulées positivement par les récepteurs activateurs et les récepteurs aux cytokines, et régulées négativement par les récepteurs inhibiteurs.

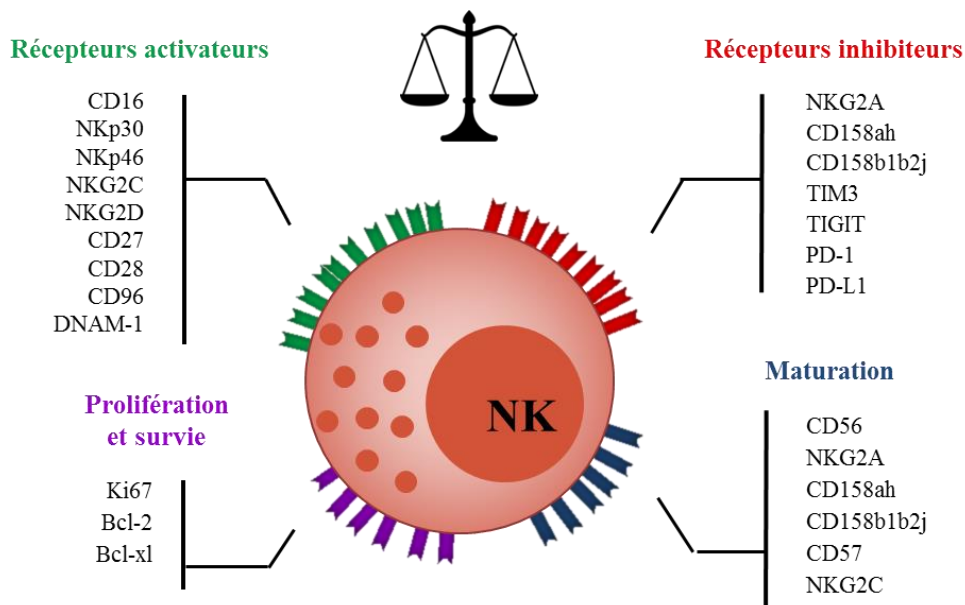


Figure 28 : Exemple de récepteurs retrouvés à la surface des cellules NK.

Les récepteurs à la surface des cellules NK sont impliqués dans diverses fonctions dont l'activation, l'inhibition, la maturation, la prolifération et la survie. La cytotoxicité des cellules NK dépend de la balance entre les signaux activateurs et inhibiteurs délivrés par les cellules tumorales.

a. Les récepteurs inhibiteurs

Les récepteurs inhibiteurs des cellules NK sont principalement représentés par les récepteurs KIR et l'hétérodimère CD94/NKG2A. Les récepteurs KIR (*Killer-cell Immunoglobulin-like Receptors*) appartiennent à la superfamille des immunoglobulines tandis que le récepteur NKG2A appartient à la superfamille des récepteurs de type lectines.

Ces récepteurs reconnaissent les molécules HLA classe I du soi : HLA-A/B/C pour les récepteurs KIR et HLA-E pour le récepteur NKG2A. La liaison des molécules HLA classe I sur ces récepteurs délivre un signal inhibiteur intracellulaire via leurs motifs ITIM (motifs

d'inhibition des récepteurs immuns basés sur la tyrosine). Ce signal inhibiteur empêche donc l'activation des cellules NK.

La famille des récepteurs KIR est très polymorphe. En effet, il existe une grande variété de récepteurs KIR qui reconnaissent des épitopes différents à la surface des molécules HLA de classe I. Cette diversité enrichie le répertoire antigénique des cellules NK. Ces récepteurs KIR sont regroupés sous le même cluster de différenciation : CD158.

b. Les récepteurs activateurs

Les récepteurs activateurs sont eux principalement composés de la famille Natural Cytotoxicity Receptors (NCR), des récepteurs NKG2D et CD16 et de divers corécepteurs impliqués dans la cytotoxicité des cellules NK (notamment DNAM-1 ou CD226).

Le récepteur NKG2D appartient à la superfamille des récepteurs de type lectines. Il reconnaît deux types de ligands : les molécules MIC-A et MIC-B (*MHC class I-chain-related proteins A and B*) et les molécules ULBP1-6 (*UL16-binding protein*). Ces ligands, faiblement exprimés sur les cellules saines, sont fortement exprimés sur les cellules tumorales. La liaison de ces ligands sur NKG2D entraîne une activation de la cellule NK, permettant d'augmenter son activité cytotoxique et la sécrétion de cytokines et chimiokines.¹²¹

Le récepteur CD16 appartient à la famille des récepteurs au fragment constant des immunoglobulines de type G. Il est exprimé sur la majorité des cellules NK circulantes CD56^{dim}. Le récepteur CD16 joue un rôle primordial dans le mécanisme d'ADCC. Sa liaison au fragment Fc lui permet de se fixer sur des anticorps monoclonaux liés aux antigènes des cellules cibles par leur fragment Fab (*Fragment antigen-binding*). Le pont ainsi créé par l'anticorps permet de rapprocher les cellules NK de leur cible. La liaison du récepteur CD16 au fragment Fc va délivrer un signal activateur via ses motifs ITAM (motifs d'activation des récepteurs immuns basés sur la tyrosine). La cellule NK activée va alors lyser la cellule cible par exocytose des granules lytiques.

Le corécepteur DNAM-1 (*DNAX Accessory Molecule-1*) appartient à la superfamille des immunoglobulines. Cette molécule est classée parmi les corécepteurs activateurs des cellules NK devant sa capacité à amplifier l'activation des cellules NK médiée par les récepteurs activateurs ; cette molécule étant incapable d'induire à elle seule la lyse des

cellules cibles. Le corécepteur DNAM-1 peut se lier à deux types de ligands : le récepteur du poliovirus (PVR ou CD155) et la Nectine-2 (CD112).¹²² Ces ligands sont fréquemment exprimés par des cellules tumorales, notamment les cellules leucémiques.

La famille des récepteurs naturels cytotoxiques regroupe les récepteurs NKp30, NKp44 et NKp46. Ces récepteurs ont ainsi été nommés devant leur masse moléculaire respective. Les NCR appartiennent à la superfamille des immunoglobulines.

✓ Récepteur NKp46

Découverte en 1997 par l'équipe d'Alessandro Moretta, la protéine NKp46 tient son nom de son expression, restreinte aux cellules NK, et de sa masse moléculaire, 46 kDa.¹²³ Son clonage moléculaire en 1998 a révélé son appartenance à la superfamille des immunoglobulines.¹²⁴ Ce récepteur membranaire est caractérisé par deux domaines de type Ig C2 dans sa partie extracellulaire, une région transmembranaire contenant l'acide aminé arginine chargé positivement (éventuellement impliqué dans la stabilisation de l'association avec la chaîne zêta ζ de CD3) et une partie cytoplasmique de 30 acides aminés, ne contenant pas de motifs ITAM. Son association avec les molécules adaptatrices CD3 ζ et Fc ϵ R1 γ contenant des motifs ITAM est donc essentielle pour la transduction du signal délivré par NKp46 (Figure 29).¹²⁵ Le gène codant pour NKp46 est retrouvé sur le chromosome 19.¹²⁴

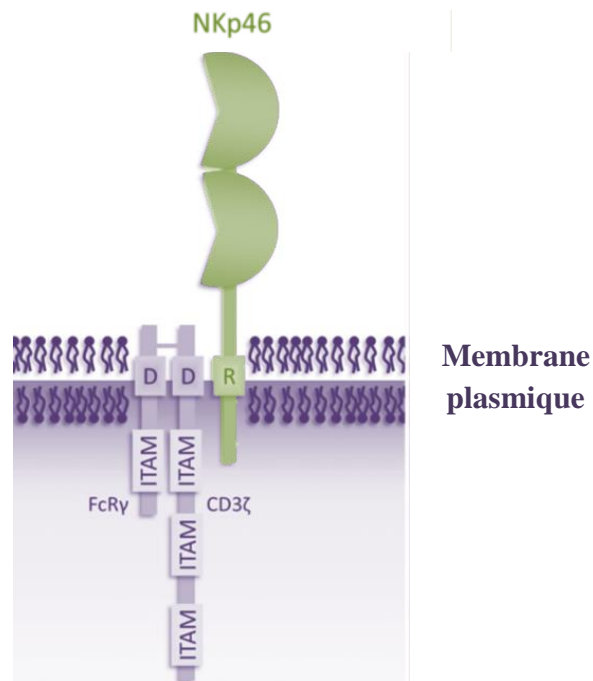


Figure 29 : Représentation de NKp46 et de ses molécules adaptatrices.

D'après Kruse et al., *Immunology and Cell Biology*, 2014.¹²⁶

Le récepteur NKp46 reconnaît notamment l'hémagglutinine du virus influenza et l'hémagglutinine-neuraminidase du virus parainfluenza sur les cellules infectées.¹²⁷ Bien que ce récepteur soit connu depuis plus de 20 ans, les ligands présents à la surface des cellules saines et tumorales n'ont toujours pas été découverts.

NKp46 ou CD335 ou NCR1, appartient à la famille des *Natural Cytotoxicity Receptors* (NCR), comme NKp30 et NKp44. Il est exprimé par les cellules NK, qu'elles soient au repos ou activées,¹²³ contrairement à NKp44 qui est présent uniquement sur les cellules NK activées.¹²⁸ Son expression est restreinte aux cellules NK, à l'exception d'une sous-population de cellules innées lymphoïdes (ILC3 NCR⁺).¹²⁹

Le récepteur NKp46 peut déclencher la lyse cellulaire médiée par les cellules NK en contact avec différents types de cellules, qu'elles soient autologues, allogéniques ou xénogéniques¹³⁰ : il s'agit du seul NCR conservé entre l'Homme et la souris.

7. Cellules NK dans les LAM

a. Contrôle des cellules leucémiques par les cellules NK

Les cellules NK participent à l'immunité anti-tumorale dans de nombreuses tumeurs solides et hémopathies malignes, dont les LAM. Les cellules NK peuvent exercer leur activité cytotoxique envers les cellules leucémiques puisque ces dernières expriment des ligands aux récepteurs présents à la surface des cellules NK. Leur activité cytotoxique dirigée contre les cellules leucémiques est connue depuis 1987.¹³¹ Depuis, de nombreuses études décrivent leur participation au contrôle et à la clairance des cellules malignes.

En 1996, chez les patients atteints de LAM, il a été démontré qu'une altération des fonctions NK et de la production de cytokines était associée à une rechute précoce.¹³² En 2002, Lowdell et al. mettent en évidence une corrélation positive entre l'activité cytolytique des cellules NK et la survie sans rechute des patients.¹³³ De plus, la récupération rapide des cellules NK après une allogreffe de CSH est associée à diminution du taux de rechutes et une meilleure survie.¹³⁴

L'équipe de Velardi a largement démontré l'importance des cellules NK dans l'allogreffe de CSH.¹³⁵⁻¹³⁸ Ils ont ainsi montré qu'un mésappariement ou *mismatch* KIR/HLA entre les récepteurs inhibiteurs KIR des cellules NK du donneur et les molécules HLA classe I

présentes à la surface des cellules leucémiques du receveur augmentait l'activation et la cytotoxicité des cellules NK. De plus, ils ont montré que ce *mismatch* KIR/HLA, permettant d'obtenir une meilleure allo-réactivité des cellules NK du donneur, diminuait le risque de rechutes et améliorait la survie globale et la survie sans rechute comparé à un appariement parfait des récepteurs KIR/HLA (Figure 30).¹³⁸

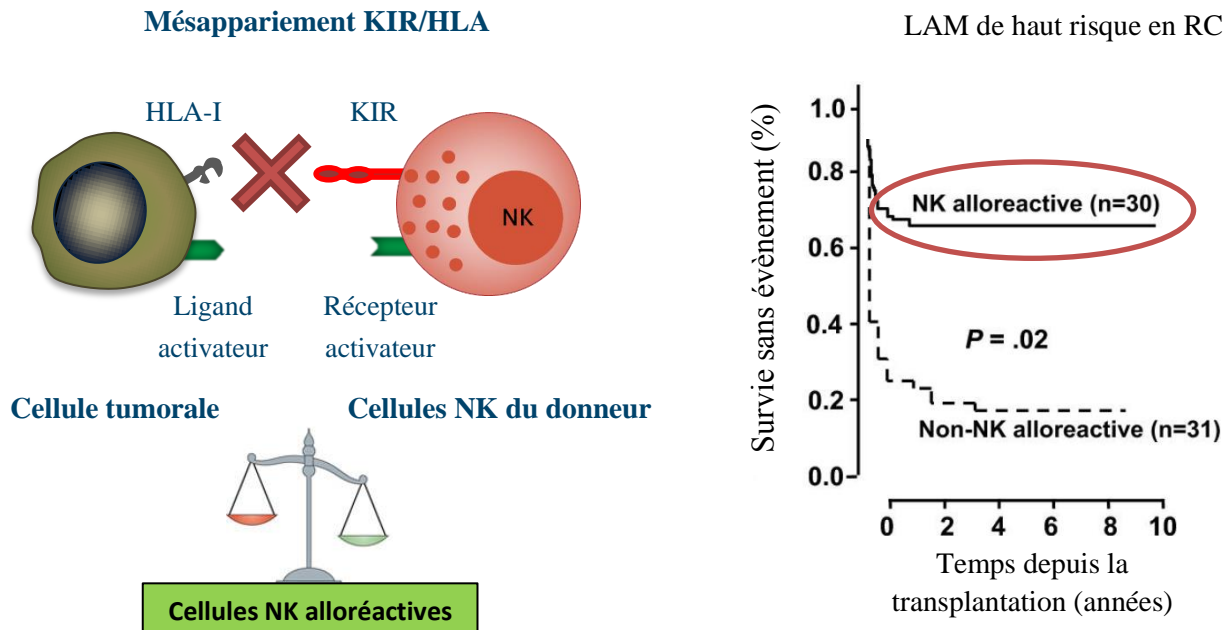


Figure 30 : L'alloréactivité des cellules NK dans l'allogreffe de CSH.

D'après *Ruggeri et al., Blood, 2007*.¹³⁸

(A) Le mésappariement KIR-CMH entre les cellules NK du donneur et les cellules leucémiques du receveur permet une meilleure allo-réactivité des cellules NK.

(B) Ce mésappariement améliore la survie sans rechute comparé à un appariement parfait KIR-CMH.

b. Altérations des cellules NK dans les LAM

Toutefois, le contact prolongé entre les cellules NK et les blastes peut être responsable d'une tolérance par les cellules NK et d'un échappement tumoral. En effet, de nombreuses altérations phénotypiques NK sont décrites au diagnostic des patients atteints de LAM, conduisant à une baisse de l'activation des cellules NK. En effet, il a été montré chez les patients atteints de LAM une baisse d'expression des récepteurs activateurs NKp46, NKp30, NKG2D et DNAM-1 avec une surexpression des récepteurs inhibiteurs KIR et CD94/NKG2A par rapport aux volontaires sains.¹³⁹⁻¹⁴⁴ Outre ces anomalies phénotypiques, des altérations fonctionnelles des cellules NK ont été décrites chez les patients atteints de LAM avec une cytotoxicité et un relargage cytokinique (IFN γ et TNF α) réduits.¹⁴²

La cytotoxicité des cellules NK est fortement dépendante de l'engagement des récepteurs activateurs de la famille des NCR, comprenant les récepteurs NKp30 et NKp46. Des tests de cytotoxicité *in vitro* ont démontré que le blocage par anticorps des récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 réduisait la lyse des cellules leucémiques par les cellules NK allogéniques.¹³⁹

L'équipe Immunité et Cancer du Pr Olive a décrit que les cellules NK de la plupart des volontaires sains présentaient un phénotype NCR^{bright} (forte expression des récepteurs NKp30 et NKp46), tandis que les cellules NK de patients atteints de LAM présentaient majoritairement un phénotype NCR^{dull} (faible expression des récepteurs NKp30 et NKp46).^{139,140} Ce phénotype NCR^{dull} est associé à une baisse des capacités cytolytiques des cellules NK. En effet, une corrélation positive a été démontrée entre la densité des NCR et l'activité cytolytique médiée par les cellules NK.¹³⁰ De plus, ce phénotype NCR^{dull} altère le pronostic des patients atteints de LAM : les taux de survie globale à 5 ans de ces patients étant significativement réduits comparés à ceux des patients ayant un phénotype NCR^{bright} (28% *versus* 72%, respectivement, $p=0,003$; Figure 31).¹⁴⁰

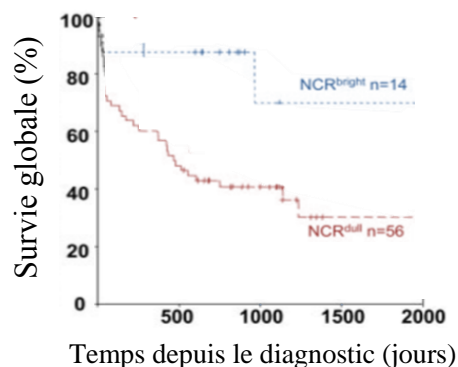


Figure 31 : Le phénotype NCR^{dull} est associé à un pronostic sombre.

D'après Fauriat et al., *Blood*, 2007.¹⁴⁰

Le phénotype NCR^{dull} est principalement retrouvé chez les patients atteints de LAM par rapport aux volontaires sains (VS). Ceci laisse suggérer qu'il a été acquis durant le développement de la leucémie. Cette hypothèse a été confirmée de deux manières :

- la mise en co-culture de cellules NK de volontaires sains de phénotype NCR^{bright} avec des cellules leucémiques (issues de patients LAM présentant un phénotype NCR^{dull}) est responsable d'une baisse de l'intensité d'expression du récepteur NKp30 à la surface des cellules NK des VS, d'une tendance à la baisse du récepteur NKp46¹⁴⁰ et d'une altération de la cytotoxicité des cellules NK des VS avec une baisse de la

production de TNF α et d'interféron- γ et une tendance à la baisse de la dégranulation des cellules NK¹⁴² ;

- l'expression des NCR est restaurée après traitement et obtention d'une réponse complète chez les patients présentant un phénotype NCR^{dull} au diagnostic.^{140,145}

L'ensemble de ces observations montre l'importance des altérations phénotypiques dans l'échappement des cellules cancéreuses à l'immunité anti-tumorale médiée par les cellules NK. Par ailleurs, les altérations phénotypiques impliquant les récepteurs activateurs NKp30 et NKp46 ont aussi été démontrées dans d'autres tumeurs solides comme le cancer de la prostate ou du col de l'utérus.^{146,147}

Dans les LAM, les marqueurs NKp30 et NKp46 présentent un intérêt clinique majeur. En 2017, l'équipe du Pr Olive a montré que le biomarqueur NKp30 améliorait la stratification pronostique proposée par l'ELN et que son intensité d'expression permettait de reclasser les patients du groupe intermédiaire.¹⁴⁵ Ainsi, l'analyse des courbes de survie globale a mis en évidence que les patients présentant une faible expression de NKp30 initialement classés dans le groupe intermédiaire de l'ELN pouvaient être reclassés dans le groupe défavorable (Figure 32).

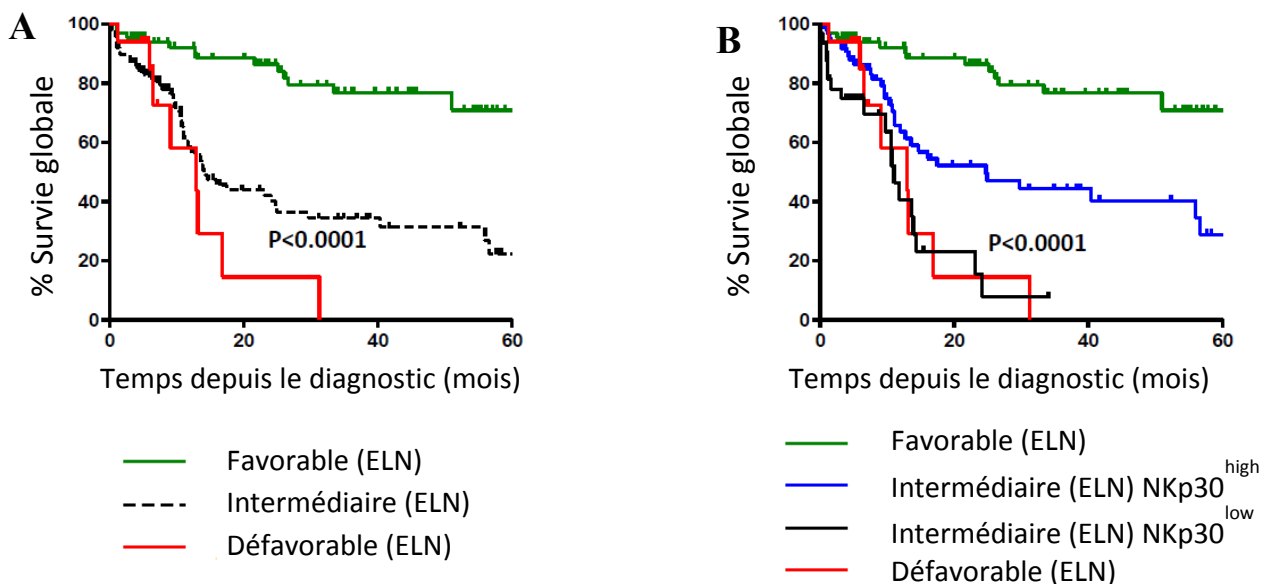


Figure 32 : Intégration du biomarqueur NKp30 à la stratification pronostique proposée par l'ELN en 2017. D'après Chretien et al., *Oncotarget*, 2017.

(A) Courbe de survie globale selon la classification ELN 2017. (B) Reclassification des patients du groupe intermédiaire selon le niveau d'expression de NKp30.

Concernant le biomarqueur NKp46, sa valeur pronostique a été démontrée sur une cohorte prospective de 180 patients atteints de LAM.¹⁴⁸ Ainsi, les patients ayant une forte expression de NKp46 à la surface des cellules NK (phénotype NKp46^{high}) ont une meilleure survie que les patients ayant une faible expression de NKp46 à la surface de leurs cellules NK (phénotype NKp46^{low}). En effet, les patients NKp46^{high} ont des taux de survie globale et sans rechute à 4 ans significativement plus élevés que les patients NKp46^{low} (survie globale : 82,6% *versus* 57,1% $p=0,010$; survie sans rechute : 74,3% *versus* 46,6% $p=0,014$ respectivement ; Figure 33A). De plus, l'intensité d'expression de NKp46 au diagnostic des LAM est inversement corrélée à l'incidence cumulative de rechutes (20,0% chez les patients NKp46^{high} *versus* 42,1% chez les patients NKp46^{low}, $p=0,039$; Figure 33B).

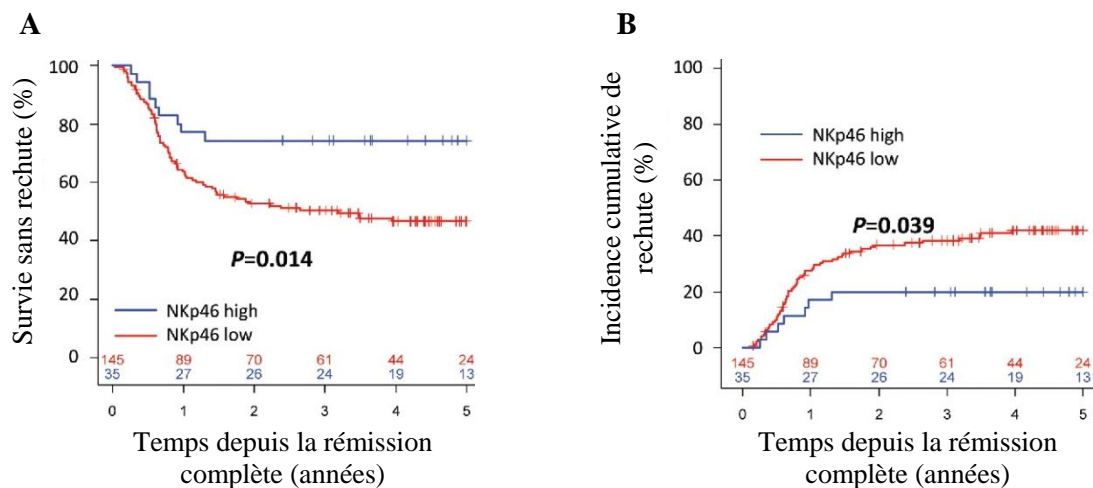


Figure 33 : Valeur pronostique du biomarqueur NKp46 dans les LAM.

D'après Chretien *et al.*, *Oncoimmunology*, 2017.

Estimation de Kaplan-Meier de la survie sans rechute (A) et de l'incidence cumulative de rechute (B) des patients atteints de LAM selon leur statut NKp46.

Une analyse de sous-groupe selon le traitement de consolidation a mis en évidence que la valeur pronostique de NKp46 était limitée aux patients traités par allogreffe de CSH.¹⁴⁸ En effet, chez les patients NKp46^{high}, l'allogreffe améliore significativement la survie sans rechute comparé aux patients n'ayant pas été allogreffés (100% versus 71,2%, respectivement, p=0,025 ; Figure 34A). En revanche, chez les patients NKp46^{low}, l'allogreffe n'apporte aucun bénéfice en termes de survie sans rechute (50,8% versus 46,6%, respectivement, p=0,303 ; Figure 34B). Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression de NKp46 au diagnostic de LAM est un biomarqueur prédictif puissant de réponse à l'allogreffe de CSH.

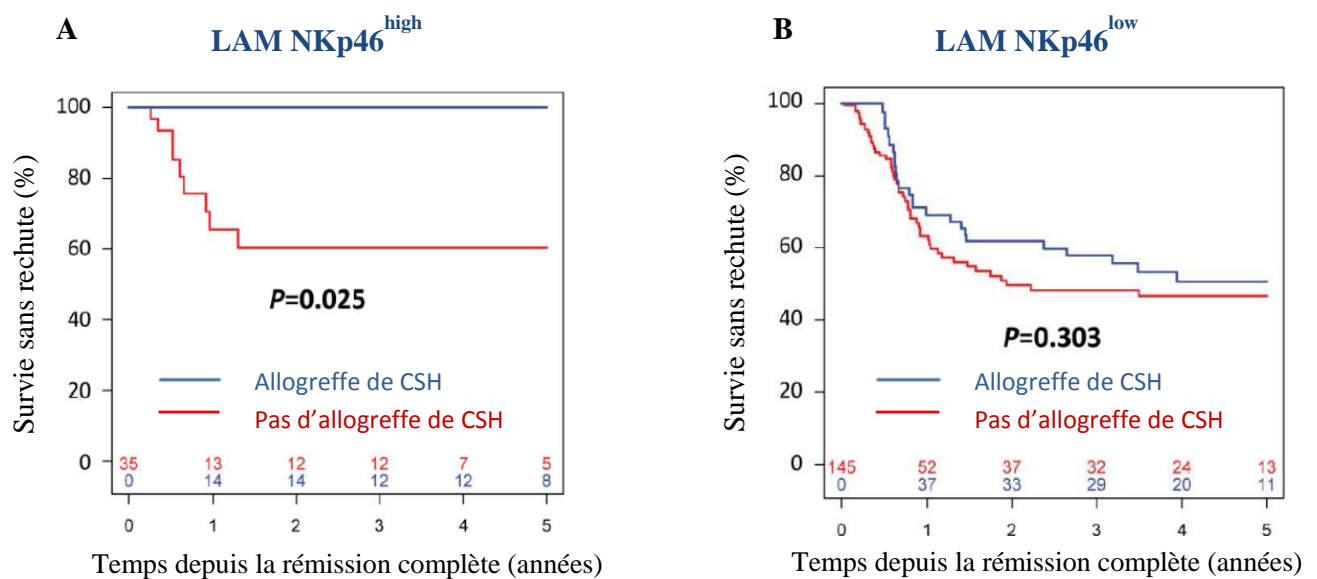


Figure 34 : Estimation de Kaplan-Meier de la survie sans rechute chez les patients présentant une expression de NKp46 forte (A) ou faible (B) au diagnostic.

D'après Chretien et al., *Oncoimmunology*, 2017.

Survie sans rechute des patients non allogreffés (en rouge) versus patients allogreffés (en bleu).

Abréviations : LAM NKp46^{high} : patients ayant une forte intensité d'expression de NKp46 ; LAM NKp46^{low} : patients ayant une faible intensité d'expression de NKp46

Objectif de l'étude

Devant l'intérêt clinique majeur de NKp46 dans les LAM en tant que biomarqueur de réponse à l'allogreffe de CSH,¹⁴⁸ les équipes de recherche et clinique du Centre de Recherche en Cancérologie de Marseille (CRCM) et de l'IPC ont mis en place, depuis décembre 2017, l'analyse systématique de NKp46 chez les patients atteints de LAM. La valeur prédictive de NKp46, démontrée sur une cohorte rétrospective de 66 patients allogreffés,¹⁴⁸ pourra ainsi être validée sur une nouvelle cohorte prospective.

Dans ce contexte, les objectifs principaux de ce travail sont doubles :

- dans un premier temps : caractériser les patients ayant une altération de NKp46 au diagnostic de LAM
- dans un second temps : confirmer la valeur prédictive de réponse à l'allogreffe de CSH sur une nouvelle cohorte prospective.

Cette thèse d'exercice se divise donc en deux parties.

La première partie a été réalisée au sein de l'équipe Immunité et Cancer du Pr Olive du CRCM. Ce travail a permis d'étudier précisément les altérations des cellules NK associées au phénotype NKp46, en comparant d'une part, les deux groupes de patients LAM NKp46^{high} (forte expression de NKp46) et LAM NKp46^{low} (faible expression de NKp46) entre eux et vis-à-vis des volontaires sains. D'autre part, une comparaison des populations cellulaires NK exprimant ou non le marqueur NKp46 a été faite chez les VS et les patients atteints de LAM. Cette analyse phénotypique à l'échelle cellulaire est possible grâce à une technique multiparamétrique : la cytométrie de masse.

La seconde partie a été réalisée au sein de l'équipe de biopathologie du Pr Xerri de l'Institut Paoli-Calmettes. Ce travail a ainsi permis de recueillir et d'analyser l'ensemble des données cliniques et biologiques des patients atteints de LAM diagnostiqués au laboratoire de l'IPC associées aux caractéristiques phénotypiques de leurs cellules NK au diagnostic dans le cadre de l'étude monocentrique prospective mise en place en décembre 2017.

**PARTIE I : Caractérisation
phénotypique des cellules NK par
cytométrie de masse selon l'expression
de NKp46 chez les patients atteints de
LAM**

I. Matériels et Méthodes

1. Echantillons

Les critères d'inclusion et d'exclusion correspondent aux critères retenus pour la cohorte de patients chez qui la valeur prédictive de NKp46 a été mise en évidence¹⁴⁸ :

- Critères d'inclusion : LAM au diagnostic, âge compris entre 18 et 65 ans
- Critères d'exclusion : LAM promyélocytaire ou LAM3 selon la classification FAB (pronostic favorable ayant un traitement spécifique, l'acide tout-trans-rétinoïque).

Les prélèvements de sang périphérique de patients atteints de LAM ont été collectés par le Centre de Ressources Biologiques de l'Institut Paoli-Calmettes. Tous les patients ont signé un consentement éclairé conformément à la déclaration d'Helsinki et la procédure a été validée par le comité d'éthique de l'IPC. Après isolation par gradient de densité (Lymphoprep separation media®), les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) ont été congelées dans une solution d'Albumine humaine (Vialebex®) et de diméthylsulfoxyde 10% (DMSO) et conservées dans un premier temps en azote liquide à la tumorotheque (IPC, Pr Chabannon) du diagnostic de LAM jusqu'au déstockage (1^{er} mars 2019), puis à -80°C (au CRCM) jusqu'au marquage. Les données cliniques des patients inclus dans cette étude sont résumées dans le tableau 7.

Les volontaires sains ont été choisis selon l'âge des patients atteints de LAM (test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns). A partir du sang total recueilli sur tube EDTA à l'Etablissement Français du Sang, les PBMC ont été isolées à l'aide d'un gradient de densité (Lymphoprep separation media®) puis congelées en RPMI 10% sérum de veau fœtal (SVF) 10% DMSO à -80°C jusqu'au marquage.

Les prélèvements des patients (n=24) et VS (n=10) ont été analysés par cytométrie de masse (CyTOF, Helios® Fluidigm) et l'extraction d'ARN a été réalisée en vue d'une analyse RNA-seq (Kit Qiagen®). La flow chart (figure 35) résume les analyses effectuées.

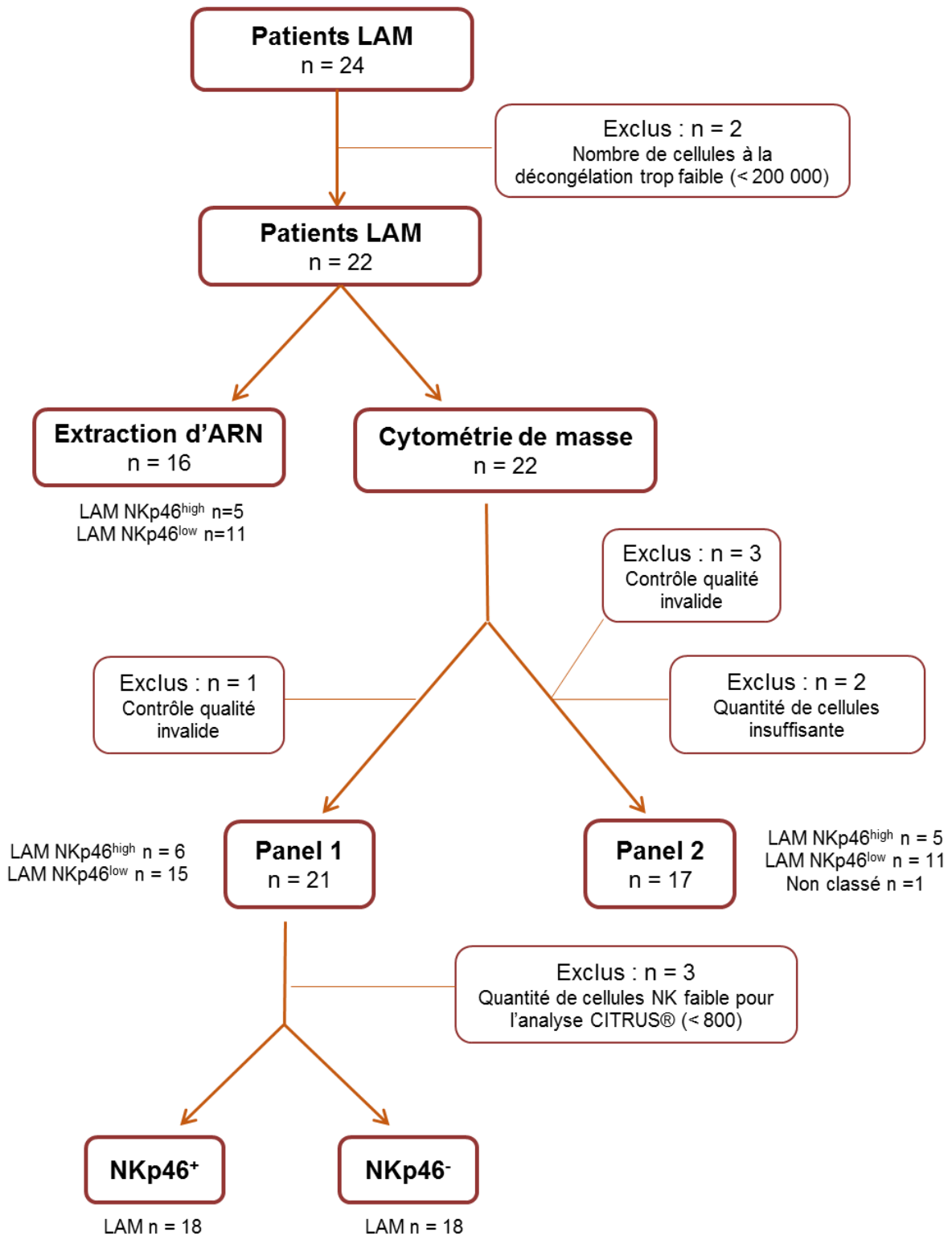


Figure 35 : Flow chart.

Abréviations : LAM NKp46^{high} : patients ayant une forte intensité d'expression de NKp46 ; LAM NKp46^{low} : patients ayant une faible intensité d'expression de NKp46 ; NKp46⁺ : cellules NK exprimant le marqueur NKp46 à leur surface ; NKp46⁻ : cellules NK n'exprimant pas le marqueur NKp46 à leur surface.

2. Cytométrie de masse

a. Principe

La cytométrie de masse permet une analyse multiparamétrique à l'échelle d'une seule cellule (« single cell »).¹⁴⁹ Elle fusionne deux technologies : la cytométrie en flux et la spectrométrie de masse. La cytométrie en flux, technique de référence utilisée en immunophénotypage, utilise des anticorps couplés à des fluorochromes pour étudier les marqueurs cellulaires. Or, le chevauchement des spectres d'émission des fluorochromes est un facteur limitant le nombre de paramètres qu'il est possible d'analyser sur une cellule unique. La spectrométrie de masse, quant à elle, permet de discriminer les isotopes de différents poids moléculaires avec une haute précision. Le couplage de ces deux technologies permet donc d'augmenter le nombre de paramètres cellulaires pouvant être quantifiés simultanément sur une cellule unique (une quarantaine de paramètres, en théorie jusqu'à 100).¹⁵⁰

Les cellules sont marquées par des anticorps couplés à des isotopes de métaux lourds appartenant pour la plupart à la famille des lanthanides. Dans le cytomètre de masse, la suspension cellulaire est vaporisée en microgouttelettes par le nébuliseur. Ces gouttelettes sont ensuite séchées dans une chambre à spray et les cellules sont atomisées et ionisées une par une dans un plasma d'argon : chaque nuage d'ions généré correspond à une cellule unique. Le quadripôle sépare les ions selon leur masse atomique afin de ne conserver que les métaux lourds, qui étaient couplés aux anticorps et qui correspondent donc aux marqueurs d'intérêt. La détection de chaque cellule ainsi que la quantification des niveaux d'expression des marqueurs d'intérêt se fait par spectrométrie de masse : chaque métal possède un rapport masse/charge spécifique, lui conférant un temps de vol (« TOF : Time Of Flight ») particulier jusqu'au détecteur (Figure 36).¹⁴⁹ Les données sont ensuite analysées à l'aide du logiciel FlowJo® et d'outils d'analyse multiparamétrique tels que CITRUS® et t-SNE.

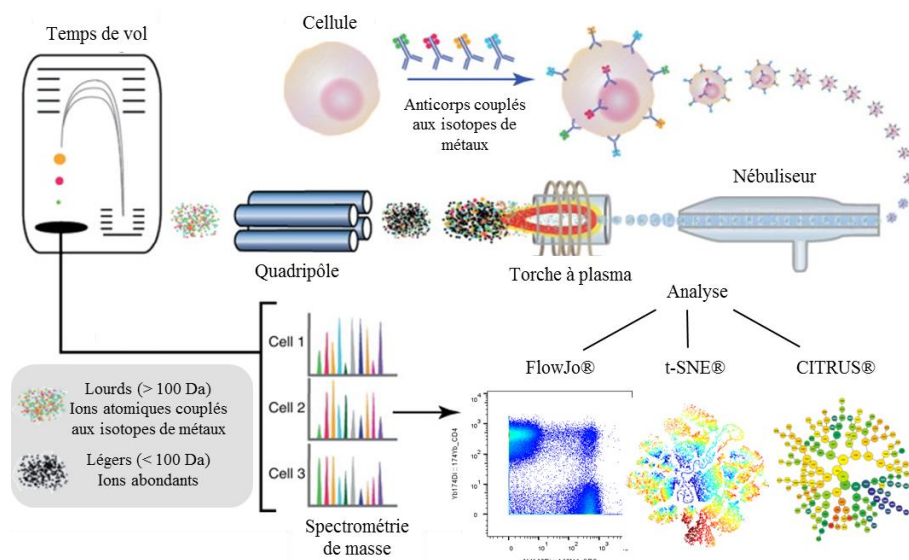


Figure 36 : Principe de la cytométrie de masse.

D'après Bendall et al., *Nature Biotechnology*, 2012.

b. Pré-traitement des échantillons

Les métaux lourds de haut poids moléculaire (> 100 Da) sont des isotopes non biologiques, et donc spécifiques du marqueur étudié. Cette technologie étant hautement sensible, des contaminations extérieures peuvent survenir avec l'utilisation de matériaux et solutions non adaptés. Le protocole de marquage nécessite donc la filtration du sérum de veau fœtal sur filtre de $0,2 \mu\text{m}$ pour éviter le relargage de débris contenant de l'iode, l'utilisation de matériaux en polypropylène non autoclavés, de tampons spécifiques validés pour cette méthode (PBS Maxpar®, Fluidigm, à teneur plus faible en baryum) et de l'eau déionisée Mili-Q (teneur plus faible en plomb et autres particules).

Les PBMC sont décongelées et lavées deux fois dans du RPMI 10% SVF. Les cellules sont incubées 30 min à 37°C dans du RPMI 2% SVF puis filtrées (filtre $30 \mu\text{m}$, MACS Miltenyi Biotec) afin d'éliminer les filaments d'ADN relargués par les cellules apoptotiques et les débris cellulaires. Les cellules sont comptées en lame de Kova puis séparées en deux parts : la première, pour l'analyse transcriptomique, est congelée en RLT- β mercapto-éthanol jusqu'à extraction de l'ARN ; et la seconde, pour l'analyse par cytométrie de masse, est déposée en plaque de polypropylène. Ces dernières sont incubées 30 min à 37°C avec de la benzonucléase (nucléase universelle Pierce®, Thermo Fisher Scientific) diluée au $1/10\ 000^{\text{e}}$ dans du RPMI 2% SVF pour cliver les acides nucléiques restants dans le milieu. Les cellules mortes sont marquées au cisplatine (Fluidigm) 5 mM dilué au $1/5000^{\text{e}}$ pendant 5 min à 37°C . Enfin, les cellules sont incubées 10 min à 4°C avec du Fc Block (BD, Biosciences) dilué au $1/10^{\text{e}}$ dans du Cell Staining Buffer (CSM, Maxpar®) pour saturer les récepteurs Fc.

c. Marquage

Chaque échantillon est marqué par deux panels d'anticorps différents (présentés en Annexe 1 et 2) lorsque la quantité de cellules est suffisante. Le cas échéant, le panel 1 est privilégié. Les cellules sont marquées en surface par un mélange d'anticorps extracellulaire préparé dans du CSM pour un volume final de $25 \mu\text{l}$, pendant 1h à 4°C . Entre chaque étape, des lavages avec les tampons d'incubation sont réalisés pour éliminer les anticorps en excès non fixés. Les cellules sont ensuite incubées 30 minutes à 4°C avec un anticorps secondaire anti-biotine se fixant sur les anticorps primaires biotinylés (CD13, CD33 et CD34) afin d'exclure les monocytes et les blastes myéloïdes lors de l'analyse. Les cellules sont ensuite

fixées 15 minutes à température ambiante dans une solution tampon Maxpar phosphate salin (PBS) 2% formaldéhyde.

Le marquage intracellulaire s'effectue en deux étapes de 30 minutes à 4°C : la perméabilisation membranaire (solution eBioscience) et le marquage (mélange d'anticorps préparé dans une solution de Permeabilization Buffer 10X, eBioscience, diluée au 1/10^e avec de l'eau Milli-Q). Enfin, les cellules sont incubées sur la nuit avec de l'iridium dilué au 1/1000^e dans du formaldéhyde pour détecter les cellules une fois ionisée (agent intercalant de l'ADN). Le lendemain, les cellules sont lavées en CSM et comptées avant d'être congelées ou acquises au cytomètre.

d. Acquisition

Après une éventuelle étape de décongélation, deux lavages en eau Milli-Q sont effectués. Les cellules sont ensuite re-suspendues avec des billes de normalisation (EQ Four Element Calibration Beads, Fluidigm) diluées au 1/10^e dans l'eau Milli-Q, puis filtrées avant l'acquisition sur le cytomètre de masse de la plateforme du CRCM (Helios® Fluidigm).

e. Traitement et analyse des données

Après l'acquisition, les données sont converties en fichiers .fcs et normalisées selon l'intensité d'expression des billes de calibration (logiciel Cy-TOF software v6.0, Fluidigm), afin d'obtenir des résultats standardisés et reproductibles.

Dans un premier temps, les cellules NK ont été identifiées par fenêtrage manuel à l'aide du logiciel FlowJo® (vX.0.7). La stratégie de fenêtrage manuel appliquée est disponible figure 37. L'iridium, agent intercalant de l'ADN, permet d'identifier les cellules (Iridium⁺) et d'éliminer à la fois les débris (Iridium⁻) et les doublets (Iridium fortement exprimé). Les billes de normalisation (¹⁴⁰Ce⁺¹⁴²Nd⁺) ainsi que les cellules mortes (Iridium⁺Cisplatine⁺) ont été exclues manuellement lors de l'étape de prétraitement des fichiers .fcs. Les globules blancs ont été sélectionnés via le marqueur pan-leucocytaire CD45 (CD45⁺). Les monocytes (CD13⁺CD33⁺), les blastes myéloïdes (CD13⁺, CD33⁺ et/ou CD34⁺), les lymphocytes B (CD19⁺) et les lymphocytes T (CD3⁺) ont été écartés de l'analyse pour isoler les lymphocytes NK (CD3⁻CD56⁺).

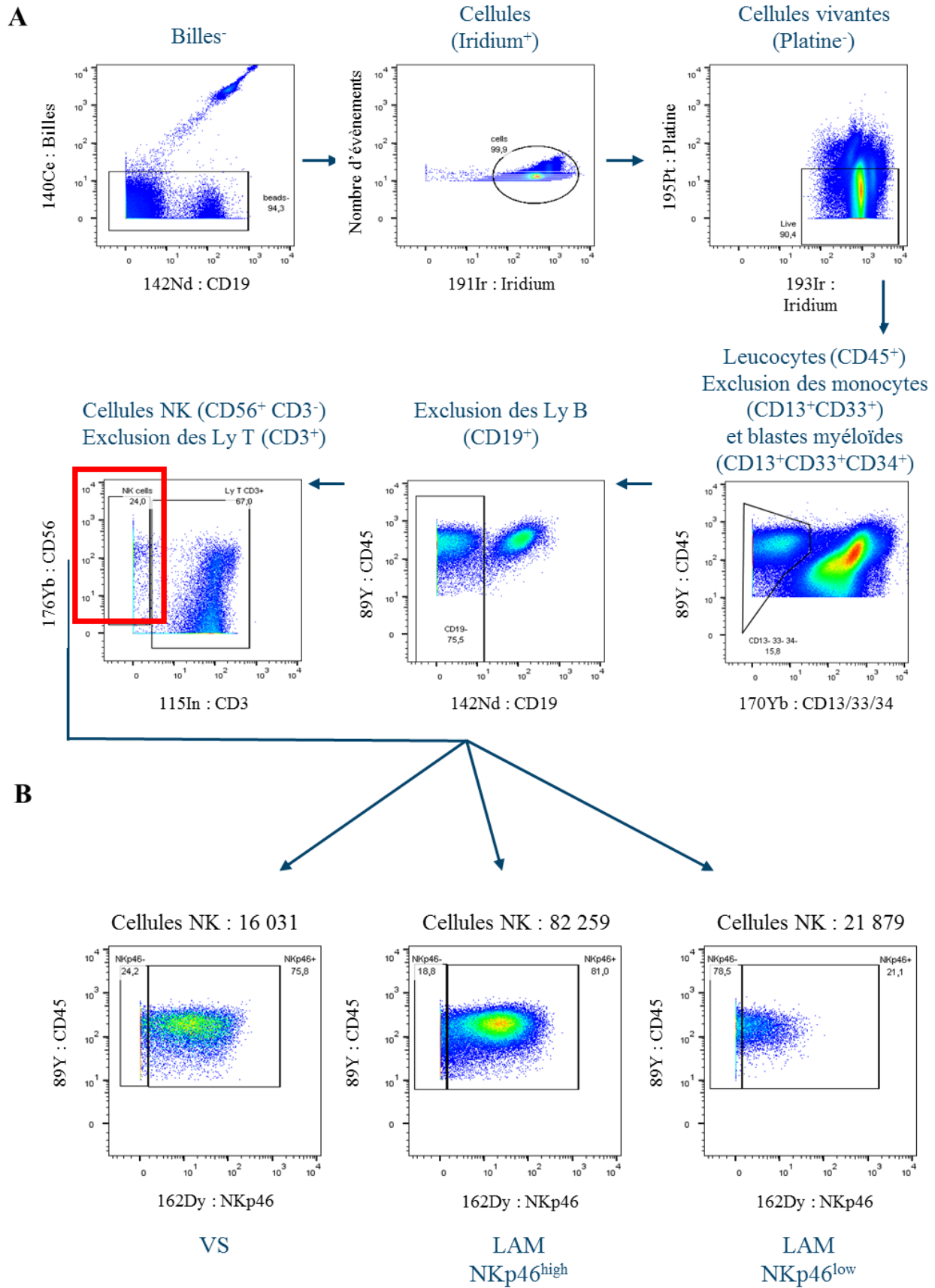


Figure 37 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie de masse.

(A) des cellules NK et (B) des sous-populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ chez les VS, les patients LAM NKp46^{high} et NKp46^{low}.

Les patients ont été séparés en deux groupes selon l'intensité d'expression du marqueur NKp46 sur les cellules NK (Figure 38) :

- LAM NKp46^{high} (n=6) avec une forte intensité d'expression de NKp46
- LAM NKp46^{low} (n=15) avec une faible intensité d'expression de NKp46.

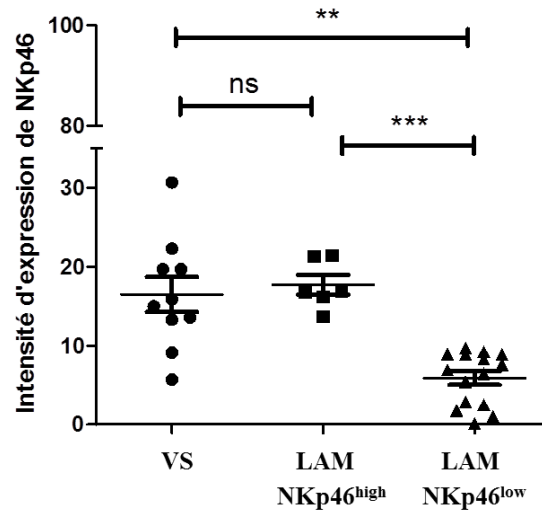


Figure 38 : Comparaison de l'intensité d'expression de NKp46 chez les volontaires sains et les patients atteints de LAM.

L'intensité d'expression de NKp46 a été déterminée en cytométrie de masse sur des prélèvements au diagnostic de LAM, congelés. Les patients sont stratifiés en 2 groupes sur l'intensité d'expression du marqueur NKp46. Le niveau d'expression de NKp46 de chaque groupe de patients (LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}) est comparé avec les VS. Test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns, ** p < 0,01 et *** p < 0,001.

Dans un deuxième temps, une analyse portant sur les populations cellulaires NK NKp46 positives (NKp46⁺) et NKp46 négatives (NKp46⁻) a été effectuée (Figure 37B). Les sous-populations exprimant NKp46 et n'exprimant pas NKp46 ont été fenêtrées parmi les lymphocytes NK. Les deux groupes de patients LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low} ont été regroupés. Ainsi, quatre groupes de patients sont comparés : les VS NKp46⁺ (n=10) et NKp46⁻ (n=10) et les patients LAM NKp46⁺ (n=21) et NKp46⁻ (n=21).

Les données ont été analysées à l'aide du logiciel FlowJo® pour le fenêtrage manuel en deux dimensions et de la plateforme en ligne Cytobank® donnant accès à divers outils d'analyse multiparamétrique, dont CITRUS® (Cluster Identification, Characterization, and Regression) et t-SNE (t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding). Ces algorithmes permettent de visualiser en deux dimensions (2D) un espace à n dimensions, par réduction de dimensionnalité. Ils regroupent en « clusters » les cellules ayant un phénotype similaire sur la base de marqueurs présélectionnés. Les marqueurs CD56, NKG2A, CD158a,h, CD158b1,b2,j, CD57 et NKG2C ont été utilisés pour regrouper les cellules NK selon leur état de maturation (Figure 24).

L'analyse t-SNE a nécessité un prétraitement des données sur le logiciel FlowJo® : des fichiers .fcs ont été créés à partir d'un fenêtrage manuel sélectionnant les cellules NK (CD3⁻CD56⁺). Un échantillonnage aléatoire (« downsampling ») a été effectué afin d'analyser le même nombre de cellules NK par patients et entre les différents groupes. Les fichiers .fcs des VS (n=10), des patients LAM NKp46^{high} (n=5) et LAM NKp46^{low} (n=12) ont été concaténés respectivement. L'analyse t-SNE a été réalisée sur 24 000 cellules NK représentatives de chaque groupe.

L'algorithme CITRUS® a été utilisé pour étudier les populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ identifiées préalablement par fenêtrage manuel, chez les VS (n=10) et les patients atteints de LAM (n=18) (Annexe 3). Cet algorithme a été conçu pour l'analyse de données multiparamétriques générées par cytométrie de masse et permet de limiter les risques de sur apprentissage (limite l'inflation du risque alpha). De ce fait, cet algorithme permet d'obtenir une meilleure stabilité des résultats entre les cohortes d'apprentissage et les cohortes de validation.¹⁵¹

L'analyse non supervisée des résultats a été réalisée par clustering hiérarchique à l'aide du logiciel MeV® (distance de Manhattan ou distance Euclidienne). Les tests statistiques ont été effectués avec le logiciel Graphpad Prism® (v7.0) : test de Wilcoxon-Mann-Whitney pour la comparaison de deux groupes non appariés et test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns pour les comparaisons multiples. Le test d'indépendance du χ^2 , le test exact de Fisher et le t-test ont été utilisés pour comparer les variables initiales chez les patients présentant un phénotype LAM NKp46^{high} ou NKp46^{low}. Le seuil de significativité a été fixé à p<0,05 pour l'ensemble des analyses.

II. Résultats

L'analyse des données de cytométrie de masse comporte 2 parties :

- comparaison des 2 groupes de patients : LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}
- analyse des sous-populations cellulaires NK : NKp46⁺ et NKp46⁻

1. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques des patients, stratifiées selon le niveau d'expression de NKp46, sont résumées dans le tableau 7. Sur la cohorte globale de 21 patients, l'âge moyen au diagnostic est de $48 \pm 10,9$ ans avec 77% de LAM primaires et 23% de LAM secondaires à un cancer solide ou une hémopathie maligne. Au diagnostic, le pourcentage moyen de blastes sanguins circulants est de $46 \pm 32,9\%$. Après induction par chimiothérapie, 95% des patients ont atteint une rémission complète et 38% de ces patients ont rechutés la première année. Le suivi médian après diagnostic est de 5,5 ans pour les patients n'ayant pas rechutés (allant de 6 mois à 10 ans). Les classifications FAB, cytogénétique et ELN ont été déterminées par le laboratoire de biopathologie de l'IPC.

Les patients ont été séparés en deux groupes selon le niveau d'expression de NKp46 en cytométrie de masse (Figure 38). Concernant le statut NKp46, 28,4% des patients analysés ont une forte expression de NKp46 (LAM NKp46^{high}) et 71,6% ont une faible expression de NKp46 (LAM NKp46^{low}) à la surface des cellules NK. Les patients du groupe LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low} présentent des caractéristiques similaires au diagnostic : âge, sexe, classification cytogénétique et ELN, pourcentage de blastes dans le sang et la moelle osseuse ne varient pas significativement entre ces deux groupes (Tableau 7).

Tableau 7 : Caractéristiques des patients.

Caractéristiques des patients		LAM	LAM ^{high} NKp46	LAM ^{low} NKp46	P value
Nombre d'échantillon	n (%)	21	6 (28,6)	15 (71,4)	/
Age (ans)	m(SD)	48,1 (10,9)	44,7 (15,9)	49,4 (9)	0.6683
Sexe Ratio	M/F	14/7	4/2	10/5	1.0000
Statut au diagnostic					
De novo	n (%)	16 (76)	5 (83)	11 (73)	1.000
Transformation d'un SMP	n (%)	1 (5)	0 (0)	1 (7)	
Antécédent de tumeur solide	n (%)	4 (19)	1 (17)	3 (20)	
Evolution					
Patients en RC après l'induction	n (%)	20 (95)	6 (100)	14 (93)	/
Patients réfractaires (pas de RC)	n (%)	1 (5)	0 (0)	1 (7)	
Patient ayant rechuté après la RC	n (%)	8 (38)	2 (33)	6 (40)	
Suivi des patients (mois)					
Médiane de suivi		24	65	21	/
- chez les patients n'ayant pas rechutés		66	98	66	
Globules blancs (GB) (10⁹/L)	m(SD)	33,5 (42,7)	7,9 (4,9)	43,7 (48,4)	0.1498
Hyperleucocytaire (GB > 30 10 ⁹ /L)	n (%)	7 (33,3)	0 (0)	7 (47)	0.0609
Blastes					
Dans le sang (%)	m(SD)	44,5 (32,0)	34 (34,8)	48,7 (32,3)	0.4357
Dans la moelle osseuse (%)	m(SD)	61,2 (26,4)	57,7 (32,3)	62,6 (25,8)	0.8456
Classification FAB					
M0	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	/
M1	n (%)	2 (10)	1 (17)	1 (7)	
M2	n (%)	2 (10)	1 (17)	1 (7)	
M3	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
M4	n (%)	5 (24)	0 (0)	5 (33)	
M4Eo	n (%)	3 (14)	0 (0)	3 (20)	
M5	n (%)	4 (19)	2 (33)	2 (13)	
M6	n (%)	3 (14)	2 (33)	1 (7)	
M7	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Inclassable	n (%)	2 (10)	0 (0)	2 (13)	
Marqueurs moléculaires					
<i>FLT3</i> ^{ITD}	n (nombre de patients testés)	4 (13)	3 (5)	3 (8)	/
<i>NPM1</i>		7 (13)	1 (5)	6 (8)	
<i>CEPBα</i>		0 (3)	0 (2)	0 (1)	
Cytogénétique					
Groupe 1 (Favorable)	n (%)	5 (24)	1 (17)	4 (27)	0.7753
Groupe 2 (Intermédiaire)	n (%)	11 (52)	3 (50)	8 (53)	
Groupe 3 (Défavorable)	n (%)	5 (24)	2 (33)	3 (20)	
Classification ELN					
Groupe 1 (Favorable)	n (%)	10 (48)	1 (17)	9 (60)	0.1864
Groupe 2 (Intermédiaire)	n (%)	6 (29)	3 (50)	3 (20)	
Groupe 3 (Défavorable)	n (%)	5 (24)	2 (33)	3 (20)	
Greffe de cellules souches hématopoïétiques					
Allogreffe	n (%)	6 (29)	3 (50)	5 (33)	/
Autogreffe	n (%)	8 (38)	2 (33)	4 (27)	

2. Comparaison des deux groupes de patients :

LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}

a. Fréquence des populations lymphocytaires

La fréquence des populations lymphocytaires T, B et NK ne diffère pas significativement entre les VS, les patients LAM NKp46^{high} et les patients LAM NKp46^{low} ($p=0,804$, $0,166$ et $0,060$, respectivement ; Figure 39). Des analyses phénotypiques sont donc nécessaires afin d'identifier des différences entre ces groupes.

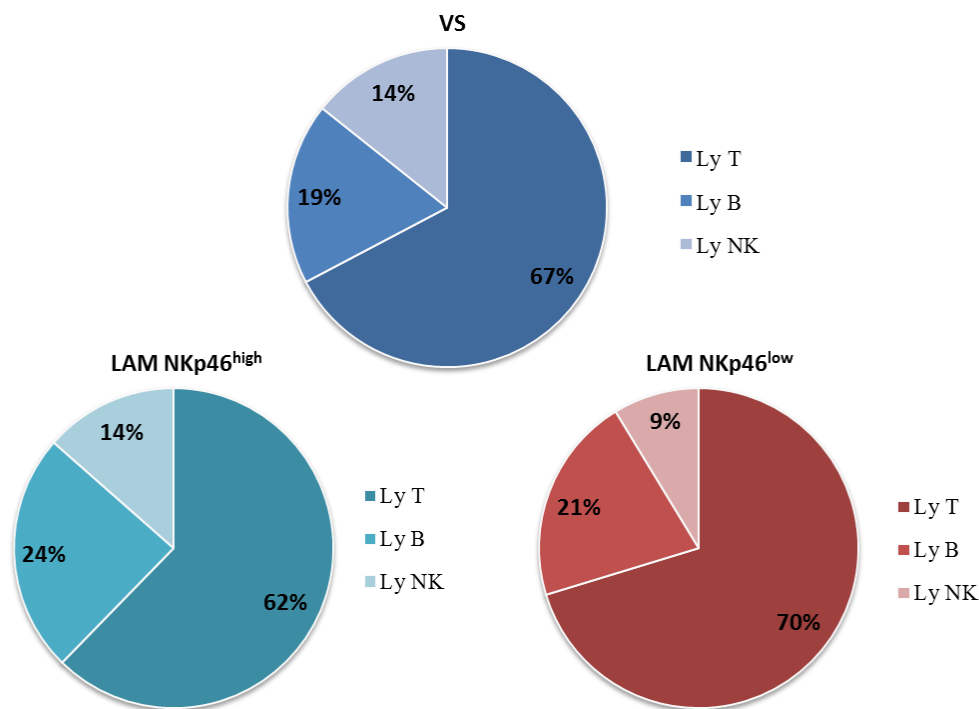


Figure 39 : Fréquence des populations lymphocytaires T, B et NK chez les VS, les patients du groupe LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}.

Fréquence exprimée en pourcentage des lymphocytes totaux. Entre ces 3 groupes, la fréquence des populations lymphocytaires T, B et NK ne varie pas significativement ($p= 0,804$, $0,166$ et $0,060$, respectivement).

b. Profil de maturation des cellules NK

L'algorithme t-SNE a été utilisé pour visualiser en deux dimensions l'ensemble des populations cellulaires NK selon leur état de maturation. Chaque point représente une cellule et sa couleur correspond au niveau d'expression du marqueur sélectionné (gradient de couleur allant du bleu foncé pour une expression nulle, au rouge foncé pour une forte expression). L'algorithme t-SNE a regroupé en « clusters » les cellules présentant un phénotype similaire sur la base de l'expression des marqueurs CD56, NKG2A, KIR (CD158a,h et CD158b1,b2,j), CD57 et NKG2C (Figure 40A). Ainsi, 7 sous-populations cellulaires NK circulantes ont été identifiées, de la plus immature à la plus mature : CD56^{bright} (CD56^{bright} NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻), les cellules NK immatures (CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻), à maturation intermédiaire 1 (CD56^{dim} NKG2A^{+/-} KIR⁻ CD57⁻), intermédiaire 2 (CD56^{dim} NKG2A^{+/-} KIR⁺ CD57⁻) et intermédiaire 3 (CD56^{dim} NKG2A^{+/-} KIR⁻ CD57⁺), les cellules NK matures (CD56^{dim} NKG2A^{+/-} KIR⁺ CD57⁺) et les cellules NK memory-like (CD56^{dim} NKG2A⁻ KIR⁺ CD57⁺ NKG2C⁺) ; conformément à ce qui est décrit dans la littérature.^{106,107,152} La figure 40B présente les trois t-SNE représentatifs de chaque groupe : VS, LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}.

Grâce à cette représentation t-SNE, la répartition cellulaire des sous-populations NK selon leur état de maturation a pu être visualisée en 2D. Dans les LAM, on observe une diminution de fréquence des populations cellulaires NK à maturation intermédiaire 2 (KIR⁺ CD57⁻) et une augmentation de fréquence des populations cellulaires NK à maturation intermédiaire 3 (KIR⁻ CD57⁺), par rapport aux VS (Figure 40B). Le groupe LAM NKp46^{low} présente un enrichissement en populations cellulaires NK immatures (CD56^{dim} NKG2A⁺ KIR⁻ CD57⁻) ainsi qu'une diminution des cellules NK CD56^{bright} et des populations cellulaires NK matures (CD56^{dim} NKG2A^{+/-} KIR⁺ CD57⁺) par rapport au groupe LAM NKp46^{high}, suggérant un appauvrissement en populations cellulaires NK fonctionnelles. Un fenêtrage manuel sur FlowJo® a confirmé la diminution des populations cellulaires NK CD56^{bright} chez les patients LAM NKp46^{low} comparé aux VS (2,2% *versus* 5,0%, et p=0,0240) ainsi qu'une diminution des populations cellulaires NK matures chez les patients LAM NKp46^{low} comparé aux patients LAM NKp46^{high} (15,1% *versus* 29,8%, p=0,0144 ; Figure 40C).

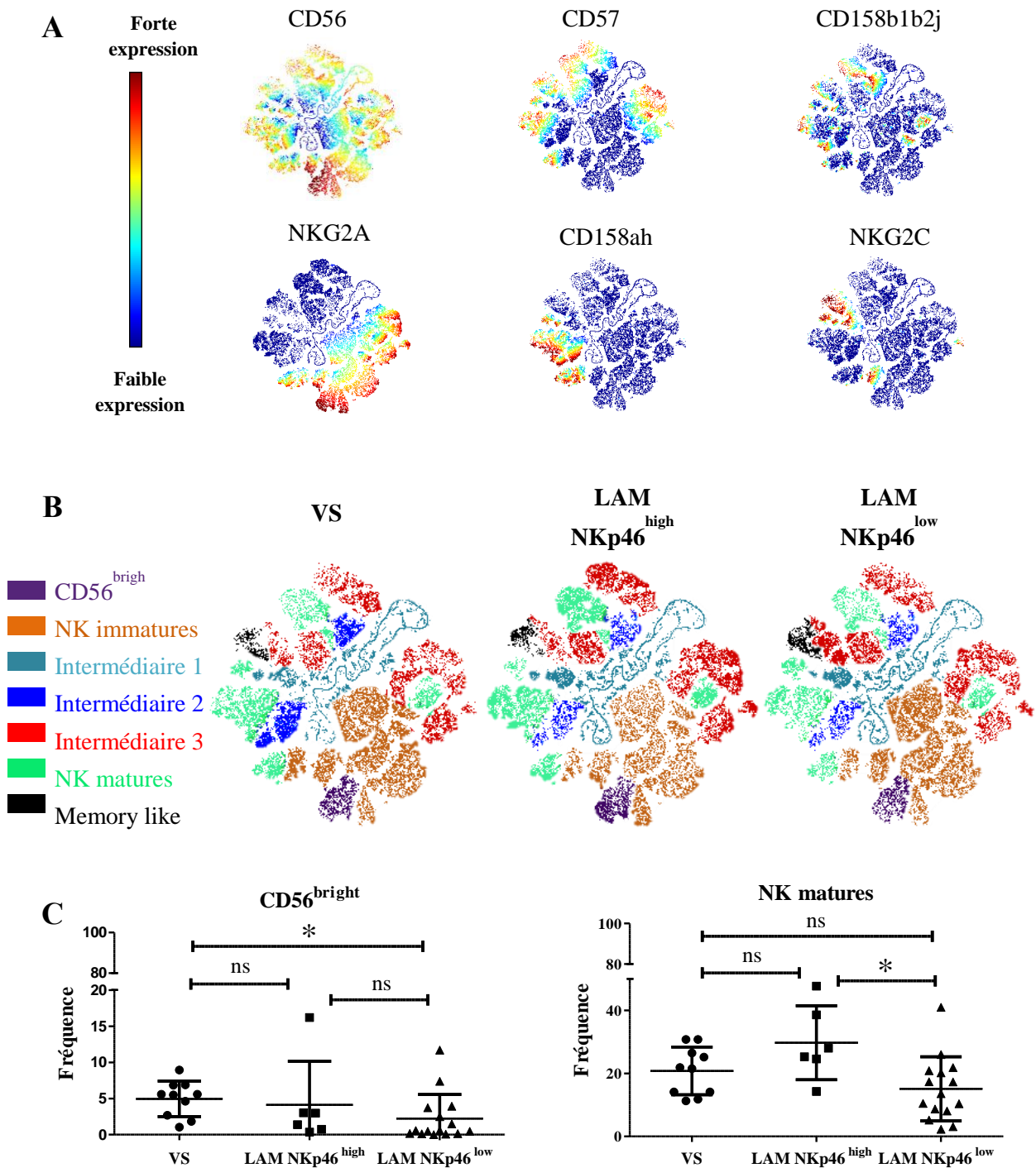


Figure 40 : Le profil de maturation des cellules NK est altéré chez les patients LAM NKp46^{low}

(A) Représentation t-SNE des VS. Le clustering a été effectué selon l'expression des marqueurs de maturation CD56, NKG2A, KIR (CD158a,h et CD158b1,b2,j), CD57 et NKG2C. (B) Représentation t-SNE des populations cellulaires NK des VS et des patients LAM NKp46^{high} et NKp46^{low} selon leur profil de maturation : CD56^{bright} (CD56^{bright} NKG2A⁺KIR⁻CD57⁻), cellules NK immatures (CD56^{dim}NKG2A⁺KIR⁻CD57⁻), à maturation intermédiaire 1 (CD56^{dim}NKG2A^{+/+}KIR⁻CD57⁻), intermédiaire 2 (CD56^{dim}NKG2A^{+/+}KIR⁺CD57⁻) et intermédiaire 3 (CD56^{dim}NKG2A^{+/+}KIR⁻CD57⁺), cellules NK matures (CD56^{dim}NKG2A^{+/+}KIR⁺CD57⁺) et cellules NK memory like (CD56^{dim}NKG2A⁻KIR⁺CD57⁺NKG2C⁺).

(C) Comparaison des fréquences des populations cellulaires NK CD56^{bright} et NK matures chez les VS, les patients LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}. *p<0,05.

c. Caractérisation phénotypique du groupe LAM NKp46^{low}

Parmi les 37 marqueurs analysés, la fréquence d'expression de cinq marqueurs s'est révélée significativement abaissée dans le groupe de patients LAM NKp46^{low} par rapport aux VS (Figure 41A et B). Ainsi, les patients NKp46^{low} présentent une baisse d'expression du récepteur activateur NKp30 comparé aux VS (37,4% *versus* 66,1%, p=0,0016) et des marqueurs de co-activation DNAM-1 (57,2% *versus* 81,4%, p=0,007), CD96 (39,6% *versus* 57,1%, p=0,0074) et CD28 (5,0% *versus* 13,4%, p=0,0015) sur l'ensemble des sous-populations cellulaires NK (Figure 41B). Une co-expression des marqueurs NKp30 et NKp46 est observée (Figure 41A). Enfin, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les patients NKp46^{high} et les VS (Figure 41B).

Pour les VS, la répartition du marqueur CD16 est homogène sur l'ensemble des sous-populations cellulaires NK (à l'exception des NK CD56^{bright}). Dans les LAM, cette répartition est altérée, avec une expression prépondérante du marqueur CD16 sur les populations cellulaires NK matures et à maturation intermédiaire 3 (Figure 41A). De plus, la fréquence d'expression de CD16 est abaissée chez les patients LAM NKp46^{low} comparé aux VS (70,7% *versus* 90,4%, p=0,0081).

L'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-2 est significativement réduite chez les patients atteints de LAM par rapport aux VS (63,1% *versus* 77,1%, p=0,0095) indépendamment de leur statut NKp46 (Figure 41B). Aucune différence significative n'a été retrouvée entre les VS et les patients atteints de LAM NKp46^{high} ou NKp46^{low} sur la fréquence d'expression des récepteurs inhibiteurs KIR (CD158a,h et CD158b1,b2,j), NKG2A, CTLA-4, LAG-3, PD-1, TIGIT, TIM-3, 4-1BB et BTLA ; des récepteurs activateurs NKG2D et NKG2C ; des molécules activatrices ou de costimulation CD27, CD44, CD69, ICOS et OX-40 ; du récepteur aux cytokines IL-2 (CD25) et aux chimiokines CCR7 (CD197) ; du marqueur de prolifération cellulaire Ki67, de la molécule anti-apoptotique Bcl-x1 et du récepteur de mort Fas ou CD95 (p>0,05) (données non montrées).

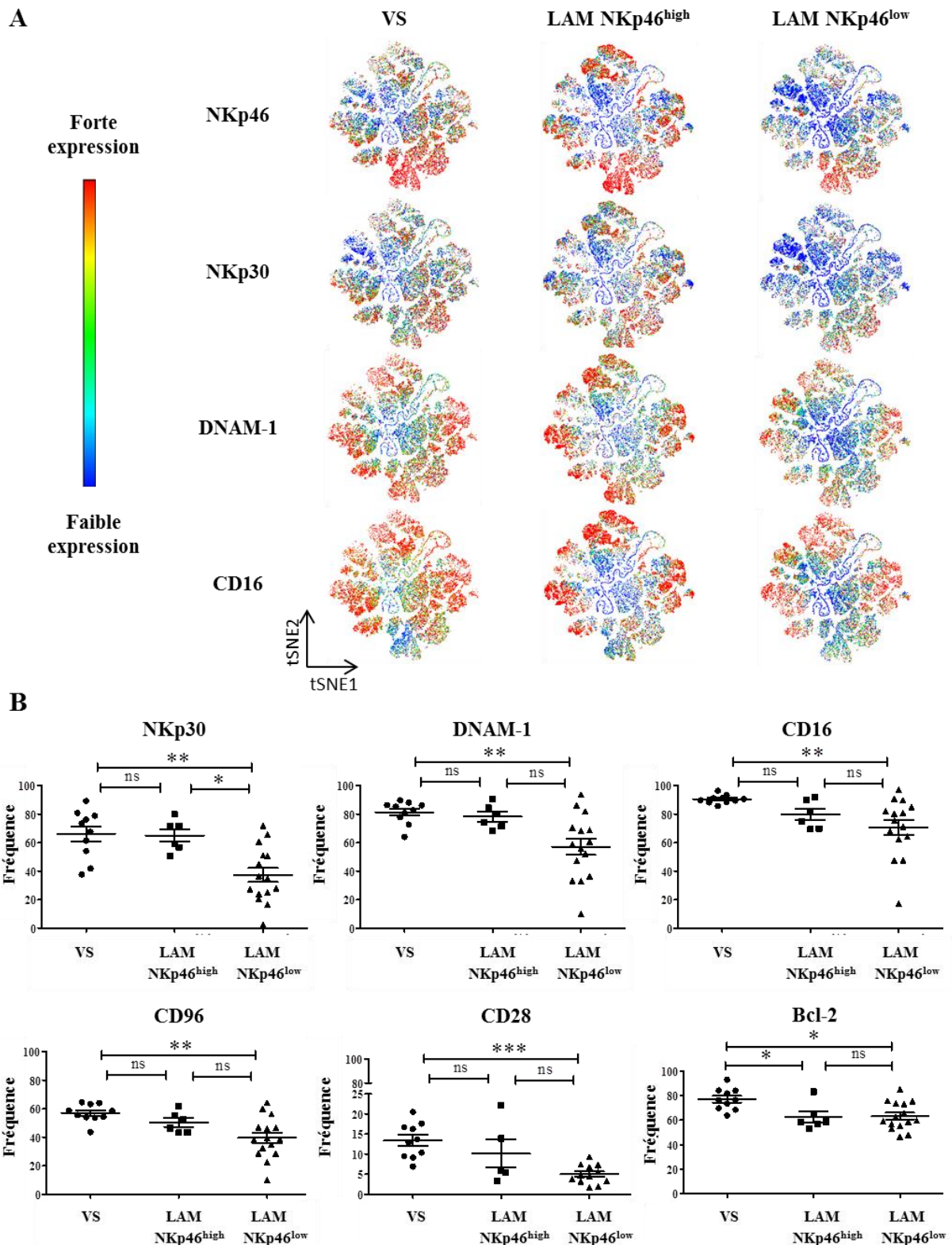


Figure 41 : Les cellules NK des patients LAM NKp46^{low} ont un phénotype hypoactivé.

(A) Représentation t-SNE des populations cellulaires NK montrant l'expression des marqueurs NKp46, NKp30, DNAM-1 et CD16 selon les stades de maturation définis précédemment.

(B) Comparaison des fréquences des cellules NK selon l'expression des marqueurs NKp30, DNAM-1, CD16, CD96 et CD28 entre les 3 groupes (VS, LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}). *p<0,05 ; **p<0,01 et ***p<0,001.

3. Analyse des sous-populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻

a. Fréquence des sous-populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻

Les populations cellulaires NKp46⁺ sont prépondérantes chez les VS (fréquence moyenne des cellules NK : 72,3 ± 11,9 % de NKp46⁺ *versus* 27,7 ± 11,9 % de NKp46⁻). Dans les LAM, la fréquence moyenne des populations NKp46⁺ et NKp46⁻ est identique (49,9 ± 15,1 %), ce qui est cohérent avec la perte d'expression de NKp46 décrite dans les LAM.

b. Caractérisation phénotypique des sous-populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻

✓ Analyse CITRUS®

Afin de vérifier si les altérations observées dans le groupe de patients NKp46^{low} sont spécifiques des populations de NK NKp46⁻ ou si celles-ci affectent la totalité des populations NK, nous avons utilisé l'algorithme CITRUS® pour rechercher des différences phénotypiques entre les populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻. Dans un premier temps, cet algorithme identifie et regroupe sous forme de « clusters » des cellules phénotypiquement similaires. Dans un second temps, une analyse statistique corrélative supervisée est réalisée, permettant la comparaison entre les groupes de patients et VS déterminés préalablement.

L'analyse corrélative entre les groupes NKp46⁺ (VS et LAM) *versus* NKp46⁻ (VS et LAM) a révélé une différence significative sur 85 clusters (FDR ajusté, q-value < 0,01). L'étude des profils de maturation précédemment décrits n'a pas révélé de différence significative entre les populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻ (Figure 42A). En revanche, l'analyse phénotypique de l'ensemble de ces clusters a montré que la perte de NKp46 était associée à la perte de CD16. En effet, les clusters dont la fréquence est augmentée dans les populations cellulaires NKp46⁺ par rapport aux populations cellulaires NKp46⁻ expriment CD16 (Figure 42B, au-dessus de la ligne noire). A l'inverse, les clusters dont la fréquence est abaissée dans les populations cellulaires NKp46⁺ par rapport aux populations cellulaires NKp46⁻ n'expriment pas CD16 (Figure 42B, en-dessous de la ligne noire). La perte de CD16 sur les populations cellulaires NKp46⁻ comparé aux populations cellulaires NKp46⁺ a été vérifiée par analyse manuelle (82,8% *versus* 91,8%, p=0,0101 chez les VS ; 59,6% *versus* 83,1%, p=0,0004 chez les patients) (Figure 42C). Cette perte de CD16 sur les populations cellulaires NKp46⁻ est majorée chez les patients atteints de LAM par rapport aux VS (59,6% *versus* 82,8%, p=0,0022). Le marqueur CD16, récepteur de faible affinité du fragment constant Fc des Ig, est responsable de la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). La perte concomitante des marqueurs d'activation NKp46 et CD16, suggère une hypo-fonctionnalité de ces cellules NK.

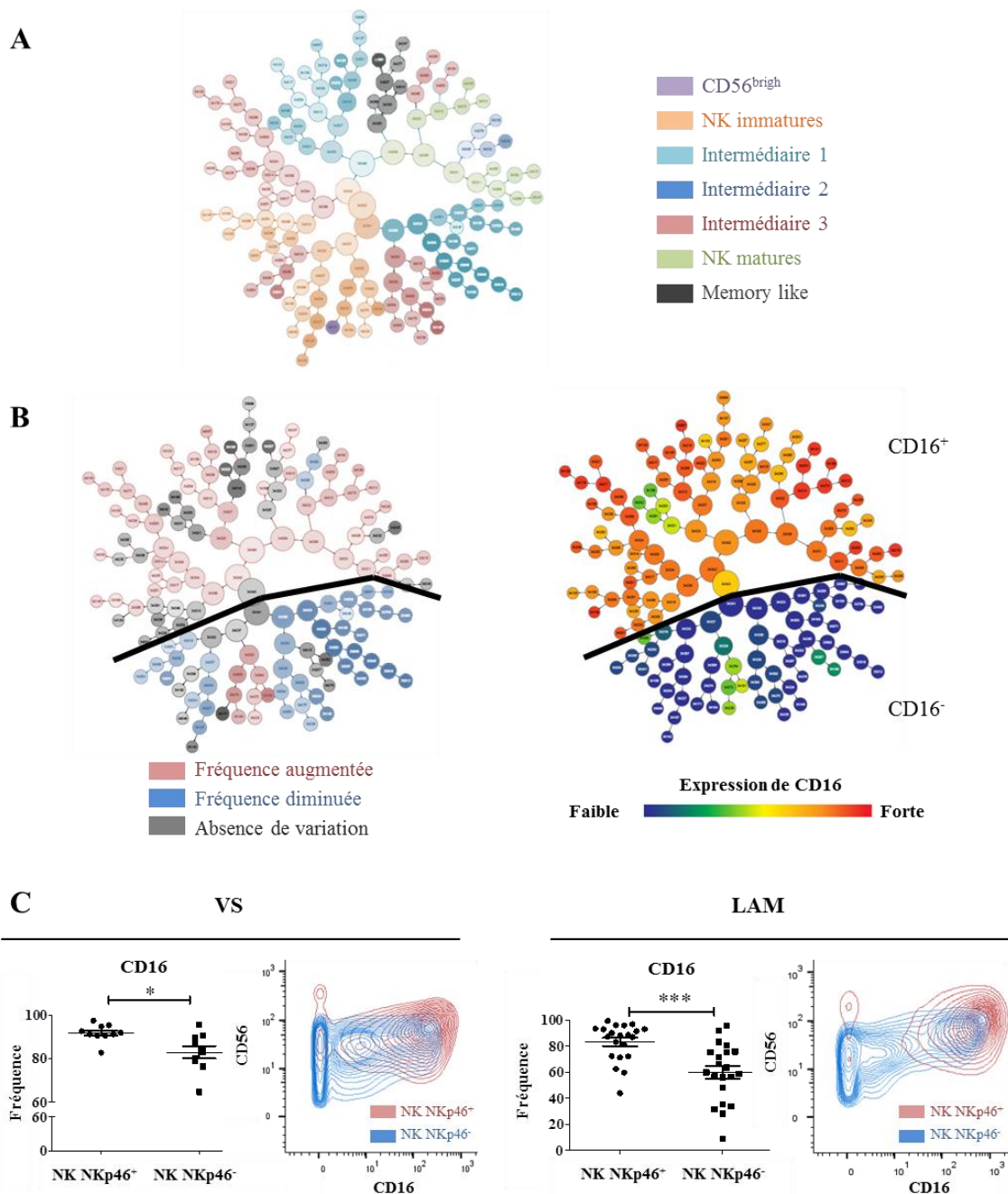


Figure 42 : La perte de NKp46 est fortement associée à la perte de CD16.

(AB) Arbre CITRUS généré à partir des sous-populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ des VS (n=10) et LAM (n=18). Chaque cluster représente un ensemble de cellules dont le phénotype est similaire (Annexe 3). (A) Arbre annoté selon les stades de maturation précédemment décrits. (B) A gauche, représentation de l'analyse comparative des populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻, où les clusters dont la fréquence est augmentée sont colorés en rouge ; diminuée, en bleu ; et sans variation, en gris. A droite, représentation de l'expression de CD16 sur l'ensemble des clusters identifiés par CITRUS. La ligne noire sépare les clusters exprimant CD16 (en haut) de ceux n'exprimant pas CD16 (en bas). (C) Comparaison des fréquences d'expression de CD16 dans les sous-populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ chez les VS (à gauche) et les patients atteints de LAM (à droite). Les *contour plot* représentent l'expression de CD16 sur les populations cellulaires NK NKp46⁺ (en rouge) et NKp46⁻ (en bleu). *p<0,05 ; ***p<0,001.

✓ Analyse manuelle

Après un fenêtrage manuel à l'aide du logiciel FlowJo®, les fréquences des marqueurs NKp30, NKG2A, NKG2C, NKG2D, DNAM-1, CD16, CD27, CD96, Ki-67, Bcl-2, Bcl-xl, CD158b1,b2,j, CD158a,h, CD57 et CD45RA sur les populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻ chez les VS et les patients atteints de LAM ont été comparées. Un clustering hiérarchique a été effectué pour résumer les différences phénotypiques entre ces populations (Figure 43A et B).

Chez les VS, la fréquence d'expression de NKG2A est augmentée sur les cellules NK NKp46⁺ par rapport aux cellules NK NKp46⁻ (56,9% *versus* 36,1%, $p=0,0185$). Ces résultats concordent avec l'expression de NKp46 selon le profil de maturation des cellules NK ; NKp46 étant plus fortement exprimé sur les cellules NK CD56^{bright} qui expriment le marqueur NKG2A.

Les marqueurs CD27, CD96, NKp30, DNAM-1, NKG2D, CD16 et CD45RA, sont significativement abaissés dans la population cellulaire NK NKp46⁻ par rapport à la population cellulaire NK NKp46⁺ (exemple NKG2D : 78% *versus* 92,1% chez les VS et 70,7% *versus* 88,2% chez les patients atteints de LAM, respectivement ; Figure 43C). Ces différences, communes entre les VS et les patients, suggèrent une signature phénotypique propre de la population cellulaire NKp46⁻, phénotype principalement hypo-activé.

Des caractéristiques phénotypiques propres aux patients atteints de LAM ont été retrouvées, suggérant l'imputabilité des blastes sur les cellules NK. Ainsi, dans la population cellulaire NK NKp46⁻, les marqueurs activateurs NKp30 et CD16 sont diminués dans les LAM par rapport aux VS (NKp30 : 30,1% *versus* 44,6%, $p=0,0365$; CD16 : 59,6% *versus* 82,8%, $p=0,0022$). De plus, le récepteur inhibiteur KIR CD158b1,b2,j est abaissé dans la population NKp46⁻, uniquement chez les patients atteints de LAM ($p=0,0315$). Enfin, aucune différence significative n'a été retrouvée sur la fréquence d'expression des marqueurs NKG2C, CD158a,h, Ki67, Bcl-2 et Bcl-xl.

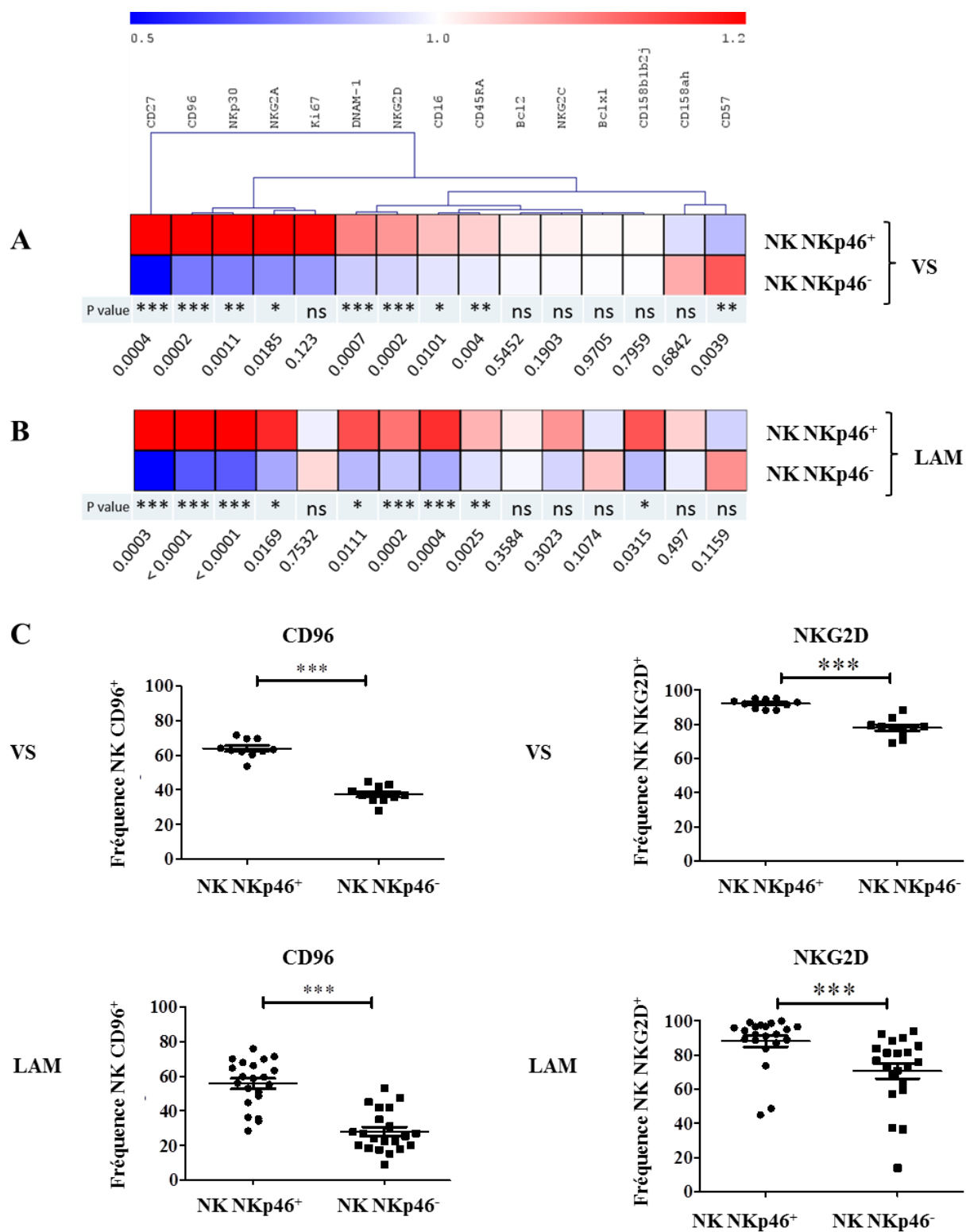


Figure 43 : La population cellulaire NK NKp46⁻ exprime un phénotype majoritairement hypoactifé.

(A/B) Classification hiérarchique (distance Manhattan) des marqueurs exprimés à la surface des cellules NK selon la présence ou l'absence du marqueur NKp46 des échantillons (A) de VS (n=10) ou (B) de LAM (n=21). (C) Comparaison des fréquences d'expression de CD96 et NKG2D dans les sous-populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ chez les VS et les patients atteints de LAM. *p<0,05 ; **p<0,01 ; ***p<0,001.

III. Discussion

Les LAM sont des hémopathies malignes immunosensibles, comme en témoigne l'importance de l'allogreffe de CSH dans la prise en charge thérapeutique des LAM. Les cellules NK, dotées de cytotoxicité naturelle, exercent une forte activité anti-tumorale sur les cellules leucémiques, affectant le pronostic clinique des patients.¹³⁸ Devant leurs capacités effectrices et leur profil de tolérance¹¹⁴, les cellules NK sont de plus en plus étudiées en oncologie. En effet, de nombreuses thérapies ciblant les cellules NK sont en cours de développement dans la prise en charge des LAM : transfert adoptif de cellules NK allogéniques, utilisation d'inhibiteurs de checkpoints et de CAR-NK cells.¹⁵³ Ces stratégies thérapeutiques peuvent cibler différents récepteurs activateurs ou inhibiteurs afin d'exacerber ou de restaurer les fonctions cytotoxiques des cellules NK. Parmi eux, le récepteur activateur NKp46, joue un rôle clé dans le déclenchement de la cytotoxicité médiée par les cellules NK.¹³⁰ De plus, ce marqueur présente un intérêt clinique majeur dans les LAM en tant que biomarqueur prédictif de réponse à l'allogreffe.¹⁴⁸ Dans ce contexte, l'objectif principal de cette étude est de réaliser une caractérisation phénotypique des cellules NK chez les patients présentant une altération de NKp46 au diagnostic de LAM. A ce jour, ce projet est la première étude descriptive des sous-populations cellulaires NK NKp46 positives et négatives, dans le contexte des LAM.

Afin d'établir un profil phénotypique précis, une technique multiparamétrique a été utilisée : la cytométrie de masse. L'utilisation de deux panels regroupant une trentaine de marqueurs chacun nous permet d'étudier simultanément l'état d'activation, d'inhibition, de prolifération et de survie des différentes sous-populations cellulaires NK, selon leur stade de maturation. L'utilisation d'algorithmes automatisés adaptés aux données générées par la cytométrie de masse est possible devant la qualité des marquages obtenue après une première phase d'optimisation du protocole. Une des forces de cette étude est l'utilisation d'outils bio-informatiques comme CITRUS®, afin de déterminer des différences statistiques tout en limitant les risques de sur-apprentissage.¹⁵¹ L'effectif restreint du groupe LAM NKp46^{high} (n=6) pourrait être un facteur limitant pour l'interprétation des résultats obtenus. Or, cet effectif est suffisant pour utiliser l'algorithme CITRUS®. De plus, des résultats connus en cytométrie en flux, comme la perte concomitante des récepteurs NKp46 et NKp30 et/ou DNAM-1,¹³⁹⁻¹⁴¹ sont retrouvés dans cette cohorte clinique. En revanche, cet effectif est limitant pour l'utilisation de tests statistiques comme le test d'indépendance χ^2 ou l'analyse de survie (test du log rank).

Dans notre étude, nous avons montré que la fréquence des populations cellulaires NK matures et CD56^{bright} est diminuée chez les patients du groupe LAM NKp46^{low}. La perte de ces populations cellulaires altère non seulement la fonctionnalité des cellules NK, mais aussi la réponse immune anti-tumorale de manière globale. En effet, les cellules NK CD56^{bright} alimentent le pool de cellules NK par leur pouvoir prolifératif et orchestrent la réponse immunitaire adaptative par la sécrétion d'interféron γ .¹⁰⁶ De plus, les cellules NK matures, exprimant le marqueur CD57, sont les cellules NK les plus cytotoxiques.¹⁰⁸ La perte de NKp46 associée à la modification du profil de maturation des cellules NK accentuerait donc l'hypo-fonctionnalité des cellules NK. Cette hypothèse doit être vérifiée *in vitro* à l'aide de tests fonctionnels.

Dans les LAM, des modifications du profil de maturation ont été décrites et ces profils présentent un impact pronostic fort.^{154,155} En effet, le blocage de maturation des cellules NK est associé à un pronostic péjoratif chez ces patients, avec des taux de survie globale à 3 ans de 12% *versus* 57% pour des profils de maturation plus avancés.¹⁵⁵ Dans notre étude, ces trois profils de maturation sont retrouvés (Annexe 4). Parmi les 21 échantillons de LAM, 3 (14,3%) présentent un profil de maturation bloqué à des stades précoces avec majoritairement des cellules NK CD56^{bright} et KIR⁻CD57⁻, conformément à ce qui a été décrit précédemment dans l'équipe du Pr Olive.¹⁵⁵ Ce blocage de maturation est présent uniquement chez les patients du groupe LAM NKp46^{low} (n=3/15) ; les VS présentant majoritairement un profil de maturation intermédiaire (n=8/10) et les patients du groupe LAM NKp46^{high} se répartissant entre les stades de maturation intermédiaire (n=3/6) et avancés (n=3/6). Le blocage de maturation présent uniquement dans le groupe de patients LAM NKp46^{low} laisse suggérer un pronostic péjoratif. Ces résultats doivent cependant être contrôlés sur un effectif plus important. En effet, le faible effectif total ne permet pas de mettre en évidence une corrélation significative entre NKp46 et le profil de maturation.

Nous avons mis en évidence des profils phénotypiques particuliers chez les patients LAM NKp46^{low}. De façon globale, ce groupe de patients présente une diminution significative de l'expression du récepteur activateur NKp30, du récepteur CD16 impliqué dans l'ADCC, de la molécule de costimulation CD28 et des corécepteurs DNAM-1 et CD96, impliqués dans l'amplification de l'activation des cellules NK médiée par les récepteurs activateurs. Dans les LAM, la perte de l'un de ces récepteurs activateurs affecte négativement le pronostic des patients [NKp30¹⁴⁵ ; NKG2D et DNAM-1 (en préparation, *Chretien et al.*)]. L'impact clinique de la perte concomitante de ces 6 marqueurs activateurs NK n'a jamais été étudié mais laisse supposer une valeur pronostique d'autant plus péjorative.

Chez certains patients, la perte de NKp46 n'est pas associée à une perte des autres récepteurs activateurs : une hétérogénéité est donc présente au sein du groupe de patients LAM NKp46^{low}. En effet, 20% des patients (n=3/15) présentent une perte de NKp46 sans perte concomitante de NKp30 (*versus* 15,5% sur la cohorte de *Fauriat et al.*¹⁴⁰), NKG2D, CD16, CD96 ou DNAM-1 (Figure 41B). Ainsi, la présence d'un statut discordant entre ces différents récepteurs activateurs permet d'obtenir des informations complémentaires. La combinaison de ces variables permettrait d'établir une signature NK pour stratifier les patients dès le diagnostic, sur le même principe que l'Immunoscore® développé par *Galon et al.*¹⁵⁶ pour le cancer colorectal. L'impact d'un statut discordant entre NKp46 et NKp30 et/ou NKG2D et/ou DNAM-1 doit être évalué sur une cohorte de patients plus large (en préparation, *Chretien et al.*).

Le phénotype des cellules NK du groupe de patients LAM NKp46^{low} possède des caractéristiques communes avec le phénotype des sous-populations cellulaires NK NKp46⁻ : baisse d'expression des marqueurs activateurs NKp30, CD16, DNAM-1 et CD96. Ces similitudes concordent avec la proportion plus importante de cellules NK NKp46⁻ dans le groupe LAM NKp46^{low} par rapport au groupe LAM NKp46^{high} (57,8 ± 17,8% *versus* 30,1 ± 8,2%, respectivement ; p=0,0009). Cette perte des récepteurs activateurs NKp46 et NKp30,^{139,140} DNAM-1¹⁴¹ ou CD16^{139,141} est en accord avec les données de la littérature dans les LAM. De plus, ces altérations phénotypiques NK sont retrouvées dans d'autres tumeurs solides, comme le cancer gastrique (perte de NKp46, NKp30, NKG2D et DNAM-1 chez les patients par rapport aux VS).¹⁵⁷

La caractérisation phénotypique des cellules NK NKp46⁻ révèle une perte d'expression de nombreux marqueurs impliqués dans l'activation des cellules NK : CD27, CD96, NKp30, DNAM-1, NKG2D et CD16. Ceci laisse s'interroger sur l'état fonctionnel de ces cellules NK NKp46⁻. La cytotoxicité des cellules NK NKp46⁻ pourrait être testée *in vitro* après co-culture avec des lignées cellulaires érythro-leucémiques K562. De plus, l'ADCC pourrait également être testée *in vitro* par co-culture avec des lignées cellulaires P815 préalablement marquées par des anticorps. L'étude de la fonctionnalité des populations cellulaires NK NKp46⁻ permettrait d'orienter la stratégie thérapeutique à adopter. En effet, si ces cellules sont épuisées et non fonctionnelles, des traitements stimulant les cellules NK seraient inefficaces. En revanche, si ces cellules restent fonctionnelles après activation, des traitements visant à restaurer l'expression du récepteur NKp46 pourraient être utilisés, tels

que l'IL-15,¹⁵⁸ l'association d'histamine dihydrochloride et d'IL-2 recombinante humaine¹⁵⁹ ou encore le monométhyl fumarate (MMF), métabolite du diméthyl fumarate utilisé dans le traitement de la sclérose en plaque. En effet, le MMF amplifie *in vitro* la lyse des cellules tumorales médiées par les cellules NK en augmentant l'expression de NKp46 à leur surface.¹⁶⁰ Ainsi, l'utilisation de traitements spécifiques ciblant le récepteur activateur NKp46 serait possible chez tous les patients atteints de LAM.

Enfin, dans le contexte actuel de développement de ciblage thérapeutique des blastes leucémiques et des cellules NK par des anticorps bispécifiques, ce travail permet d'anticiper les besoins d'immunomonitoring associés à ces molécules. Grâce à leur bivalence, ces anticorps permettent la formation d'une synapse immunologique, en liant une molécule de surface sur le blaste leucémique (CD33, NKG2D ligand...) à un récepteur de surface NK (exemple : CD16).^{161,162} Plus récemment, des anticorps tri-spécifiques ont été développés liant NKp46 et CD16 à un antigène tumoral (Figure 44).¹⁶³ Il est donc possible d'anticiper les mécanismes de résistance liés à une perte d'expression des récepteurs ciblés par ces anticorps, notamment en cas de perte concomitante de CD16 et NKp46.

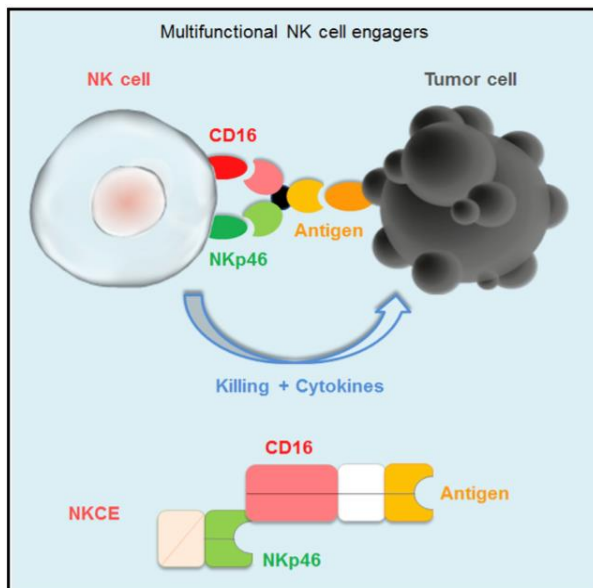


Figure 44 : Anticorps trispécifique ciblant les récepteurs activateurs NKp46 et CD16 sur les cellules NK et un antigène tumoral sur les cellules cancéreuses.

D'après Gauthier et al., *Cell*, 2019.

Abréviations : antigen : antigène ; killing : lyse cellulaire ; NK cell : cellules NK ; NKCE : NK cell engagers ; tumor cell : cellule tumorale

IV. Conclusion et perspectives

Cette étude a permis d'établir un immunophénotypage complet des cellules NK des patients atteints de LAM présentant une altération de NKp46 au diagnostic. Ainsi, les patients du groupe LAM NKp46^{low} possèdent des cellules NK hypoactivées (baisse d'expression des récepteurs activateurs NKp30 et CD16, et des récepteurs co-activateurs DNAM-1, CD96 et CD28). L'analyse secondaire des cellules NK NKp46 positives et négatives, a permis de caractériser une nouvelle population cellulaire, NKp46⁻, majoritairement présente chez les patients atteints de LAM.

Ces résultats soulèvent différentes questions : ces altérations phénotypiques sont-elles présentes sur d'autres effecteurs immuns impliqués dans la surveillance anti-tumorale ? Le mécanisme impliqué dans ces altérations est-t-il général ou spécifique des cellules NK ?

Ce travail ouvre donc des perspectives de recherche sur l'étude des autres populations immunes et sur la compréhension des mécanismes impliqués dans l'échappement tumoral au système immunitaire. Les populations cytotoxiques TCD8 et T $\gamma\delta$ pourront être étudiées sur cette même cohorte clinique pour corréler les différentes altérations phénotypiques retrouvées sur les cellules NK. A terme, ce projet permettra de développer de nouvelles approches thérapeutiques visant à restaurer les fonctions effectrices de l'immunité anti-leucémique.

**PARTIE II : Recueil et analyse des
données obtenues depuis la mise en
place de la caractérisation
phénotypique des cellules NK dans les
LAM au laboratoire de biopathologie
de l’Institut Paoli-Calmettes**

I. Matériels et méthodes

1. Etude monocentrique prospective

a. Historique de l'étude

L'évaluation des profils immunologiques et l'analyse fonctionnelle des populations immunes est la spécialité du service de recherche d'immunomonitoring des tumeurs du Professeur Olive. La caractérisation phénotypique des cellules NK dans la leucémie aiguë myéloïde est un important sujet de recherche au sein de cette équipe, ayant permis l'obtention de nombreuses publications et brevets (EP17305151.7, 2017 et WO2015144841 A1, 2015).^{139,140,145,148,154,155,164}

L'étroite collaboration de cette équipe de recherche du CRCM avec les équipes cliniques (service d'onco-hématologie du Pr Vey) et biologiques (laboratoire de biopathologie du Pr Xerri) de l'Institut Paoli-Calmettes a permis la mise en place de ce projet translationnel depuis décembre 2017.

Cette étude permet de vérifier sur une nouvelle cohorte prospective la valeur prédictive de réponse à l'allogreffe de NKp46 dans la LAM, afin de mettre en place son utilisation en pratique clinique courante.

b. Design de l'étude

Depuis décembre 2017, l'expression du marqueur NKp46 à la surface des cellules NK est déterminée par cytométrie en flux au laboratoire de biopathologie de l'IPC chez tous les patients atteints de LAM au diagnostic.

Il s'agit donc d'une étude monocentrique réalisée au sein du laboratoire de biopathologie de l'Institut Paoli-Calmettes à Marseille. Cette étude est prospective et observationnelle : le statut NKp46 est actuellement rendu à titre indicatif au clinicien. L'ensemble des patients inclus dans cette étude ont signé un consentement éclairé conformément à la déclaration d'Helsinki.

2. Patients

a. Population étudiée

Le recueil des données cliniques et phénotypiques a été effectué sur l'ensemble des patients où l'expression de NKp46 a été obtenue au laboratoire de l'IPC, entre décembre 2017 et décembre 2019, soit un total de 138 patients.

Afin de comparer les données obtenues sur notre cohorte prospective aux données publiées en 2017,¹⁴⁸ nous avons retenu les critères d'inclusion et d'exclusion suivants :

- le diagnostic de LAM a été affirmé par myélogramme et immunophénotypage des blastes, selon les critères de l'OMS²³ ;
- les LAM3 ou promyélocyaires ont été exclues de l'étude devant leur pronostic favorable lié à la présence d'un traitement spécifique ;
- les LAM en rechute dont le statut NKp46 au diagnostic n'a pas été réalisé ont été écartées de l'étude (la valeur prédictive de NKp46 ayant été démontrée sur une cohorte de patients au diagnostic).

Une analyse de sous-groupe a été effectuée afin de correspondre parfaitement aux critères retenus pour la cohorte publiée ; la valeur prédictive de NKp46 ayant été démontrée uniquement chez les sujets âgés de moins de 65 ans ayant reçu un traitement d'induction intensif par anthracyclines et cytarabine selon le schéma d'administration « 3+7 ».¹⁴⁸ Dans cette analyse, les patients réfractaires n'ayant pas atteint de rémission complète après le traitement d'induction ont été écartés ; les courbes de survie sans rechute ayant été établies à partir de la date d'obtention de la rémission complète.

b. Echantillons

Les prélèvements ont été réalisés dans le service d'Hématologie de l'IPC, simultanément aux prélèvements effectués pour poser le diagnostic de LAM. En systématique, un tube de sang total périphérique a été prélevé sur tube EDTA K2 pour l'analyse phénotypique des cellules NK.

Le marquage cellulaire et l'acquisition sur les cytomètres en flux du laboratoire ont été effectués dans un délai de 48h maximum après la réalisation du prélèvement. L'ensemble des acquisitions a été réalisé sur sang frais afin d'éviter une éventuelle modification d'expression des marqueurs antigéniques (et notamment de NKp46) liée à la décongélation.

3. Cytométrie en flux

a. Principe

La cytométrie en flux est la technique de référence utilisée en immunophénotypage. Largement utilisée en hématologie,¹⁶⁵ la cytométrie en flux est indispensable au diagnostic des hémopathies malignes et donc des leucémies aiguës myéloïdes. L'immunophénotypage permet d'analyser simultanément un ensemble de paramètres cellulaires au sein d'une suspension cellulaire hétérogène, grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux. Ce procédé multiparamétrique automatisé permet d'acquérir plusieurs milliers d'évènements par seconde.

La suspension cellulaire est préalablement marquée par un panel d'anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes avant d'être introduite dans le cytomètre en flux. Le cytomètre en flux est un appareil complexe composé de trois principaux systèmes : fluïdique, optique et électronique. Le système fluïdique du cytomètre permet d'introduire et de positionner correctement les cellules de l'échantillon, afin qu'une analyse individuelle « cellule à cellule » soit réalisable. Grâce à un processus d'hydrofocalisation, chaque cellule va passer une à une devant les différents lasers, appartenant au système optique. Ce dernier permet à la fois de produire et de recueillir le signal lumineux. Ainsi, le système optique d'excitation est composé de lasers, permettant d'exciter les fluorochromes couplés aux anticorps fixés à la surface des cellules, et de lentilles, permettant de focaliser le faisceau lumineux. Le système optique de réception se compose quant à lui d'une lentille permettant de collecter la lumière émise et d'un ensemble de miroirs et filtres optiques permettant de diriger les longueurs d'onde spécifiques sur leurs détecteurs correspondants. Enfin, le système électronique convertit le signal lumineux en signal électronique grâce à des photomultiplicateurs et assure le transfert des données vers le système informatique (Figure 45).

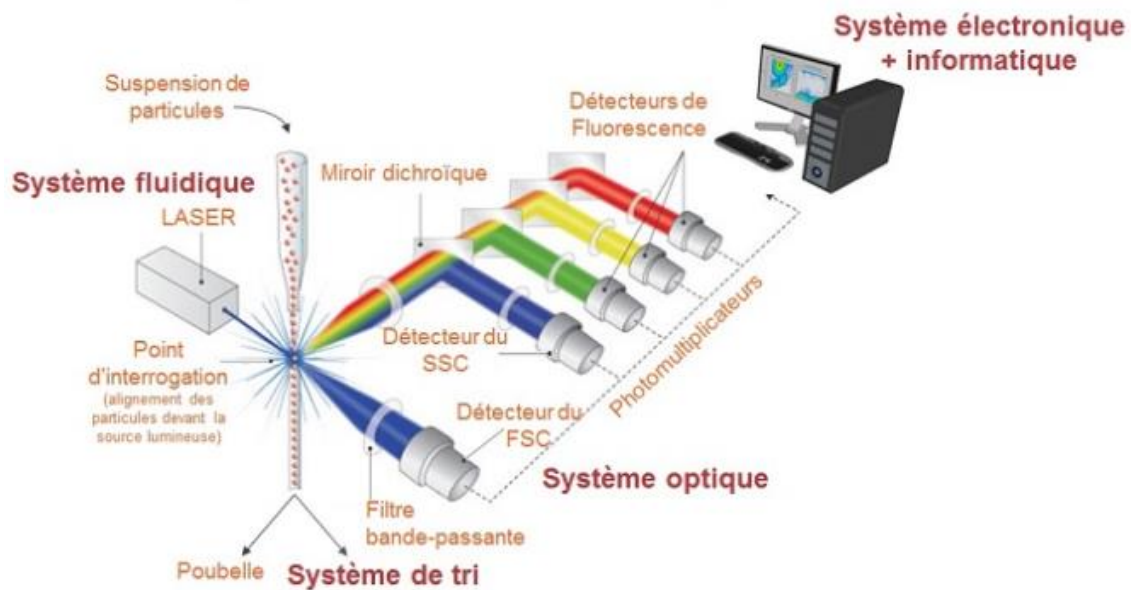


Figure 45 : Principaux systèmes composant un cytomètre en flux.

L'image appartient à l'université de Reims : <https://www.univ-reims.fr/site/plateaux-techniques/plateau-technique-de-cytometrie-en-flux,17140,31442.html>

La déviation des faisceaux lasers provoquée par la cellule et mesurée dans son axe et sa perpendiculaire permet d'obtenir des propriétés intrinsèques de la cellule, à savoir sa taille et sa granularité relatives, nommée FSC pour *forward scatter* et SSC pour *side scatter*, respectivement. L'intensité relative de fluorescence reflète le niveau d'expression des antigènes membranaires préalablement marqués par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes spécifiques. La présence d'un antigène à la surface d'une cellule peut s'exprimer en pourcentage de cellules positives pour ce marqueur ou en moyenne d'intensité de fluorescence (MFI).

b. Pré-traitement et marquage des échantillons

Le sang total recueilli sur tube EDTA est agité 2 à 3 minutes sur l'agitateur. Une numération cellulaire est systématiquement effectuée en parallèle sur une fraction de l'échantillon clinique afin d'obtenir le taux de leucocytes circulants. Ainsi, les prélèvements ayant une cellularité dépassant les 15 G/L doivent être dilués dans du PBS 1% SVF afin d'ajuster la concentration à environ 10 millions de cellules par ml (soit 10 G/L).

La suspension cellulaire est ensuite marquée par un panel d'anticorps couplés à des fluorochromes. Ce panel d'anticorps, préalablement testé et validé, permet de détecter 8 antigènes membranaires :

- les marqueurs de fenêtrage des cellules : CD45, CD3 et CD56
- les marqueurs d'activation des cellules NK : NKp30 et NKp46
- les marqueurs impliqués dans la maturation des cellules NK : NKG2A, CD57 et les récepteurs KIR CD158a et b

Un tube contrôle contenant les marqueurs de gating et les témoins isotypiques correspondant aux marqueurs d'intérêt a systématiquement été passé en parallèle afin de déterminer le seuil de positivité ; la séparation des populations positive et négative étant parfois délicate.

Le marquage s'effectue par incubation de ce panel d'anticorps sur une prise d'essai de 100 µl de sang total, pendant 15 minutes à température ambiante à l'obscurité ; les fluorochromes étant sensibles à la lumière. La suspension cellulaire est ensuite lysée et lavée dans l'appareil « Lyse Wash » utilisant le réactif *VersaLyse Lysing Solution* de Beckman Coulter®, afin d'éliminer les globules rouges et les anticorps en excès non fixés.

c. Acquisition

Après centrifugation, les cellules sont remises en suspension dans 300 µl de PBS. Cette suspension cellulaire peut être placée au réfrigérateur à +4°C à l'abri de la lumière dans l'attente du passage au cytomètre ; l'acquisition ne devant pas être effectuée plus de deux heures après le marquage.

Les échantillons sont acquis sur l'un des deux cytomètres FACS CANTO II de Becton Dickinson® (BD) appartenant à la plateforme d'immunophénotypage du laboratoire de biopathologie de l'Institut Paoli-Calmettes. L'acquisition est aléatoire entre ces deux cytomètres ; les deux cytomètres étant standardisés et la stabilité des lasers étant vérifiée tous les matins lors du passage des *Rainbow beads*. L'acquisition est arrêtée lorsque 4 000 événements ont été enregistrés dans la fenêtre d'analyse des cellules NK (de phénotype CD3⁻CD56⁺).

La source d'excitation lumineuse des cytomètres FACS CANTO II se compose de trois lasers, un violet (405 nm), un bleu (488 nm) et un rouge (633nm) permettant d'utiliser la combinaison de fluorochromes suivant : Krome Orange, FITC (Fluorescéine isothiocyanate), Alexa Fluor 750, PE (phycoérythrine), PE-Cyanine 7 (PE-Cy7), APC (allophycocyanin), PE Cy5.5 et Pacific Blue. Les spectres d'émission de ces différents fluorochromes sont représentés sur la figure 46. Ces fluorochromes ne correspondent pas à ceux habituellement utilisés dans le laboratoire mais correspondent à ceux mis au point pour la cohorte de Chretien et al.¹⁴⁸ Des tests préalables de standardisation des cytomètres entre le cytomètre Fortessa du CRCM et les FACS Canto II de l'IPC ont été réalisés dans le cadre de la thèse d'exercice de D. Sciortino. La quantité d'anticorps utilisée a également été optimisée en vue d'économiser les anticorps de fenêtrage sans modifier les anticorps d'intérêt. L'objectif de la conservation des fluorochromes et des volumes d'anticorps d'intérêt de ce panel est de permettre l'utilisation de réactifs dessiqués (Duraclone) dans un partenariat avec l'entreprise Beckman Coulter®.

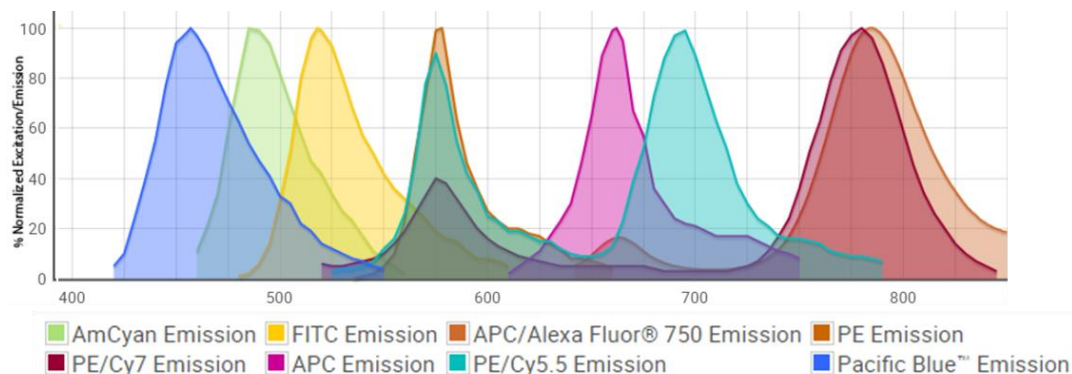


Figure 46 : Spectres d'émission des fluorochromes utilisés dans le panel de caractérisation phénotypique des cellules NK dans la LAM.

La superposition des spectres d'émission PE-Cy 7 et Alexa Fluor 750 est possible car ces fluorochromes ne sont pas excités par les mêmes lasers (laser bleu à 488nm et laser rouge à 633 nm, respectivement). La superposition des autres spectres nécessite des compensations. Ces spectres ont été obtenus via le site internet : <https://www.biolegend.com/en-us/spectra-analyzer>.

d. Traitement et analyses des données

Après chaque acquisition, les données sont analysées par les biologistes du laboratoire en utilisant le logiciel BD FACSDiva®. Afin d'éviter les éventuels biais inter-opérateurs, j'ai réexporté les données phénotypiques de l'ensemble des patients et réanalysé l'intégralité de ces données sur le logiciel FlowJo® (v10.6.2).

La stratégie de fenêtrage manuel consiste dans un premier temps à éliminer les débris cellulaires en posant un seuil arbitraire basé sur la taille à 50000. Ensuite, les lymphocytes sont sélectionnés selon leur faible granularité (SSC) et leur forte intensité du marqueur pan-leucocytaire CD45. Le fenêtrage des lymphocytes permet en même temps d'éliminer les blastes myéloïdes. Les cellules NK sont ensuite isolées au sein de cette population lymphocytaire sur la base de l'expression du marqueur CD56 et de l'absence d'expression du CD3 (Figure 47A).

La positivité des marqueurs NKp30 et NKp46 sur les cellules NK a été fixée selon le témoin isotypique et un témoin interne (les lymphocytes T CD3⁺ n'exprimant pas ces marqueurs) ; l'absence de « vallée phénotypique » étant fréquente dans l'expression de ces marqueurs (Figure 47B).

Enfin, les différentes sous-populations cellulaires NK selon leur profil de maturation ont été identifiées. Les cellules NK CD56^{bright} sont les cellules NK circulantes les plus immatures. Elles ont été identifiées par la forte intensité d'expression du marqueur CD56 et l'absence d'expression du marqueur CD57. Les cellules NK CD56^{dim} (faible expression du marqueur CD56) ont été séparées en quatre sous-groupes selon l'expression des récepteurs KIR et du marqueur de fonctionnalité CD57 : les cellules NK KIR⁻CD57⁻, KIR⁺CD57⁻, KIR⁻CD57⁺ et KIR⁺CD57⁺ (Figure 47C). L'ensemble de ces quatre sous-populations cellulaires représentant 100% des cellules NK CD56^{dim} et la somme des cellules NK CD56^{bright} et CD56^{dim} représentant 100% des cellules NK.

En 2017, une standardisation avait été effectuée entre les cytomètres de l'IPC et le cytomètre du CRCM, en utilisant 30 prélèvements de volontaires sains. Cette corrélation a permis de retrouver les seuils utilisés pour séparer les patients selon leur statut NKp46. Ainsi, les patients dont la MFI de NKp46 sur les cellules NK est supérieure à 2259 appartiennent au groupe NKp46^{high}, ceux dont la MFI est inférieure à 2259 appartiennent au groupe NKp46^{low}.

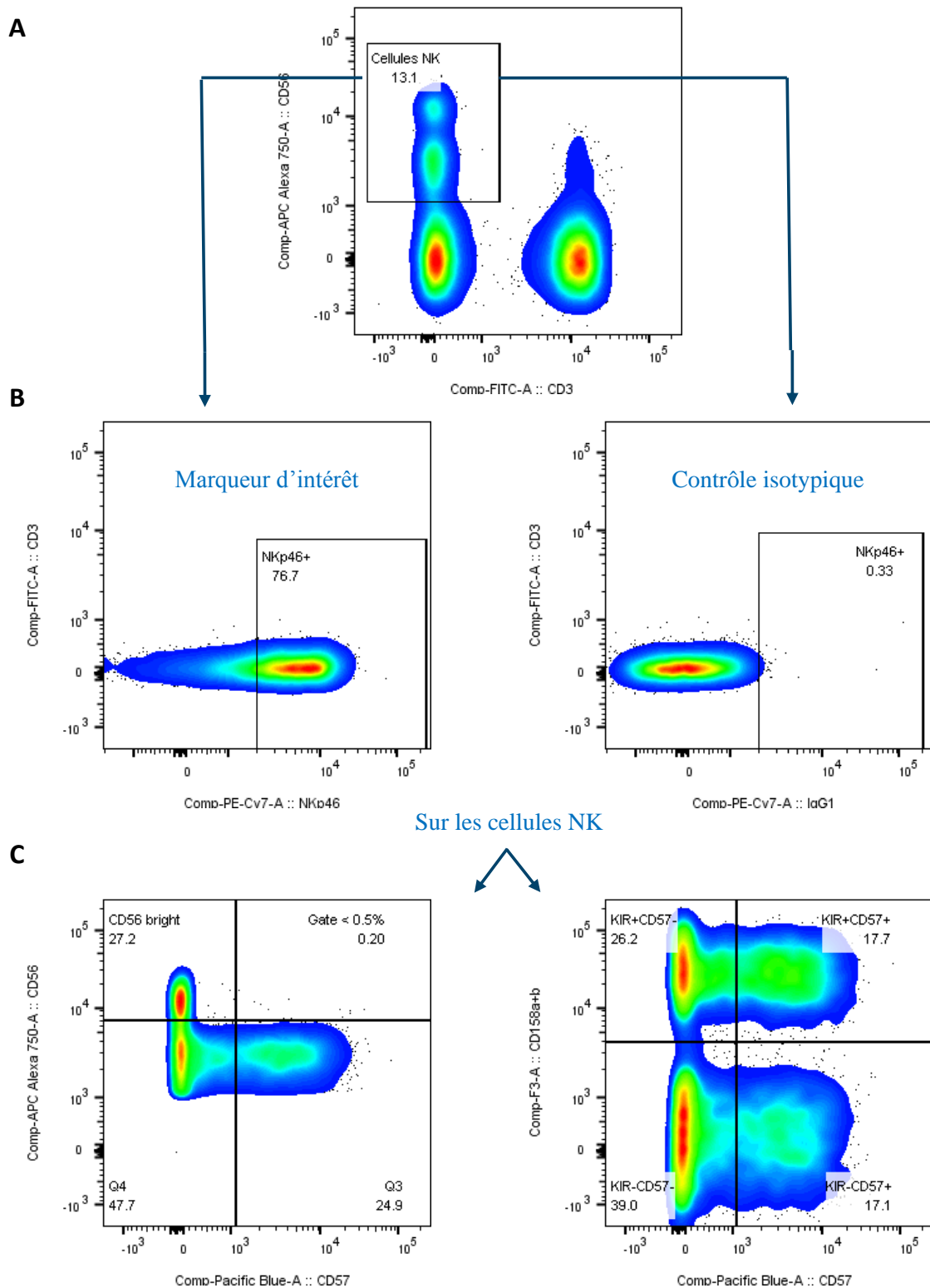


Figure 47 : Stratégie de fenêtrage en cytométrie en flux.

(A) Les cellules NK sont identifiées selon leur phénotype $CD3^+CD56^+$.

(B) Détermination du seuil de positivité du marqueur NKp46 selon le contrôle isotypique (à droite).

(C) Identification des différentes sous-populations cellulaires NK selon leur profil de maturation : $CD56^{bright}$ et $CD56^{dim}$ (KIR^-CD57^- , KIR^+CD57^- , KIR^-CD57^+ et KIR^+CD57^+).

4. Analyse statistique

Les caractéristiques des patients ont été récoltées à partir de leur dossier médical informatisé (Hopital Manager) et actualisées jusqu'au 30 juin 2020, date autorisée par le directeur de la recherche clinique de l'IPC. Ces caractéristiques incluent l'âge au diagnostic, le sexe, l'étiologie (de novo, secondaire à un cancer solide ou une hémopathie maligne), le nombre de globules blancs, de blastes sanguins et médullaires au diagnostic, le caryotype ± la FISH, les mutations *NPM1*, *FLT3* (ITD et exon 20), *CEBPα* et *IDH1/2*, la classification morphologique FAB, cytogénétique et pronostique ELN, le traitement d'induction (selon le schéma « 3+7 », date de la première induction, nombre de cures), le traitement de consolidation (autogreffe, allogreffe, le cas échéant : date d'allogreffe, statut avant allogreffe), la réponse au traitement (rechute ± date de rechute) et la survie (décès ± date du décès, date des dernières nouvelles).

Ces caractéristiques ont été résumées par des analyses descriptives, incluant la fréquence, les pourcentages, la médiane, la moyenne et l'écart type (Tableaux 8 et 9).

Chez les patients ayant reçu un traitement d'induction intensif de type « 3+7 », l'évaluation de la réponse au traitement permet de classer les patients en trois groupes, selon les recommandations ELN 2017¹⁸ :

- Groupe rémission complète (RC) : patients ayant obtenus une RC après une ou deux cures d'induction et n'ayant pas rechutés à la date des dernières nouvelles ;
- Groupe réfractaire : patients n'ayant pas atteint une rémission complète après une ou deux cures d'induction ;
- Groupe rechute : patients ayant obtenus une RC après une ou deux cures d'induction et ayant présenté une rechute cytologique post-RC.

La survie globale, la survie sans rechute et l'incidence cumulative de rechute ont été calculées selon les recommandations ELN 2017.¹⁸ Ainsi, la survie globale est définie de la date du diagnostic à la date du décès, quelle qu'en soit la cause ; les patients dont le décès n'était pas connu au dernier suivi étant censurés à la date des dernières nouvelles. La survie sans rechute est quant à elle mesurée de la date d'obtention d'une rémission complète jusqu'à la date de rechute ou de décès quelle qu'en soit la cause ; les patients dont la rechute ou le décès n'était pas connu au dernier suivi étant censurés à la date des dernières. L'incidence cumulative de rechute est mesurée de la date d'obtention de la rémission complète jusqu'à la

date de rechute ; les patients dont la rechute n'était pas connue au dernier suivi étant censurés à la date des dernières et les patients décédés sans rechute étant considérés comme une cause d'échec concurrente. Enfin, le suivi médian a été établi de la date de rémission complète à la date des dernières nouvelles.

Les tests statistiques ont été effectués avec les logiciels Microsoft_Excel (version 2019) et Graphpad Prism® (v7.0). Le test de Wilcoxon-Mann-Whitney a été utilisé pour la comparaison de deux groupes non appariés et le test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns a été effectué pour les comparaisons multiples. Le test d'indépendance du χ^2 , le test exact de Fisher et le t-test ont été utilisés pour comparer les variables initiales chez les patients ayant reçu ou non un traitement d'induction intensif et chez les patients présentant un phénotype NKp46^{high} ou NKp46^{low}. Les courbes de survie ont été estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier et la comparaison entre les sous-groupes a été réalisée par le test du log-rank. Le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$ pour l'ensemble des analyses.

II. Résultats

1. Analyse de la cohorte clinique globale

Parmi les 138 patients dont le statut de NKp46 a été obtenu, 16 ont été retirés de l'étude devant la présence de l'un de ces critères d'exclusions : 7 patients étaient atteints de leucémie aiguë promyélocytaire, 4 de leucémie aiguë lymphocytaire, 1 de lymphome agressif, 1 de SMD avec excès de blastes et 3 patients présentaient une LAM en rechute (dont le statut NKp46 n'avait pas été déterminé au diagnostic). Le statut phénotypique de NKp46 a donc pu être récupéré chez 122 patients atteints de LAM au diagnostic.

a. Caractéristiques des patients

Sur les 122 patients de notre cohorte clinique, au diagnostic, le pourcentage moyen de blastes sanguins circulants est de $41,3 \pm 29,3\%$, avec un pourcentage moyen de blastes médullaires de $60,2 \pm 20,1\%$. Parmi ces 122 patients, 78% des patients (n=95) ont reçu un traitement d'induction intensif par anthracyclines et cytarabine selon le schéma d'administration « 3+7 » ; 22% des patients de notre cohorte (n=27) étant inéligibles à ce traitement intensif. Ces derniers, devant la présence de comorbidités importantes, d'un faible performance status ou du refus du patient, ont été traités par des faibles doses d'Aracytine®

(cytarabine) en sous-cutanée, par des cures de Vidaza® (azacytidine) ou par des soins supports comprenant de l'Hydrea®. L'âge moyen au diagnostic varie significativement entre les patients induits et non-induits ($57,0 \pm 11,9$ ans *versus* $74,6 \pm 4,5$ ans, respectivement, $p < 0,0001$). De plus, les patients inéligibles au traitement intensif présentent une proportion significativement plus élevée de LAM secondaires à un cancer solide ou une hémopathie maligne, comparés aux patients induits ($51,9\%$ *versus* $24,2\%$, $p = 0,0088$), avec une proportion significativement plus faible de patients ayant un pronostic favorable selon la classification ELN ($7,4\%$ *versus* $36,8\%$, $p = 0,0036$). En revanche, les patients non-induits ont des taux de leucocytes circulants significativement plus faibles comparés aux patients induits ($19,5 \pm 18,6$ G/L *versus* $49,3 \pm 48,8$ G/L, respectivement, $p = 0,0299$).

Les caractéristiques des patients, stratifiées selon le traitement d'induction, sont résumées dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Caractéristiques de la cohorte globale.

Caractéristiques des patients		LAM	Patients induits	Patients non-induits	P value
Nombre d'échantillon	n (%)	122	95 (77,9)	27 (22,1)	/
Age (ans)	m(SD)	60,9 (12,2)	57,0 (11,9)	74,6 (4,5)	<0,0001
Sexe Ratio	M/F	59/63	50/45	9/18	0,0854
Statut au diagnostic					
▪ De novo	n (%)	85 (69,7)	72 (75,8)	13 (48,2)	0,0153
▪ Transformation d'un SMD	n (%)	14 (11,5)	7 (7,4)	7 (25,9)	
▪ Transformation d'un SMP	n (%)	6 (4,9)	5 (5,2)	1 (3,7)	
▪ Antécédent de tumeur solide	n (%)	17 (13,9)	11 (11,6)	6 (22,2)	
Globules blancs (GB) (10^9/L)	m(SD)	42,7 (43,1)	49,3 (48,8)	19,5 (18,6)	0,0299
Hyperleucocytaire (GB $> 30.10^9$/L)	n (%)	45 (36,9)	38 (40,0)	7 (25,9)	0,2584
Blastes					
▪ Dans le sang (%)	m(SD)	41,3 (29,3)	43,8 (30,4)	32,0 (23,0)	0,1282
▪ Dans la moelle osseuse (%)	m(SD)	60,2 (20,1)	62,0 (20,2)	54,0 (18,3)	0,1157
Classification ELN					
Groupe 1 (Favorable)	n (%)	37 (30,3)	35 (36,8)	2 (7,4)	0,0119
Groupe 2 (Intermédiaire)	n (%)	44 (36,1)	33 (34,7)	11 (40,7)	
Groupe 3 (Défavorable)	n (%)	40 (32,8)	27 (28,4)	13 (48,1)	
Non applicable (caryotype non réalisé)	n (%)	1 (0,8)	0 (0)	1 (3,7)	
Statut NKp46					
▪ NKp46 ^{high} (MFI NKp46 > 2259)	n (%)	70 (57,4)	53 (55,8)	17 (63,0)	0,6598
▪ NKp46 ^{low} (MFI NKp46 > 2259)	n (%)	52 (42,6)	42 (44,2)	10 (37,0)	

✓ Patients ayant reçu un traitement d'induction intensif

L'évaluation de la réponse au traitement d'induction n'a pas pu être réalisée chez deux patients devant un décès précoce au diagnostic lié aux complications aiguës engendrées par leur hémopathie. Parmi les 93 autres patients induits, 77,4% (n=72) des patients ont obtenu une rémission complète après l'induction et 22,6% des patients (n=21) sont réfractaires à ce traitement. Ces 93 patients ont été stratifiés selon leur statut de NKp46 : ainsi, 57% (n=53) présentent une forte expression de NKp46 (NKp46^{high}) et 43% (n=40) une faible expression de NKp46 (NKp46^{low}). La comparaison de ces deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} n'a mis en évidence aucune différence en termes d'évaluation de la réponse au traitement d'induction (Figure 48). En effet, le traitement d'induction permet d'obtenir des taux de rémissions complètes similaires chez les patients NKp46^{high} et NKp46^{low} (77,4% versus 77,5%, respectivement, p=1,0000).

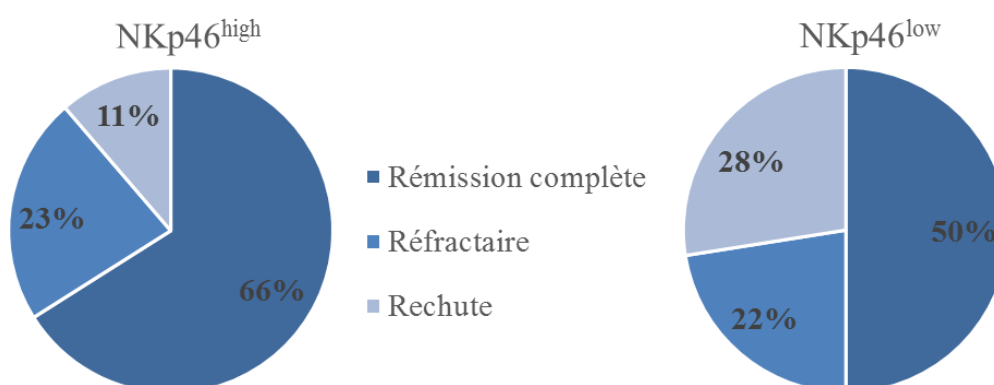


Figure 48 : Répartition des patients selon de leur réponse au traitement et leur niveau d'expression de NKp46.

En revanche, parmi ces patients ayant obtenu une rémission complète, les patients du groupe NKp46^{low} présentent des taux de rechutes plus importants que les patients du groupe NKp46^{high}, bien que cette différence n'est pas pu être démontrée de manière significative (35,5% versus 14,6%, respectivement, p=0,0517).

b. Courbes de survie

✓ Selon le traitement d'induction

Les patients inéligibles au traitement intensif présentent plusieurs facteurs de mauvais pronostic au diagnostic : l'âge, le caractère secondaire de la LAM et la classification ELN. Ce pronostic péjoratif est confirmé par l'analyse des courbes de survie globale. En effet, les patients n'ayant pas reçu de traitement d'induction intensif ont une survie globale à 2 ans significativement plus faible que les patients ayant été induits (13,8% *versus* 61,4%, respectivement, $p < 0,0001$; Figure 49A). Chez les patients non-induits, la médiane de survie globale est seulement de 1,5 mois ; la médiane de survie globale des patients induits n'ayant pas encore été atteinte.

Le traitement des patients non-induits est très hétérogène. En effet, sur les 27 patients non-induits, 12 ont été traités par Vidaza®, 6 par Aracytine® faible dose en sous-cutanée, 1 patient a reçu un traitement expérimental après avoir été inclus dans un essai clinique et 8 ont seulement reçus des soins de support après avoir été déclarés en soins palliatifs. L'ensemble de ces patients sont âgés de plus de 65 ans alors que 66% des patients induits sont âgés de moins de 65 ans. La survie globale a donc été réanalysée entre les patients induits âgés de plus de 65 ans et les patients non-induits ayant reçu un traitement par Vidaza® ou Aracytine® : la survie globale à 2 ans est toujours significativement plus élevée chez les patients induits (39,1% *versus* 11,8%, respectivement, $p = 0,0375$) ; les médianes de survie globale étant de 11,9 et 7,3 mois, respectivement (Figure 49B).

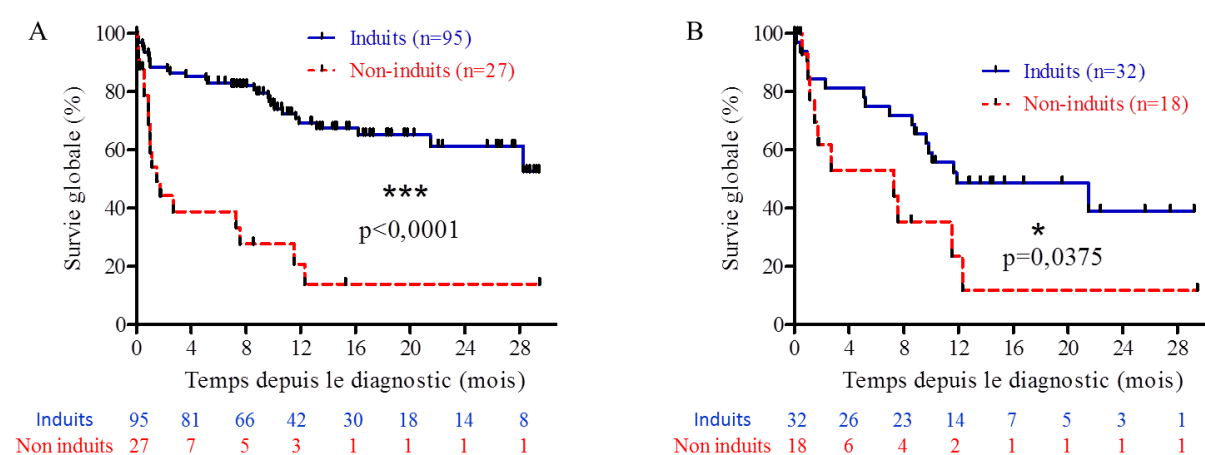


Figure 49 : Survie globale des patients en fonction de leur traitement d'induction.

(A) Survie globale des patients induits (en bleu) *versus* patients non-induits (en rouge).

(B) Survie globale des patients induits âgés de plus de 65 ans (en bleu) *versus* patients non-induits ayant reçu un traitement par Vidaza® ou Aracytine® (en rouge).

Les patients inéligibles au traitement intensif présentent un pronostic sombre. Devant une prise en charge hétérogène et adaptée à chaque patient, ces patients ont été analysés séparément des patients ayant reçu un traitement d'induction intensif.

✓ Chez les patients ayant reçu un traitement d'induction intensif

Notre cohorte ne permet pas de mettre en évidence une différence en termes de survie globale entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} (p=0,3711 ; Figure 50). En revanche, une tendance apparaît en termes de survie sans rechute et d'incidence cumulative de rechute (Figure 51). Ainsi, les patients NKp46^{high} ont une meilleure survie sans rechute à 2 ans que les patients NKp46^{low} (76,1% versus 53,6%, respectivement, p=0,2210), avec une incidence cumulative de rechute plus faible (17,4% versus 46,4%, respectivement, p=0,0857), bien que ces différences n'aient pu être démontrées de manière significative.

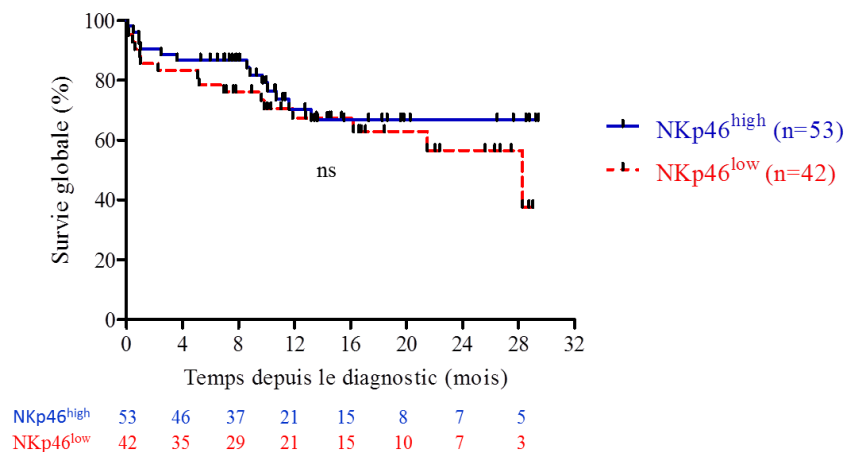


Figure 50 : Survie globale des patients induits en fonction de leur statut NKp46.

Survie globale des patients NKp46^{high} (en bleu) versus patients NKp46^{low} (en rouge).

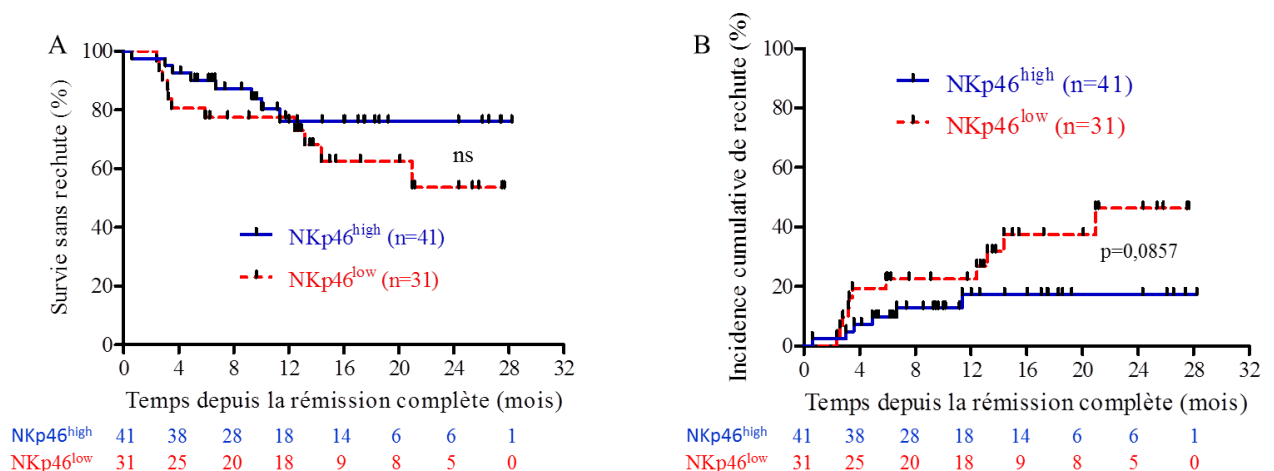


Figure 51 : Survie sans rechute (A) et incidence cumulative de rechute (B) des patients induits en fonction de leur statut NKp46.

2. Analyse de sous-groupe des patients induits, âgés de moins de 65 ans et ayant obtenus une rémission complète

La valeur prédictive de NKp46 ayant été démontrée uniquement chez les sujets âgés de moins de 65 ans, traités par un schéma d'induction intensif et ayant obtenu une rémission complète post-induction,¹⁴⁸ 70 patients ont été retirés de cette analyse de sous-groupe (n=27 patients n'ayant pas reçu un traitement intensif, n=32 patients étant âgés de 66 à 83 ans et n=11 patients étant réfractaires au traitement). L'analyse de sous-groupe de cette cohorte clinique a donc été effectuée sur un total de 52 patients (Figure 52 : Flow chart).

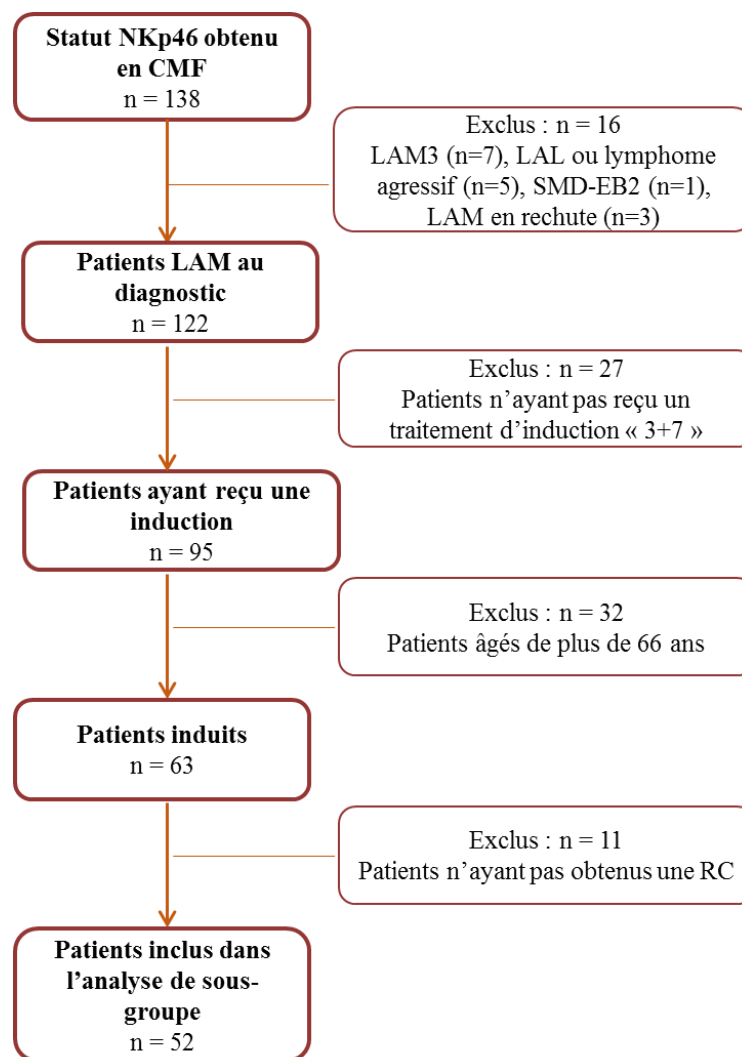


Figure 52 : Flow chart de l'analyse de sous-groupe.

a. Caractéristiques des patients

Sur la cohorte globale de 52 patients, l'âge moyen au diagnostic est de $48,6 \pm 10,7$ ans avec 86,5% de LAM primaires et 13,5% de LAM secondaires à un cancer solide ou une hémopathie maligne. Au diagnostic, le pourcentage moyen de blastes sanguins circulants est de $46,8 \pm 31,2\%$, celui de blastes médullaires étant de $64,9 \pm 20\%$. Le taux moyen de leucocytes circulants est $38,9 \pm 33,4$ G/L : 44,2% des LAM sont hyperleucocytaires au diagnostic. Après traitement d'induction et obtention d'une rémission complète, 21,2% des patients ont rechutés ; 64% de ces rechutes étant précoces, dans les 6 premiers mois suivant la RC.²⁴ Des mutations *NPM1*, *FLT3* ou *CEPBA* ont été retrouvées chez 25 patients présentant un caryotype à risque intermédiaire. La présence de ces mutations a permis de reclasser 57% de ces patients dans le groupe à risque favorable selon la classification ELN. Ainsi, 58% des patients sont classés dans le groupe à risque favorable, 29% des patients dans le groupe à risque intermédiaire et 13% dans le groupe à risque défavorable. Sur cette cohorte, 42% des patients ont bénéficié d'un traitement de consolidation par allogreffe de CSH (n=19 en RC1 et n=3 en rechute). Le suivi médian est de $13,5 \pm 7,7$ mois (variant de 5,3 à 29,4 mois).

Les patients ont été séparés en deux groupes selon la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) de NKp46 obtenue par cytométrie en flux sur les cellules NK. Le seuil MFI NKp46 fixé à 2259 permet de séparer les patients en deux groupes : ainsi, 65,4% des patients analysés ont une forte expression de NKp46 (NKp46^{high}, n=34) et 34,6% ont une faible expression de NKp46 (NKp46^{low}, n=18). L'intensité d'expression de NKp46 des patients NKp46^{high} est proche de celle des volontaires sains ($3975,9 \pm 1243,7$ versus $3752,5 \pm 920,0$ respectivement). En revanche, l'intensité d'expression de NKp46 est significativement abaissée chez les patients NKp46^{low} par rapport aux volontaires sains ($1449,3 \pm 478,6$ versus $3752,5 \pm 920,0$ respectivement, $p < 0,0001$; Figure 53).

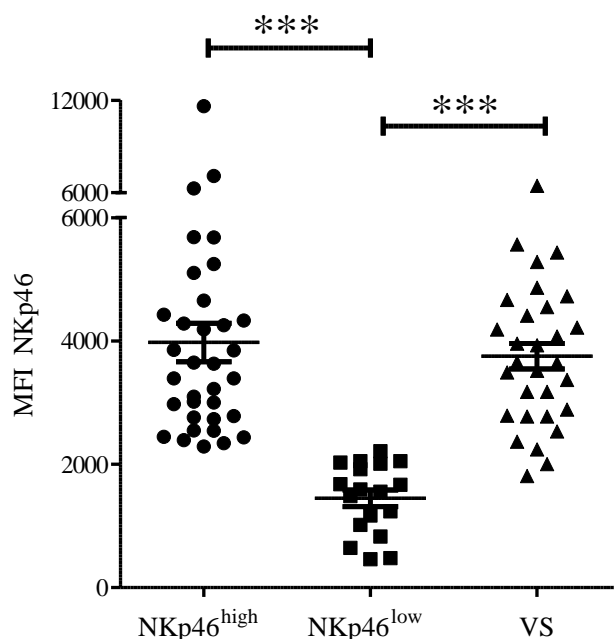


Figure 53 : Comparaison de l'intensité d'expression de NKp46 entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} et les volontaires sains.

L'intensité d'expression de NKp46 à la surface des cellules NK a été déterminée en cytométrie en flux sur des prélèvements sanguins frais au diagnostic de LAM. Les patients sont stratifiés en 2 groupes sur la MFI du marqueur NKp46 : MFI > 2259 groupe NKp46^{high} ; MFI < 2259 groupe NKp46^{low}. Les niveaux d'expression de NKp46 des deux groupes de patients et des volontaires sains sont comparés entre eux par un test de Kruskal-Wallis suivi d'un post-test de Dunns, *** p<0,0001.

Les patients du groupe LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low} présentent de nombreuses caractéristiques similaires au diagnostic : âge, sexe, pourcentage de blastes dans le sang et la moelle osseuse, classifications cytogénétique et ELN ne varient pas significativement entre ces deux groupes (Tableau 9). En revanche, les patients du groupe NKp46^{low} ont des taux de leucocytes circulants plus élevés comparés aux patients du groupe NKp46^{high} ($50,9 \pm 37,3$ G/L *versus* $32,5 \pm 29,3$ G/L, respectivement) avec une présentation hyperleucocytaire au diagnostic plus fréquente (61,1% *versus* 35,3%, respectivement) mais ces différences correspondent à une tendance et n'ont pas pu être démontrées de manière significative (p=0,1751 et p=0,0876 respectivement).

Tableau 9 : Caractéristiques des patients de l'analyse de sous-groupe.

Caractéristiques des patients		LAM	LAM ^{high} NKp46	LAM ^{low} NKp46	P value
Nombre d'échantillon	n (%)	52	34 (65,4)	18 (34,6)	/
Age (ans)	m(SD)	48,6 (10,7)	46,7 (11,6)	52,3 (8,4)	0,1810
Sexe Ratio	M/F	26/26	18/16	8/10	0,7712
Statut au diagnostic					
- De novo	n (%)	45 (86,5)	29 (85,3)	16 (88,9)	/
- Transformation d'un SMD	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
- Transformation d'un SMP	n (%)	2 (3,9)	2 (5,9)	0 (0)	
- Antécédent de tumeur solide	n (%)	5 (9,6)	3 (8,8)	2 (11,1)	
Evolution					
Patient ayant rechuté après la RC	n (%)	11 (21,2)	5 (14,7)	6 (33,3)	0,1586
Suivi des patients					
Médiane de suivi (mois)		13,5	11,3	16,4	/
Globules blancs (GB) ($10^9/L$)	m(SD)	38,9 (33,4)	32,5 (29,3)	50,9 (37,3)	0,1751
Hyperleucocytaire (GB > $30.10^9/L$)	n (%)	23 (44,2)	12 (35,3)	11 (61,1)	0,0876
Blastes					
Dans le sang (%)	m(SD)	46,8 (31,2)	46,6 (32)	47,3 (29,7)	0,8701
Dans la moelle osseuse (%)	m(SD)	64,9 (20)	63,9 (20,7)	66,7 (18,8)	0,6373
Classification FAB					
M0	n (%)	3 (5,8)	2 (5,9)	1 (5,6)	/
M1	n (%)	12 (23,1)	9 (26,5)	3 (16,7)	
M2	n (%)	9 (17,3)	7 (20,6)	2 (11,1)	
M3	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
M4	n (%)	13 (25)	8 (23,5)	5 (27,8)	
M4Eo	n (%)	8 (15,4)	5 (14,7)	3 (16,7)	
M5	n (%)	7 (13,5)	3 (8,8)	4 (22,2)	
M6	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
M7	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Marqueurs moléculaires					
<i>FLT3^{ITD}</i>	n (nombre de patients testés)	8 (41)	5 (26)	3 (15)	/
<i>NPM1</i>		20 (42)	10 (27)	10 (15)	
<i>CEPBα</i> biallélique		4 (12)	4 (11)	0 (1)	
Cytogénétique					
Groupe 1 (Favorable)	n (%)	13 (25)	9 (26,5)	4 (22,2)	0,8540
Groupe 2 (Intermédiaire)	n (%)	32 (61,5)	20 (58,8)	12 (66,7)	
Groupe 3 (Défavorable)	n (%)	7 (13,5)	5 (14,7)	2 (11,1)	
Classification ELN					
Groupe 1 (Favorable)	n (%)	30 (57,7)	18 (52,9)	12 (66,7)	0,6325
Groupe 2 (Intermédiaire)	n (%)	15 (28,8)	11 (32,4)	4 (22,2)	
Groupe 3 (Défavorable)	n (%)	7 (13,5)	5 (14,7)	2 (11,1)	
Greffe de cellules souches hématopoïétiques					
Allogreffe en RC1	n (%)	19 (36,5)	13 (38,2)	6 (33,3)	/
Autogreffe	n (%)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	

b. Comparaison des 2 groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low}

✓ Fréquence des populations lymphocytaires NK

La fréquence des cellules NK parmi les lymphocytes totaux circulants ne varie pas significativement entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} ($5,17 \pm 2,81\%$ versus $5,82 \pm 2,60\%$, respectivement, $p=0,3711$). Malgré une importante hétérogénéité interindividuelle, les patients du groupe NKp46^{high} présentent un taux significativement plus important de cellules NK NKp46 positives (NKp46⁺) au diagnostic comparé aux patients du groupe NKp46^{low} ($69,8 \pm 13,1\%$ versus $38,1 \pm 10,8\%$, respectivement, $p<0,0001$; Figure 54).

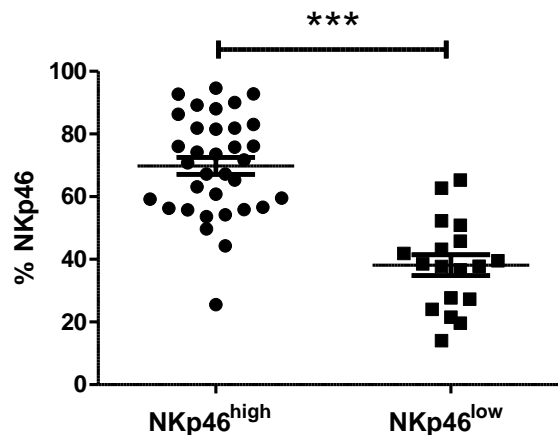


Figure 54 : La population cellulaire NK NKp46⁺ est sous-représentée chez les patients du groupe NKp46^{low}.

Comparaison des fréquences des cellules NK selon l'expression du marqueur NKp46 entre les deux groupes LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}, test de Wilcoxon-Mann-Whitney, *** $p<0,001$.

✓ Profil de maturation des cellules NK

Le profil de maturation des cellules NK a été établi selon l'expression des marqueurs CD56, KIR et CD57. Ainsi cinq sous-populations cellulaires NK ont pu être identifiées : les cellules NK CD56^{bright}, KIR⁻CD57⁻, KIR⁺CD57⁻, KIR⁻CD57⁺ et KIR⁺CD57⁺ (Figure 47C).

Leur fréquence d'expression diffère peu entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} (Figure 55A). En effet, la fréquence des sous-populations cellulaires NK KIR⁻CD57⁻, KIR⁺CD57⁻, KIR⁻CD57⁺ et KIR⁺CD57⁺ ne varie pas significativement entre les patients NKp46^{high} et NKp46^{low} ($p=0,8467$, $p=0,3814$, $p=0,0852$ et $p=0,4532$ respectivement).

Seule la population cellulaire la plus immature, à savoir les cellules NK CD56^{bright}, est significativement diminuée chez les patients NKp46^{low} comparé aux patients NKp46^{high} ($1,32 \pm 1,21\%$ versus $3,73 \pm 2,84\%$, $p=0,0033$) (Figure 55B).

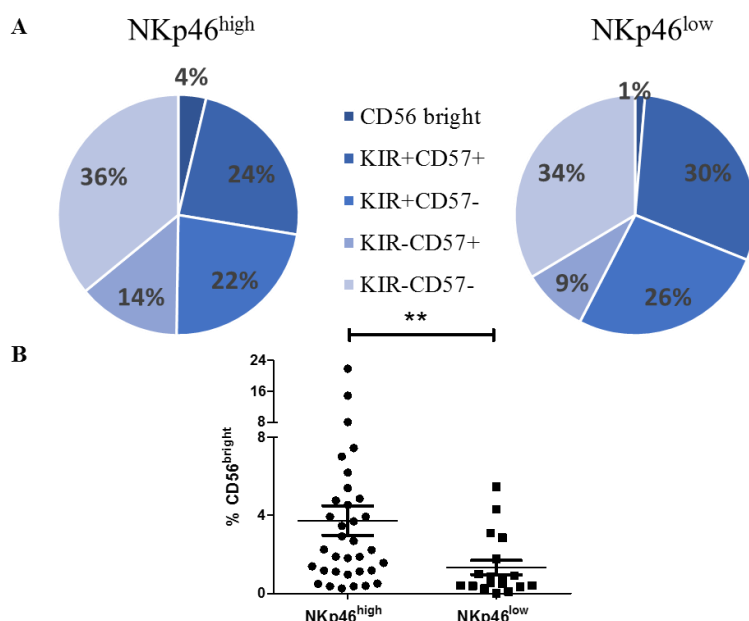


Figure 55 : Profils de maturation des cellules NK selon l'expression de NKp46.

(A) Fréquence des sous-populations cellulaires NK exprimée en pourcentage des cellules NK totales.

(B) Comparaison des fréquences des cellules NK CD56^{bright} entre les deux groupes LAM NKp46^{high} et LAM NKp46^{low}, test de Wilcoxon-Mann-Whitney, ** p < 0,01.

✓ Courbes de survie

Notre cohorte ne permet pas de mettre en évidence une différence en termes de survie globale entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} (p=0,9158 ; Figure 56A). En revanche, une tendance semble apparaître sur les courbes de survie sans rechute (Figure 56B). Ainsi, les patients NKp46^{high} semblent avoir une survie sans rechute à 2 ans supérieure aux patients NKp46^{low} (78,3% *versus* 52,5%, respectivement, p=0,3530) ; bien que ces résultats n'aient pu être démontrés sur le plan statistique. Les médianes de survie globale et sans rechute n'ont pas pu être définies chez les patients NKp46^{high} et NKp46^{low} ; le suivi médian étant trop faible (11,3 mois *versus* 16,4 mois, respectivement).

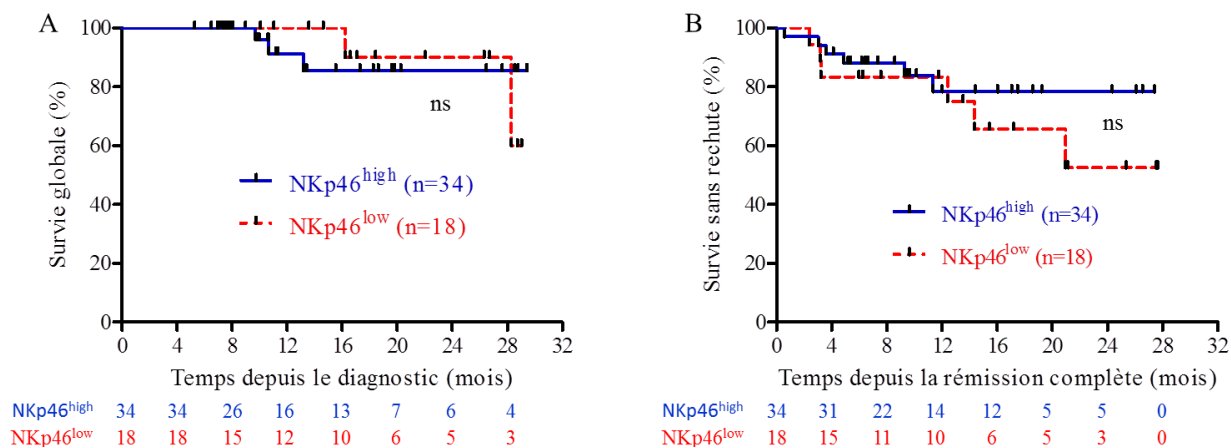


Figure 56 : Survie globale (A) et sans rechute (B) des patients selon leur statut NKp46.

L'évolution des patients appartenant au groupe NKp46^{low} semble plus péjorative. En effet, les patients NKp46^{low} ont des taux de rechutes plus importants comparés aux patients NKp46^{high} (33,3% *versus* 14,7%, respectivement, p=0,1586), bien que cette différence n'ait pu être démontrée de manière significative, probablement à cause d'un manque de puissance statistique. Les courbes d'incidence cumulative de rechute ont été réalisées chez les patients NKp46^{low} et NKp46^{high} (Figure 57). Une fois de plus, une tendance est observée : l'incidence cumulative de rechutes est supérieure chez les patients NKp46^{low} comparé aux patients NKp46^{high} (47,5% *versus* 17,7%, respectivement, p=0,2361) ; cependant cette différence n'a pas pu être démontrée de façon significative.

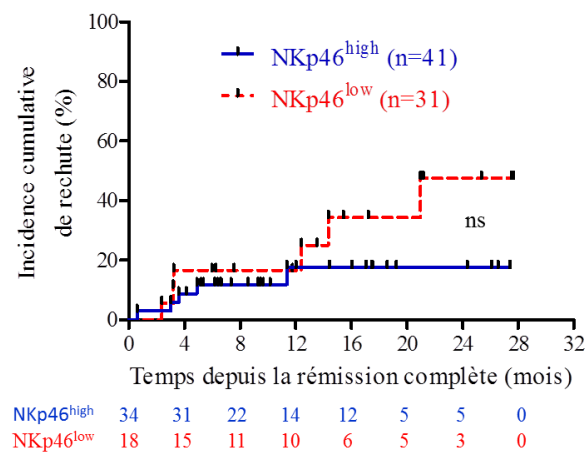


Figure 57 : Incidence cumulative de rechute des patients induits selon l'expression de NKp46.

Une analyse de sous-groupe a été effectuée afin de comparer les résultats de cette cohorte à ceux publiés en 2017 par Chretien et al.¹⁴⁸ Chez les patients NKp46^{high}, la survie sans rechute à 2 ans entre les patients allogreffés *versus* non allogreffés ne met pas en évidence de différence significative (75,2% *versus* 84,4%, respectivement, p=0,3763 ; Figure 58A). En revanche, chez les patients du groupe NKp46^{low}, la survie sans rechute semble plus longue chez les patients allogreffés (p=0,0454 ; Figure 58B).

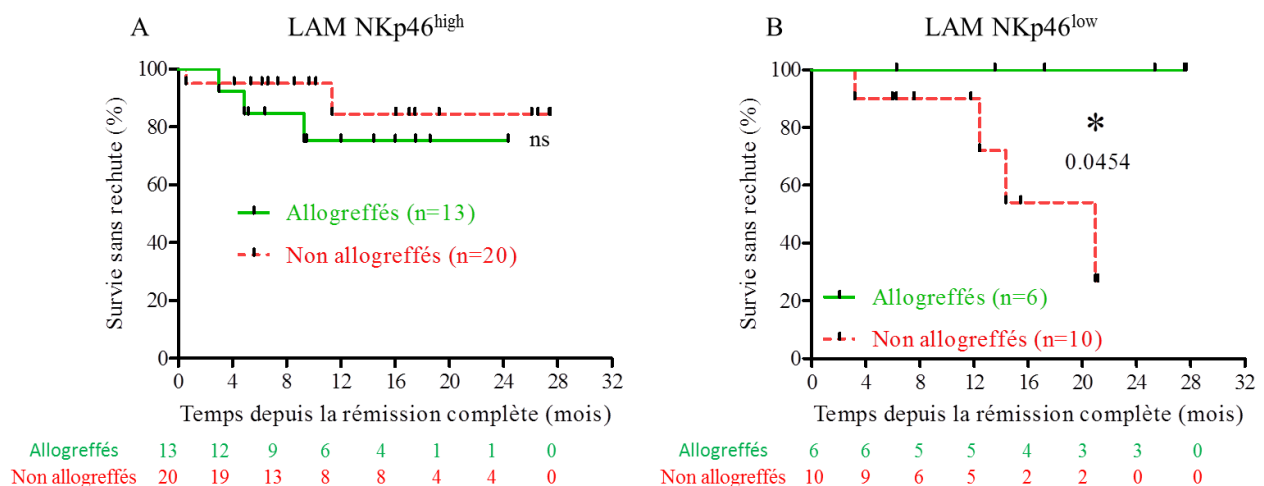


Figure 58 : Survie sans rechute chez les patients NKp46^{high} (A) et NKp46^{low} (B).

III. Discussion

A notre connaissance, cette étude est la première application en pratique clinique de la caractérisation phénotypique des cellules NK chez les patients atteints de LAM, à partir des données publiées dans la littérature. Ces dernières années, la stratification pronostique des LAM a largement été modifiée par l'intégration de marqueurs moléculaires. La cytométrie en flux, technique couramment utilisée au laboratoire, a une place primordiale dans le diagnostic et le suivi par maladie résiduelle des LAM. Mais, à ce jour, l'immunophénotypage n'intervient pas dans la stratification pronostique des patients. Or, cette technique d'analyse rapide et sensible, pourrait être utilisée pour stratifier les patients et orienter leur prise en charge thérapeutique dès le diagnostic. L'objectif de notre étude est donc de valider l'intérêt pronostic et prédictif de marqueurs immunophénotypiques sanguins afin qu'ils soient couramment utilisés dans la prise en charge des patients atteints de LAM.

Cette étude est le résultat d'un projet translationnel et d'un travail coopératif entre les équipes de recherche du CRCM et les praticiens hospitaliers de l'IPC. Ce travail de thèse d'exercice est focalisé sur le biomarqueur NKp46 mais le panel d'anticorps utilisé permet à la fois d'étudier le marqueur pronostic NKp30 et les profils de maturation des cellules NK. Il serait donc intéressant de combiner l'ensemble de ces marqueurs immunophénotypiques avec les données cliniques des patients afin de développer un score pronostic immunologique.

Dans cette cohorte clinique, nous avons montré que la fréquence des populations cellulaires NK CD56^{bright} est diminuée chez les patients du groupe NKp46^{low} comparée aux patients du groupe NKp46^{high}. Ce résultat tend à confirmer les résultats retrouvés précédemment en cytométrie de masse, où la proportion de cellules NK CD56^{bright} était significativement abaissée dans le groupe LAM NKp46^{low} comparée aux volontaires sains. La diminution de ces cellules immatures NK CD56^{bright} peut ainsi altérer l'ensemble de la réponse immunitaire puisque ces cellules permettent de recruter et d'activer d'autres cellules immunes par la sécrétion de nombreuses cytokines et chimiokines.¹⁰⁶ De plus, les cellules CD56^{bright} permettent de renouveler le pool de cellules NK par leur capacité proliférative et de différenciation. La diminution des cellules NK CD56^{bright} peut ainsi, à termes, altérer l'ensemble des populations cellulaires NK.

L'analyse statistique de cette cohorte clinique n'a pas permis de mettre en évidence de différences significatives en termes de survie globale et de survie sans rechute entre les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low}. Actuellement, ces résultats ne permettent pas de confirmer les résultats précédemment retrouvés par Chretien et al., où la survie globale et sans rechute à 4 ans était significativement augmentée chez les patients NKp46^{high} comparés aux patients NKp46^{low} (82,6% *versus* 57,1% $p=0,010$ et 74,3% *versus* 46,6% $p=0,014$ respectivement).¹⁴⁸ Plusieurs hypothèses peuvent être émises pour expliquer l'absence de résultats significatifs.

(1) La durée de suivi paraît être un des facteurs les plus discriminants. Il paraît évident que les études visant à étudier les rechutes doivent avoir un suivi suffisamment long pour déceler à la fois les rechutes précoces mais aussi les rechutes plus tardives. Ainsi, une durée de suivi trop courte engendrerait des biais dans l'analyse des résultats en excluant les rechutes tardives. Dans la publication de Chretien et al., le suivi médian après obtention de la rémission complète est de 55,3 mois, soit 4,6 ans.¹⁴⁸ Sachant que les patients atteints de LAM sont considérés comme guéris de leur maladie 5 ans après le diagnostic,⁹⁹ ce suivi médian est suffisamment long pour étudier la survenue de l'ensemble des rechutes et analyser la survie. Or, dans notre étude, le suivi médian après obtention de la RC est seulement de 13,5 mois, soit 1,1 ans. Ce suivi ne permet donc pas de déceler les rechutes tardives. Bien que la majorité des rechutes surviennent la première année du diagnostic de LAM, une durée de suivi plus longue semble nécessaire pour englober la totalité des rechutes, en se référant aux données de la littérature. Dans la publication de Ganzel et al., regroupant 9 essais cliniques et portant sur 3012 patients atteints de LAM diagnostiqués entre 1984 et 2008, 59% des patients ayant obtenus une rémission complète ont ensuite rechuté. Dans notre étude, seuls 21% des patients ont présenté une rechute. Toujours dans cette publication, la durée médiane de rémission complète avant la rechute est de 7,2 mois.¹⁶⁶ Or, dans notre étude, la durée médiane de rémission complète est seulement de 3,6 mois chez les patients ayant rechutés. Cette différence s'explique par la faible durée de suivi des patients : seules les rechutes très précoces ont pu être décelées ; les rechutes plus tardives étant masquées par l'absence de suivi. De plus, dans notre étude, 46% des patients ont des durées de suivi inférieures à 1 an après l'obtention de la rémission complète (parmi ces patients, 75% n'ont pas présenté de rechute ou de décès durant leur suivi). L'analyse du devenir clinique de ces patients est donc trop précoce et incomplète. Une durée de suivi plus longue est nécessaire afin d'être représentative de la réalité.

(2) Le nombre de patients inclus dans notre étude semble aussi être un facteur important, bien qu'étroitement lié à la durée de suivi. En effet, afin de retrouver des différences significatives entre deux groupes, un effectif minimum de patients est nécessaire. Initialement, notre analyse de sous-groupe portant sur des patients induits ayant obtenu une RC et étant âgés de moins de 65 ans est composée de 52 patients, séparés en deux groupes de 34 patients NKp46^{high} et 18 patients NKp46^{low}. Cet effectif semble suffisant pour établir des courbes de survie, mais la durée de suivi, très variable selon les patients (allant de 5,3 à 29,4 mois après la RC), perturbe les analyses statistiques. Ainsi, les courbes de survie sans rechute sont établies uniquement sur 8 patients à partir du 24^e mois ; 5 patients appartenant au groupe NKp46^{high} et 3 patients appartenant au groupe NKp46^{low} (Figure 56B). Ces courbes de survie ont été estimées en utilisant la méthode de Kaplan-Meier. Le principal avantage de cette méthode est qu'elle exploite au maximum les informations disponibles, permettant ainsi d'effectuer une courbe de survie en présence d'informations incomplètes sur la cohorte étudiée.¹⁶⁷ En effet, cette méthode réévalue systématiquement les données lorsque l'événement d'intérêt se produit, à savoir la rechute ou le décès dans notre étude. Ainsi, les patients perdus de vue ou dont la durée de suivi est courte peuvent initialement être inclus dans ces courbes de survie. Au cours du temps, ces patients sont censurés (les patients censurés étant matérialisés par un trait vertical noir sur les courbes de survie). Mais cet avantage peut devenir un inconvénient lorsque le nombre de sujets analysés devient trop rapidement insuffisant, comme par exemple lors de l'analyse de sous-groupe entre les patients allogreffés et non-allogreffés. En effet, à partir du 20^e mois de suivi, les courbes de survie Kaplan-Meier sont établies uniquement sur 5 patients (Figure 58). Chez les patients NKp46^{low}, le groupe de patients non-allogreffés n'est formé que par 2 patients tandis que chez les patients NKp46^{high}, le groupe de patients allogreffés ne se compose que d'un seul patient : la fluctuation d'échantillonnage peut donc entraîner un important biais dans le résultat de cette courbe de survie. L'inclusion de nouveaux patients semble nécessaire pour interpréter ces courbes de survie.

(3) Le seuil permettant de définir les deux groupes de patients NKp46^{high} et NKp46^{low} peut aussi être remis en question. En effet, ce seuil ne permet pas de retrouver une répartition des patients similaire à celle de la publication de Chretien et al.¹⁴⁸ Dans notre cohorte, 65,4% des patients sont classés dans le groupe NKp46^{high} contre seulement 19,4% dans la cohorte publiée en 2017.¹⁴⁸ De plus, la répartition retrouvée dans la publication de Chretien et al. est comparable aux données de la littérature : en 2007, la cohorte de Fauriat et al.¹⁴⁰ retrouvait

28% de patients « NKp46^{high} » (20 patients sur 71) et en 2002, dans la publication de Costello et al.¹³⁹, seulement 10% des patients avaient une forte expression de NKp46 sur leurs cellules NK (2 patients sur 20). J'ai ainsi testé cette hypothèse en reconstruisant les courbes de survie sans rechute après avoir fixé un seuil arbitraire permettant d'obtenir une répartition similaire à la cohorte de patients chez qui la valeur prédictive de NKp46 a été mise en évidence.¹⁴⁸ Les patients ont donc été répartis en deux nouveaux groupes NKp46^{high} et NKp46^{low} selon la MFI de NKp46, de manière à obtenir une répartition respective de 19,4% et 80,6% (soit n=10 et n=42 patients, respectivement). Le seuil permettant de séparer les patients entre ces deux groupes est alors recalculé à 4284 (MFI de NKp46). Malgré une nouvelle répartition des patients, la survie sans rechute ne diffère pas significativement entre les deux groupes NKp46^{high} et NKp46^{low} (p=0,9870 ; Annexe 5A). Les durées de suivi étant identiques, seuls 3 patients sont analysés à partir du 12^e mois dans le groupe NKp46^{high}. Ces courbes de survie ont aussi été reconstruites en utilisant le ratio MFI par rapport à l'isotype, comme décrit dans la publication.¹⁴⁸ Le seuil permettant de séparer les deux groupes de patients est fixé à 43,5 (soit n=8 patients NKp46^{high} et n=44 patients NKp46^{low}). Mais, comme précédemment, ces courbes de survie ne permettent pas de différencier de façon significative ces deux groupes de patients (p=0,7077 ; Annexe 5B). La durée de suivi paraît donc être le facteur le plus limitant dans l'analyse de cette cohorte clinique.

Dans notre étude, l'analyse des courbes de survie sans rechute entre les patients allogreffés et non-allogreffés chez les patients NKp46^{high} et NKp46^{low} (Figure 58) retrouve des résultats discordants avec ceux publiés en 2017.¹⁴⁸ En effet, il avait été montré que l'allogreffe apportait un bénéfice en terme de survie sans progression uniquement chez les patients ayant un statut NKp46^{high} au diagnostic. Or, dans notre étude, l'allogreffe semble bénéfique chez les patients ayant un statut NKp46^{low}. Cependant, les résultats retrouvés dans notre étude présentent certains biais. La durée de suivi est le principal facteur limitant l'interprétation de cette analyse. En effet, chez les patients NKp46^{high}, 35% des patients du groupe non-allogreffés présentent un suivi inférieur à 8 mois, ne permettant pas d'englober l'intégralité des rechutes. De plus, une durée de suivi trop courte n'est pas représentative de l'intérêt de l'allogreffe : les risques de mortalité liée au traitement étant principalement les premiers mois post-allogreffe, les bénéfices de l'allogreffe sont visibles à plus long terme. Par ailleurs, comme vu précédemment, le nombre de sujets devient rapidement insuffisant : à 2 ans de suivi, notre cohorte n'est composée que de 5 patients NKp46^{high} et de 7 patients

NKp46^{low} contre 26 et 70 patients, respectivement, dans la publication princeps.¹⁴⁸ La comparaison des deux groupes allogreffés *versus* non-allogreffés semble aussi biaisée par une répartition non homogène des patients selon la classification pronostique de l'ELN. En effet, l'allogreffe de CSH est indiquée uniquement chez les patients ayant un pronostic intermédiaire ou défavorable ; les patients non-allogreffés ayant majoritairement un pronostic favorable ($p=0,0357$ et $p=0,0008$ chez les patients NKp46^{high} et NKp46^{low}, respectivement). De plus, le groupe de patients non-allogreffés est aussi composé des patients ayant des contre-indications à l'allogreffe du fait de nombreuses comorbidités pouvant influencer le pronostic. Enfin, cette analyse de sous-groupe est biaisée par l'hétérogénéité en termes de durée de suivi des patients entre les deux groupes ; la durée de suivi des patients allogreffés étant plus longue que celle des patients non-allogreffés. A ce jour, l'analyse de sous-groupe entre les patients allogreffés et non allogreffés ne permet pas de conclure définitivement. Cette analyse nécessite une durée de suivi plus longue et l'inclusion de nouveaux patients.

Afin de correspondre aux critères retenus pour la cohorte de patients chez qui la valeur prédictive de NKp46 a été mise en évidence,¹⁴⁸ plusieurs critères d'exclusion ont été appliqués à notre cohorte initiale. L'âge est le critère d'exclusion qui a écarté le plus de patients de notre cohorte. En effet, sur 122 patients atteints de LAM initialement inclus, 59 patients étaient âgés de plus de 65 ans ; ce qui est cohérent avec les données de la littérature puisqu'en France, l'âge médian au diagnostic est de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme.² J'ai donc réalisé de nouvelles courbes de survie globale et sans rechute uniquement chez les patients âgés de plus de 65 ans ayant reçu un traitement d'induction intensif (Annexe 6) : ces analyses n'ont pas permis de différencier de manière significative les patients NKp46^{high} et NKp46^{low} ($p=0,6611$ et $p=0,6176$ pour les survies globale et sans rechute, respectivement). Ces données sont en accord avec les données de la littérature puisque les altérations des cellules NK ont été démontrées uniquement chez les patients âgés de moins de 65 ans.^{145,148} Ces études avaient exclu les patients âgés de plus de 65 ans car, à cette période, peu de patients âgés de plus de 65 ans étaient induits. L'âge n'étant plus le seul critère pris en compte pour évaluer l'éligibilité des patients à recevoir un traitement intensif, de plus en plus de patients âgés de plus de 65 ans ont été induits selon un schéma intensif ces dernières années. L'analyse de notre cohorte permet donc d'étudier la valeur pronostique et prédictive de NKp46 chez ces sujets âgés de plus de 65 ans ayant reçu un traitement d'induction intensif. La tendance des courbes de survie sans rechute entre les groupes NKp46^{high} et NKp46^{low} observée chez les patients âgés de moins de 65 ans ($p=0,3530$; Figure

56B) est retrouvée chez les patients âgés de plus de 65 ans ($p=0,6176$; Annexe 6B), bien que le nombre de sujets analysés soit insuffisant ($n=20$ patients). Par ailleurs, cette tendance est d'autant plus importante sur la cohorte globale des patients induits, indépendamment de l'âge ($p=0,2211$; Figure 51A). Ainsi, les patients NKp46^{high} induits semblent avoir une meilleure survie sans rechute que les patients NKp46^{low}, quel que soit leur âge au diagnostic. Ces résultats devront cependant être confirmés de manière significative.

IV. Conclusion

Ce travail a permis de recueillir et d'analyser l'ensemble des données cliniques et phénotypiques de 122 patients atteints de LAM diagnostiqués au laboratoire de l'IPC entre décembre 2017 et décembre 2019.

L'analyse des courbes de survie a permis de mettre en évidence des tendances. Ainsi, les patients NKp46^{high} induits ont une meilleure survie sans rechute que les patients NKp46^{low} avec une incidence cumulative de rechute plus faible. Mais ces différences n'ont pas pu être démontrées de manière significative devant une durée de suivi médiane trop courte à ce jour. La réactualisation de ces données de survie devra donc être réalisée dans les prochaines années afin d'obtenir une durée de suivi des patients plus conséquente et d'obtenir des résultats significatifs sur le plan statistique.

Actuellement, les courbes de survie de cette étude monocentrique prospective ne permettent pas de confirmer la valeur prédictive de réponse à l'allogreffe de NKp46. Ainsi, la réactualisation de ces données dans les prochaines années permettra d'établir des conclusions définitives sur l'utilisation potentielle du biomarqueur NKp46 en pratique clinique.

Conclusion

Ce travail illustre l'étroite collaboration entre les chercheurs et les praticiens hospitaliers du CRCM et de l'IPC. Ce projet translationnel mené il y a plusieurs années s'est concrétisé en 2017, devant la découverte d'un biomarqueur prédictif de réponse à l'allogreffe et la mise en place en routine de sa caractérisation phénotypique au laboratoire de biopathologie de l'Institut Paoli-Calmettes.

Cette étude a permis d'établir un immunophénotypage complet des cellules NK des patients atteints de LAM présentant une altération de NKp46 au diagnostic. Ainsi, les patients présentant une baisse d'expression du marqueur NKp46 au diagnostic possèdent des cellules NK hypoactivées, avec une baisse concomitante de l'expression des récepteurs activateurs NKp30 et CD16, et des récepteurs co-activateurs DNAM-1, CD96 et CD28. L'analyse secondaire des cellules NK NKp46 positives et négatives, a permis de caractériser une nouvelle population cellulaire, NKp46⁻, majoritairement présente chez les patients atteints de LAM. Cette étude a donc enrichi nos connaissances sur les altérations phénotypiques des cellules NK dans les LAM associées à la perte d'expression de NKp46.

La poursuite de ce travail au sein du laboratoire de l'IPC a permis de recueillir et d'analyser l'ensemble des données cliniques et phénotypiques des patients atteints de LAM diagnostiqués dans ce centre de lutte contre le cancer. Actuellement, les courbes de survie de cette étude monocentrique prospective n'ont pas permis de retrouver la valeur prédictive de NKp46 devant une analyse trop prématurée. Une réactualisation de ces données de survie devra donc être réalisée dans les prochaines années afin d'obtenir une durée de suivi des patients plus conséquente et d'établir des conclusions définitives sur l'utilisation du biomarqueur NKp46 en pratique clinique.

Bibliographie

1. *Les cancers en France, édition 2015, Institut national du cancer.* (2015).
2. Sandra Le Guyader-Peyrou *et al.* *Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim. Volume 2 - Hémopathies malignes.* (2019).
3. Siegel, R. L., Miller, K. D. & Jemal, A. Cancer statistics, 2018: Cancer Statistics, 2018. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **68**, 7–30 (2018).
4. Leone, G., Mele, L., Pulsoni, A., Equitani, F. & Pagano, L. The incidence of secondary leukemias. *Haematologica* **84**, 937–945 (1999).
5. Granfeldt Østgård, L. S. *et al.* Epidemiology and Clinical Significance of Secondary and Therapy-Related Acute Myeloid Leukemia: A National Population-Based Cohort Study. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 3641–3649 (2015).
6. Zipursky, A., Poon, A. & Doyle, J. Leukemia in Down Syndrome: A Review. *Pediatric Hematology and Oncology* **9**, 139–149 (1992).
7. Estey, E. & Döhner, H. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* **368**, 1894–1907 (2006).
8. Shallis, R. M., Wang, R., Davidoff, A., Ma, X. & Zeidan, A. M. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews* **36**, 70–87 (2019).
9. McNerney, M. E., Godley, L. A. & Le Beau, M. M. Therapy-related myeloid neoplasms: when genetics and environment collide. *Nature Reviews Cancer* **17**, 513–527 (2017).
10. Smith, S. M. *et al.* Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood* **102**, 43–52 (2003).
11. Travis, L. B. *et al.* Hematopoietic Malignancies and Related Disorders Among Benzene-Exposed Workers in China. *Leukemia & Lymphoma* **14**, 91–102 (1994).
12. Kane, E. V., Roman, E., Cartwright, R., Parker, J. & Morgan, G. Tobacco and the risk of acute leukaemia in adults. *British Journal of Cancer* **81**, 1228–1233 (1999).
13. Moorman, A. V., Roman, E., Cartwright, R. A. & Morgan, G. J. Smoking and the risk of acute myeloid leukaemia in cytogenetic subgroups. *British Journal of Cancer* **86**, 60–62 (2002).
14. Gundestrup, M. & Storm, H. H. Radiation-induced acute myeloid leukaemia and other cancers in commercial jet cockpit crew: a population-based cohort study. *The Lancet* **354**, 2029–2031 (1999).
15. Cardis, E. *et al.* Effects of low doses and low dose rates of external ionizing radiation: cancer mortality among nuclear industry workers in three countries. *Radiat. Res.* **142**, 117–132 (1995).
16. Levi, M. & ten Cate, H. Disseminated Intravascular Coagulation. *New England Journal of Medicine* **341**, 586–592 (1999).
17. Cairo, M. S. & Bishop, M. Tumour lysis syndrome: new therapeutic strategies and classification. *British Journal of Haematology* **127**, 3–11 (2004).
18. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood* **129**, 424–447 (2017).
19. 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).

20. Bennett, J. M. Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine* **103**, 620 (1985).
21. Vardiman, J. W., Harris, N. L. & Brunning, R. D. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood* **100**, 2292–2302 (2002).
22. Vardiman, J. W. *et al.* The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood* **114**, 937–951 (2009).
23. 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).
24. Döhner, H. *et al.* Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **115**, 453–474 (2010).
25. Wang, Z.-Y. & Chen, Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* **111**, 2505–2515 (2008).
26. Sangle, N. A. & Perkins, S. L. Core-Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **135**, 1504–1509 (2011).
27. Sanz, M. A. *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet. *Blood* **133**, 1630–1643 (2019).
28. Chen, W. *et al.* Cuplike nuclei (prominent nuclear invaginations) in acute myeloid leukemia are highly associated with *FLT3* internal tandem duplication and *NPM1* mutation. *Cancer* **115**, 5481–5489 (2009).
29. Gervais, C. *et al.* Acute myeloid leukaemia with 8p11 (MYST3) rearrangement: an integrated cytologic, cytogenetic and molecular study by the groupe francophone de cytogénétique hématologique. *Leukemia* **22**, 1567–1575 (2008).
30. Sun, J. *et al.* De novo acute myeloid leukemia with *inv(3)(q21q26.2)* or *t(3;3)(q21;q26.2)*: a clinicopathologic and cytogenetic study of an entity recently added to the WHO classification. *Modern Pathology* **24**, 384–389 (2011).
31. MYLOTARG 5 mg, poudre pour solution à diluer pour perfusion - VIDAL 2020, Médicaments, RCP du 21/10/2019.
32. Mrózek, K., Heerema, N. A. & Bloomfield, C. D. Cytogenetics in acute leukemia. *Blood Reviews* **18**, 115–136 (2004).
33. Patel, J. P. *et al.* Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **366**, 1079–1089 (2012).
34. Byrd, J. C. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**, 4325–4336 (2002).
35. Grimwade, D. *et al.* Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood* **116**, 354–365 (2010).
36. Breems, D. A. *et al.* Monosomal Karyotype in Acute Myeloid Leukemia: A Better Indicator of Poor Prognosis Than a Complex Karyotype. *Journal of Clinical Oncology* **26**, 4791–4797 (2008).
37. Boddu, P. C. *et al.* Validation of the 2017 European LeukemiaNet classification for acute myeloid leukemia with *NPM1* and *FLT3*-internal tandem duplication genotypes. *Cancer* **125**, 1091–1100 (2019).

38. Yanada, M. *et al.* Effect of cytogenetic risk status on outcomes for patients with acute myeloid leukemia undergoing various types of allogeneic hematopoietic cell transplantation: an analysis of 7812 patients. *Leukemia & Lymphoma* **59**, 601–609 (2018).
39. Papaemmanuil, E. *et al.* Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *New England Journal of Medicine* **374**, 2209–2221 (2016).
40. Mendler, J. H. *et al.* RUNX1 Mutations Are Associated With Poor Outcome in Younger and Older Patients With Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia and With Distinct Gene and MicroRNA Expression Signatures. *Journal of Clinical Oncology* **30**, 3109–3118 (2012).
41. Schnittger, S. *et al.* ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia* **27**, 82–91 (2013).
42. Bowen, D. *et al.* TP53 gene mutation is frequent in patients with acute myeloid leukemia and complex karyotype, and is associated with very poor prognosis. *Leukemia* **23**, 203–206 (2009).
43. Schlenk, R. F. *et al.* The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood* **122**, 1576–1582 (2013).
44. Schnittger, S. *et al.* Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood* **106**, 3733–3739 (2005).
45. Kottaridis, P. D. *et al.* The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood* **98**, 1752–1759 (2001).
46. Sakaguchi, M. *et al.* Prognostic impact of low allelic ratio FLT3-ITD and NPM1 mutation in acute myeloid leukemia. *Blood Advances* **2**, 2744–2754 (2018).
47. Schoch, C., Kern, W., Schnittger, S., Hiddemann, W. & Haferlach, T. Karyotype is an independent prognostic parameter in therapy-related acute myeloid leukemia (t-AML): an analysis of 93 patients with t-AML in comparison to 1091 patients with de novo AML. *Leukemia* **18**, 120–125 (2004).
48. Kayser, S. *et al.* The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. *Blood* **117**, 2137–2145 (2011).
49. Othus, M. *et al.* Declining rates of treatment-related mortality in patients with newly diagnosed AML given ‘intense’ induction regimens: a report from SWOG and MD Anderson. *Leukemia* **28**, 289–292 (2014).
50. Koreth, J. *et al.* Allogeneic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia in First Complete Remission: Systematic Review and Meta-analysis of Prospective Clinical Trials. *JAMA* **301**, 2349 (2009).
51. Sengsayadeth, S. *et al.* Reduced intensity conditioning allogeneic hematopoietic cell transplantation for adult acute myeloid leukemia in complete remission - a review from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. *Haematologica* **100**, 859–869 (2015).
52. Kurosawa, S. *et al.* Comparison of Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation and Chemotherapy in Elderly Patients with Non-M3 Acute Myelogenous Leukemia in First Complete Remission. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **17**, 401–411 (2011).
53. Cornelissen, J. J. & Blaise, D. Hematopoietic stem cell transplantation for patients with AML in first complete remission. *Blood* **127**, 62–70 (2016).

54. Tallman, M. S. All-trans retinoic acid in acute promyelocytic leukemia: long-term outcome and prognostic factor analysis from the North American Intergroup protocol. *Blood* **100**, 4298–4302 (2002).
55. Chen, X. *et al.* Relation of Clinical Response and Minimal Residual Disease and Their Prognostic Impact on Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **33**, 1258–1264 (2015).
56. Walter, R. B. *et al.* Effect of Complete Remission and Responses Less Than Complete Remission on Survival in Acute Myeloid Leukemia: A Combined Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and M. D. Anderson Cancer Center Study. *Journal of Clinical Oncology* **28**, 1766–1771 (2010).
57. Cheng, W.-Y. *et al.* Impact of blood count recovery on outcomes of acute myeloid leukemia patients achieving morphologic leukemia-free state. *Blood Cancer Journal* **8**, (2018).
58. Buccisano, F. *et al.* Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia. *Blood* **119**, 332–341 (2012).
59. Yin, J. A. L. *et al.* Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood* **120**, 2826–2835 (2012).
60. Jourdan, E. *et al.* Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood* **121**, 2213–2223 (2013).
61. Araki, D. *et al.* Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease–Based Definition of Complete Remission? *Journal of Clinical Oncology* **34**, 329–336 (2016).
62. Lester, T. J., Johnson, J. W. & Cuttner, J. Pulmonary leukostasis as the single worst prognostic factor in patients with acute myelocytic leukemia and hyperleukocytosis. *The American Journal of Medicine* **79**, 43–48 (1985).
63. Marbello, L. *et al.* Outcome of hyperleukocytic adult acute myeloid leukaemia: A single-center retrospective study and review of literature. *Leukemia Research* **32**, 1221–1227 (2008).
64. Byrd, J. C., Edenfield, W. J., Shields, D. J. & Dawson, N. A. Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *Journal of Clinical Oncology* **13**, 1800–1816 (1995).
65. Tallman, M. S. *et al.* Granulocytic sarcoma is associated with the 8;21 translocation in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **11**, 690–697 (1993).
66. Schoch, C. *et al.* The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica* **89**, 1082–1090 (2004).
67. Büchner, T. *et al.* Age-Related Risk Profile and Chemotherapy Dose Response in Acute Myeloid Leukemia: A Study by the German Acute Myeloid Leukemia Cooperative Group. *Journal of Clinical Oncology* **27**, 61–69 (2009).
68. Appelbaum, F. R. *et al.* Age and acute myeloid leukemia. *Blood* **107**, 3481–3485 (2006).
69. Auerbach, M. Acute myeloid leukemia in patients more than 50 years of age: Special considerations in diagnosis, treatment, and prognosis. *The American Journal of Medicine* **96**, 180–185 (1994).
70. Grimwade, D. *et al.* The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children’s Leukaemia Working Parties. *Blood* **92**, 2322–2333 (1998).
71. Grimwade, D. The predictive value of hierarchical cytogenetic classification in older adults with acute myeloid leukemia (AML): analysis of 1065 patients entered into the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood* **98**, 1312–1320 (2001).

72. Stasi, R. *et al.* Prognostic value of cytogenetics and multidrug resistance (MDR1) in elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood* **92**, 695–697 (1998).
73. Willman, C. L. Immunophenotyping and cytogenetics in older adults with acute myeloid leukemia: significance of expression of the multidrug resistance gene-1 (MDR1). *Leukemia* **10 Suppl 1**, S33-35 (1996).
74. Leith, C. P. *et al.* Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood* **89**, 3323–3329 (1997).
75. Ofran, Y., Tallman, M. S. & Rowe, J. M. How I treat acute myeloid leukemia presenting with preexisting comorbidities. *Blood* **128**, 488–496 (2016).
76. Budziszewska, B. K. *et al.* Treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia adjusted for performance status and presence of comorbidities: a Polish Adult Leukemia Group study. *Leukemia & Lymphoma* **56**, 2331–2338 (2015).
77. Etienne, A. *et al.* Comorbidity is an independent predictor of complete remission in elderly patients receiving induction chemotherapy for acute myeloid leukemia. *Cancer* **109**, 1376–1383 (2007).
78. Sorror, M. L. *et al.* Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood* **106**, 2912–2919 (2005).
79. Sorror, M. L. *et al.* Development and Validation of a Novel Acute Myeloid Leukemia–Composite Model to Estimate Risks of Mortality. *JAMA Oncology* **3**, 1675 (2017).
80. Østgård, L. S. G. *et al.* Comorbidity and performance status in acute myeloid leukemia patients: a nation-wide population-based cohort study. *Leukemia* **29**, 548–555 (2015).
81. Short, N. J., Rytting, M. E. & Cortes, J. E. Acute myeloid leukaemia. *The Lancet* **392**, 593–606 (2018).
82. Sanz, M. A. *et al.* Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* **113**, 1875–1891 (2009).
83. Montesinos, P. & Sanz, M. A. The Differentiation Syndrome in Patients with Acute Promyelocytic Leukemia: Experience of the Pethema Group and Review of the Literature. *Mediterranean Journal of Hematology and Infectious Diseases* **3**, e2011059 (2011).
84. Yates, J. W., Wallace, H. J., Ellison, R. R. & Holland, J. F. Cytosine arabinoside (NSC-63878) and daunorubicin (NSC-83142) therapy in acute nonlymphocytic leukemia. *Cancer Chemother Rep* **57**, 485–488 (1973).
85. Döhner, H., Weisdorf, D. J. & Bloomfield, C. D. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med* **373**, 1136–1152 (2015).
86. Stone, R. M. *et al.* Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *New England Journal of Medicine* **377**, 454–464 (2017).
87. Lancet, J. E. *et al.* CPX-351 (cytarabine and daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **36**, 2684–2692 (2018).
88. Cornelissen, J. J. *et al.* The European LeukemiaNet AML Working Party consensus statement on allogeneic HSCT for patients with AML in remission: an integrated-risk adapted approach. *Nature Reviews Clinical Oncology* **9**, 579–590 (2012).
89. Zhu, H.-H. *et al.* MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: results from the AML05 multicenter trial. *Blood* **121**, 4056–4062 (2013).

90. Burnett, A. K. *et al.* Optimization of Chemotherapy for Younger Patients With Acute Myeloid Leukemia: Results of the Medical Research Council AML15 Trial. *Journal of Clinical Oncology* **31**, 3360–3368 (2013).
91. Thomas, E. D., Lochte, H. L., Lu, W. C. & Ferrebee, J. W. Intravenous Infusion of Bone Marrow in Patients Receiving Radiation and Chemotherapy. *New England Journal of Medicine* **257**, 491–496 (1957).
92. Gratwohl, A. *et al.* One million haemopoietic stem-cell transplants: a retrospective observational study. *The Lancet Haematology* **2**, e91–e100 (2015).
93. Farag, S. S. *et al.* Comparison of Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation with Chemotherapy in Patients Age 60-70 Years with Acute Myelogenous Leukemia in First Remission. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* **17**, 1796–1803 (2011).
94. Elsayy, M. & Sorrow, M. L. Up-to-date tools for risk assessment before allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplantation* **51**, 1283–1300 (2016).
95. Scott, B. L. *et al.* Myeloablative Versus Reduced-Intensity Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Journal of Clinical Oncology* **35**, 1154–1161 (2017).
96. Jethava, Y. S. *et al.* Conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplants in acute myeloid leukemia. *Bone Marrow Transplantation* **52**, 1504–1511 (2017).
97. Cheson, B. D. *et al.* Report of the National Cancer Institute-sponsored workshop on definitions of diagnosis and response in acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **8**, 813–819 (1990).
98. Cheson, B. D. *et al.* Revised Recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology* **21**, 4642–4649 (2003).
99. Haute Autorité de Santé - ALD n° 30 - Leucémie aiguë de l'adulte. Available from : https://www.has-sante.fr/upload/docs/application/pdf/2012-02/ald_30_gm_leucemies_aigues_adulte_web.pdf. (2012).
100. Baer, M. R. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* **97**, 3574–3580 (2001).
101. Schuurhuis, G. J. *et al.* Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood* **131**, 1275–1291 (2018).
102. Kiessling, R., Klein, E., Pross, H. & Wigzell, H. „Natural” killer cells in the mouse. II. Cytotoxic cells with specificity for mouse Moloney leukemia cells. Characteristics of the killer cell. *European Journal of Immunology* **5**, 117–121 (1975).
103. Trinchieri, G. Biology of Natural Killer Cells. in *Advances in Immunology* vol. 47 187–376 (Elsevier, 1989).
104. Artis, D. & Spits, H. The biology of innate lymphoid cells. *Nature* **517**, 293–301 (2015).
105. Vivier, E. *et al.* Innate Lymphoid Cells: 10 Years On. *Cell* **174**, 1054–1066 (2018).
106. Cooper, M. A., Fehniger, T. A. & Caligiuri, M. A. The biology of human natural killer-cell subsets. *Trends in Immunology* **22**, 633–640 (2001).
107. Bjorkstrom, N. K. *et al.* Expression patterns of NKG2A, KIR, and CD57 define a process of CD56dim NK-cell differentiation uncoupled from NK-cell education. *Blood* **116**, 3853–3864 (2010).
108. Lopez-Verges, S. *et al.* CD57 defines a functionally distinct population of mature NK cells in the human CD56dimCD16+ NK-cell subset. *Blood* **116**, 3865–3874 (2010).

109. Gumá, M. *et al.* Imprint of human cytomegalovirus infection on the NK cell receptor repertoire. *Blood* **104**, 3664–3671 (2004).
110. Sun, J. C., Beilke, J. N. & Lanier, L. L. Adaptive immune features of natural killer cells. *Nature* **457**, 557–561 (2009).
111. Jonsson, A. H. & Yokoyama, W. M. Chapter 2 Natural Killer Cell Tolerance. in *Advances in Immunology* vol. 101 27–79 (Elsevier, 2009).
112. Lodolce, J. P. *et al.* IL-15 Receptor Maintains Lymphoid Homeostasis by Supporting Lymphocyte Homing and Proliferation. *Immunity* **9**, 669–676 (1998).
113. Abel, A. M., Yang, C., Thakar, M. S. & Malarkannan, S. Natural Killer Cells: Development, Maturation, and Clinical Utilization. *Front. Immunol.* **9**, 1869 (2018).
114. Vivier, E., Ugolini, S., Blaise, D., Chabannon, C. & Brossay, L. Targeting natural killer cells and natural killer T cells in cancer. *Nat Rev Immunol* **12**, 239–252 (2012).
115. Mace, E. M. *et al.* Cell biological steps and checkpoints in accessing NK cell cytotoxicity. *Immunology and Cell Biology* **92**, 245–255 (2014).
116. Voskoboinik, I., Whisstock, J. C. & Trapani, J. A. Perforin and granzymes: function, dysfunction and human pathology. *Nature Reviews Immunology* **15**, 388–400 (2015).
117. Screpanti, V., Wallin, R. P. A., Ljunggren, H.-G. & Grandien, A. A Central Role for Death Receptor-Mediated Apoptosis in the Rejection of Tumors by NK Cells. *The Journal of Immunology* **167**, 2068–2073 (2001).
118. Zamai, L. *et al.* Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J. Exp. Med.* **188**, 2375–2380 (1998).
119. Fauriat, C., Long, E. O., Ljunggren, H.-G. & Bryceson, Y. T. Regulation of human NK-cell cytokine and chemokine production by target cell recognition. *Blood* **115**, 2167–2176 (2010).
120. Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. Functions of natural killer cells. *Nature Immunology* **9**, 503–510 (2008).
121. Biassoni, R. *et al.* Human natural killer cell receptors and co-receptors. *Immunol. Rev.* **181**, 203–214 (2001).
122. Bottino, C. *et al.* Identification of PVR (CD155) and Nectin-2 (CD112) as Cell Surface Ligands for the Human DNAM-1 (CD226) Activating Molecule. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 557–567 (2003).
123. Sivori, S. *et al.* p46, a Novel Natural Killer Cell-specific Surface Molecule That Mediates Cell Activation. *J Exp Med* **186**, 1129–1136 (1997).
124. Pessino, A. *et al.* Molecular Cloning of NKp46: A Novel Member of the Immunoglobulin Superfamily Involved in Triggering of Natural Cytotoxicity. *J Exp Med* **188**, 953–960 (1998).
125. Moretta, A. *et al.* Activating receptors and coreceptors involved in human natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 197–223 (2001).
126. Kruse, P. H., Matta, J., Ugolini, S. & Vivier, E. Natural cytotoxicity receptors and their ligands. *Immunol Cell Biol* **92**, 221–229 (2014).
127. Mandelboim, O. *et al.* Recognition of haemagglutinins on virus-infected cells by NKp46 activates lysis by human NK cells. *Nature* **409**, 1055–1060 (2001).
128. 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).
129. Spits, H. *et al.* Innate lymphoid cells — a proposal for uniform nomenclature. *Nat Rev Immunol* **13**, 145–149 (2013).
130. 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).
131. Lotzová, E., Savary, C. A. & Herberman, R. B. Inhibition of clonogenic growth of fresh leukemia cells by unstimulated and IL-2 stimulated NK cells of normal donors. *Leukemia Research* **11**, 1059–1066 (1987).
 132. Tajima, F., Kawatani, T., Endo, A. & Kawasaki, H. Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia. *Leukemia* **10**, 478–482 (1996).
 133. Lowdell, M. W. *et al.* Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells. *Br. J. Haematol.* **117**, 821–827 (2002).
 134. Savani, B. N. *et al.* Rapid natural killer cell recovery determines outcome after T-cell-depleted HLA-identical stem cell transplantation in patients with myeloid leukemias but not with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* **21**, 2145–2152 (2007).
 135. Ruggeri, L. *et al.* Role of natural killer cell alloreactivity in HLA-mismatched hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* **94**, 333–339 (1999).
 136. Velardi, A., Ruggeri, L., Alessandro, null, Moretta, null & Moretta, L. NK cells: a lesson from mismatched hematopoietic transplantation. *Trends Immunol.* **23**, 438–444 (2002).
 137. Ruggeri, L. Effectiveness of Donor Natural Killer Cell Alloreactivity in Mismatched Hematopoietic Transplants. *Science* **295**, 2097–2100 (2002).
 138. Ruggeri, L. *et al.* Donor natural killer cell allorecognition of missing self in haploidentical hematopoietic transplantation for acute myeloid leukemia: challenging its predictive value. *Blood* **110**, 433–440 (2007).
 139. 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).
 140. 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).
 141. Sanchez-Correa, B. *et al.* Decreased expression of DNAM-1 on NK cells from acute myeloid leukemia patients. *Immunol Cell Biol* **90**, 109–115 (2012).
 142. Stringaris, K. *et al.* Leukemia-induced phenotypic and functional defects in natural killer cells predict failure to achieve remission in acute myeloid leukemia. *Haematologica* **99**, 836–847 (2014).
 143. Sandoval-Borrego, D. *et al.* Overexpression of CD158 and NKG2A Inhibitory Receptors and Underexpression of NKG2D and NKp46 Activating Receptors on NK Cells in Acute Myeloid Leukemia. *Archives of Medical Research* **47**, 55–64 (2016).
 144. Verheyden, S., Bernier, M. & Demanet, C. Identification of natural killer cell receptor phenotypes associated with leukemia. *Leukemia* **18**, 2002–2007 (2004).
 145. Chretien, A.-S. *et al.* NKp30 expression is a prognostic immune biomarker for stratification of patients with intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Oncotarget* **8**, (2017).
 146. Pasero, C. *et al.* Highly effective NK cells are associated with good prognosis in patients with metastatic prostate cancer. *Oncotarget* **6**, (2015).
 147. Garcia-Iglesias, T. *et al.* Low NKp30, NKp46 and NKG2D expression and reduced cytotoxic activity on NK cells in cervical cancer and precursor lesions. *BMC Cancer* **9**, (2009).
 148. 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. *OncImmunity* **6**, e1307491 (2017).

149. 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).
150. Bendall, S. C. & Nolan, G. P. From single cells to deep phenotypes in cancer. *Nat Biotechnol* **30**, 639–647 (2012).
151. Bruggner, R. V., Bodenmiller, B., Dill, D. L., Tibshirani, R. J. & Nolan, G. P. Automated identification of stratifying signatures in cellular subpopulations. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**, E2770–E2777 (2014).
152. Kovalenko, E. I., Streltsova, M. A., Kanevskiy, L. M., Erokhina, S. A. & Telford, W. G. Identification of Human Memory-Like NK Cells. *Curr Protoc Cytom* **79**, 9.50.1-9.50.11 (2017).
153. Baragaño Raneros, A., López-Larrea, C. & Suárez-Álvarez, B. Acute myeloid leukemia and NK cells: two warriors confront each other. *OncImmunity* **8**, e1539617 (2019).
154. Chretien, A.-S. *et al.* Increased NK Cell Maturation in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology* **6**, (2015).
155. Chretien, A.-S. *et al.* Natural Killer Defective Maturation Is Associated with Adverse Clinical Outcome in Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
156. Galon, J. Type, Density, and Location of Immune Cells Within Human Colorectal Tumors Predict Clinical Outcome. *Science* **313**, 1960–1964 (2006).
157. Han, B. *et al.* Altered NKp30, NKp46, NKG2D, and DNAM-1 Expression on Circulating NK Cells Is Associated with Tumor Progression in Human Gastric Cancer. *Journal of Immunology Research* **2018**, 1–9 (2018).
158. Szczepanski, M. J. *et al.* Interleukin-15 enhances natural killer cell cytotoxicity in patients with acute myeloid leukemia by upregulating the activating NK cell receptors. *Cancer Immunol Immunother* **59**, 73–79 (2010).
159. Martner, A. *et al.* Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *OncImmunity* **5**, e1041701 (2016).
160. Vego, H. *et al.* Monomethyl fumarate augments NK cell lysis of tumor cells through degranulation and the upregulation of NKp46 and CD107a. *Cellular & Molecular Immunology* **13**, 57–64 (2016).
161. Wiernik, A. *et al.* Targeting Natural Killer Cells to Acute Myeloid Leukemia In Vitro with a CD16 x 33 Bispecific Killer Cell Engager and ADAM17 Inhibition. *Clinical Cancer Research* **19**, 3844–3855 (2013).
162. Märklin, M. *et al.* Bispecific NKG2D-CD3 and NKG2D-CD16 fusion proteins for induction of NK and T cell reactivity against acute myeloid leukemia. *j. immunotherapy cancer* **7**, 143 (2019).
163. Gauthier, L. *et al.* Multifunctional Natural Killer Cell Engagers Targeting NKp46 Trigger Protective Tumor Immunity. *Cell* **177**, 1701-1713.e16 (2019).
164. Fauriat, C. *et al.* Natural Killer Cell-triggering Receptors in Patients with Acute Leukaemia. *Leukemia & Lymphoma* **44**, 1683–1689 (2003).
165. Brown, M. & Wittwer, C. Flow Cytometry: Principles and Clinical Applications in Hematology. *Clinical Chemistry* **46**, 1221–1229 (2000).
166. Ganzel, C. *et al.* Very poor long-term survival in past and more recent studies for relapsed AML patients: The ECOG-ACRIN experience. *American Journal of Hematology* **93**, 1074–1081 (2018).
167. Kaplan, E. L. & Meier, P. Nonparametric Estimation from Incomplete Observations. *J Am Stat Assoc* **53**, 457–481 (1958).

Annexes

Annexe 1 : Panel n°1 d'anticorps utilisés en cytométrie de masse

Marqueur	Canal	Métal	Marqueur de gating
CD45	89	Y	Pan leucocytaire
CD3	115	In	Lymphocytes T
TCRVd2	141	Pr	Lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2
CD19	142	Nd	Lymphocytes B
CD45RA	143	Nd	Lymphocytes T naïfs et mémoires (TEMRA)
CD4	145	Nd	Lymphocytes TCD4
CD8	146	Nd	Lymphocytes TCD8
TCRpan$\gamma\delta$	153	Eu	Lymphocytes T $\gamma\delta$
Anti-biotine	170	Er	Anticorps secondaire
CD56	176	Yb	Marqueur des lymphocytes NK
Iridium	191	Ir	Intercalant de l'ADN – Marqueur cellulaire
Iridium	193	Ir	Intercalant de l'ADN – Marqueur cellulaire
Platine	195	Pt	Cellules mortes
CD13	Biotine		Blastes myéloïdes
CD33	Biotine		Monocytes et blastes myéloïdes
CD34	Biotine		Blastes myéloïdes

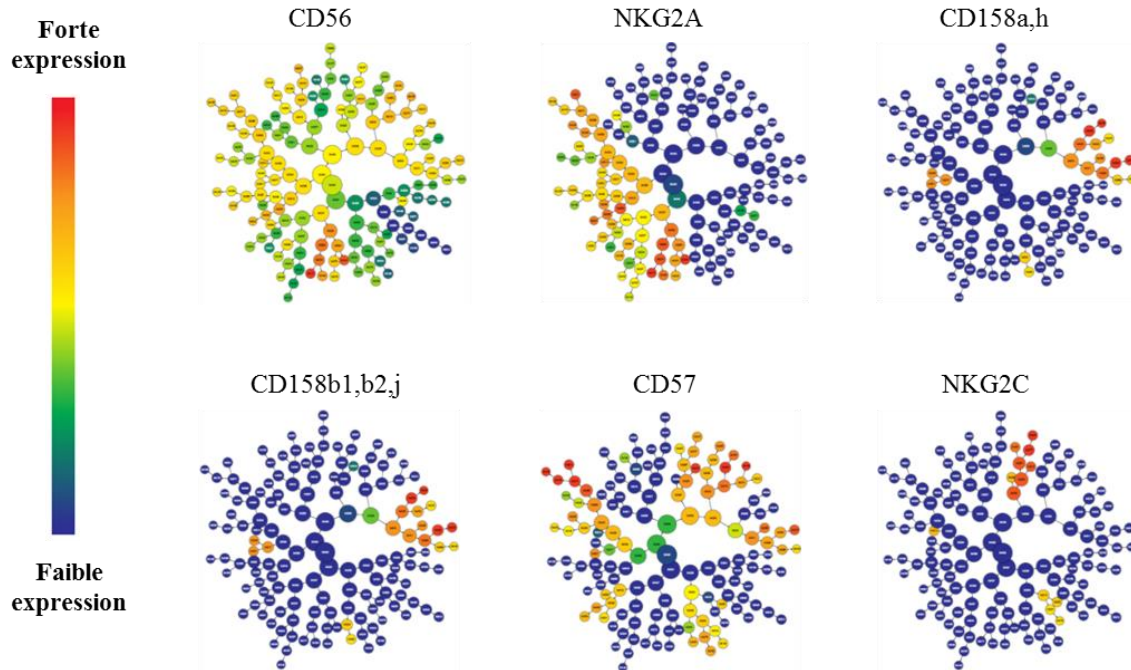
Marqueur	Canal	Métal	Fonction sur les cellules NK
Bcl2	150	Nd	Marqueur anti-apoptotique
NKG2C	152	Sm	Récepteur activateur
CD158b1/b2j	154	Sm	KIR : récepteur inhibiteur
CD27	155	Gd	Co-récepteur activateur
Bcl-xl	158	Gd	Marqueur anti-apoptotique
Ki67	159	Tb	Marqueur de prolifération
NKG2D	160	Gd	Récepteur activateur
NKp46	162	Dy	Récepteur activateur
DNAM-1	164	Dy	Co-récepteur activateur
NKG2A	165	Ho	Récepteur inhibiteur
CD96	166	Er	Co-récepteur activateur (chez l'Homme)
CD158a/h	168	Er	KIR : récepteur inhibiteur
NKp30	169	Tm	Récepteur activateur
CD57	172	Yb	Maturation
CD16	209	Bi	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

Annexe 2 : Panel n°2 d'anticorps utilisés en cytométrie de masse

Marqueur	Canal	Métal	Marqueurs de gating
CD45	89	Y	Pan leucocytaire
CD3	115	In	Lymphocytes T
CD45RA	143	Nd	Lymphocytes T naïfs et mémoires (TEMRA)
CD8a	146	Nd	Lymphocytes TCD8
TCRVd2	169	Tm	Lymphocytes T $\gamma\delta$ V δ 2
Anti-biotine	170	Er	Anticorps secondaire
CD4	174	Yb	Lymphocytes TCD4
CD56	176	Yb	Lymphocytes NK
Iridium	191	Ir	Intercalant de l'ADN – Marqueur cellulaire
Iridium	193	Ir	Intercalant de l'ADN – Marqueur cellulaire
Platine	195	Pt	Cellules mortes
CD13	Biotine		Blastes myéloïdes
CD33	Biotine		Monocytes et blastes myéloïdes
CD34	Biotine		Blastes myéloïdes

Marqueur	Canal	Métal	Fonction sur les cellules NK
Ki67	141	Pr	Marqueur de prolifération
CD45RA	143	Nd	Marqueur des lymphocytes T naïfs et mémoires
HVEM	144	Nd	Ligand de BTLA (inhibiteur) et de LIGHT(activateur)
IL-2R	149	Sm	Récepteur à la cytokine IL2
OX 40	150	Nd	Récepteur co-stimulateur
ICOS	151	Eu	Récepteur co-stimulateur
TIM-3	153	Eu	Récepteur inhibiteur
TIGIT	154	Sm	Récepteur inhibiteur
PD-1	155	Gd	Récepteur inhibiteur
PD-L1	156	Gd	Ligand de PD-1 (inhibiteur)
4-1BB	158	Gd	Récepteur inhibiteur (chez l'Homme)
CCR7	159	Tb	Récepteur aux chimiokines CCL19 et 21
CD28	160	Gd	Récepteur co-stimulateur
CTLA-4	161	Dy	Récepteur inhibiteur
BTLA	163	Dy	Récepteur inhibiteur
CD95	164	Dy	Fas : récepteur induisant l'apoptose
IL-7R	165	Ho	Récepteur à la cytokine IL7
CD44	166	Er	Molécule activatrice
CD27	167	Er	Co-récepteur activateur
CD69	168	Er	Molécule activatrice
DNAM-1	171	Yb	Co-récepteur activateur
CD57	172	Yb	Marqueur de maturation
LAG-3	175	Lu	Récepteur inhibiteur
CD16	209	Bi	Cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps

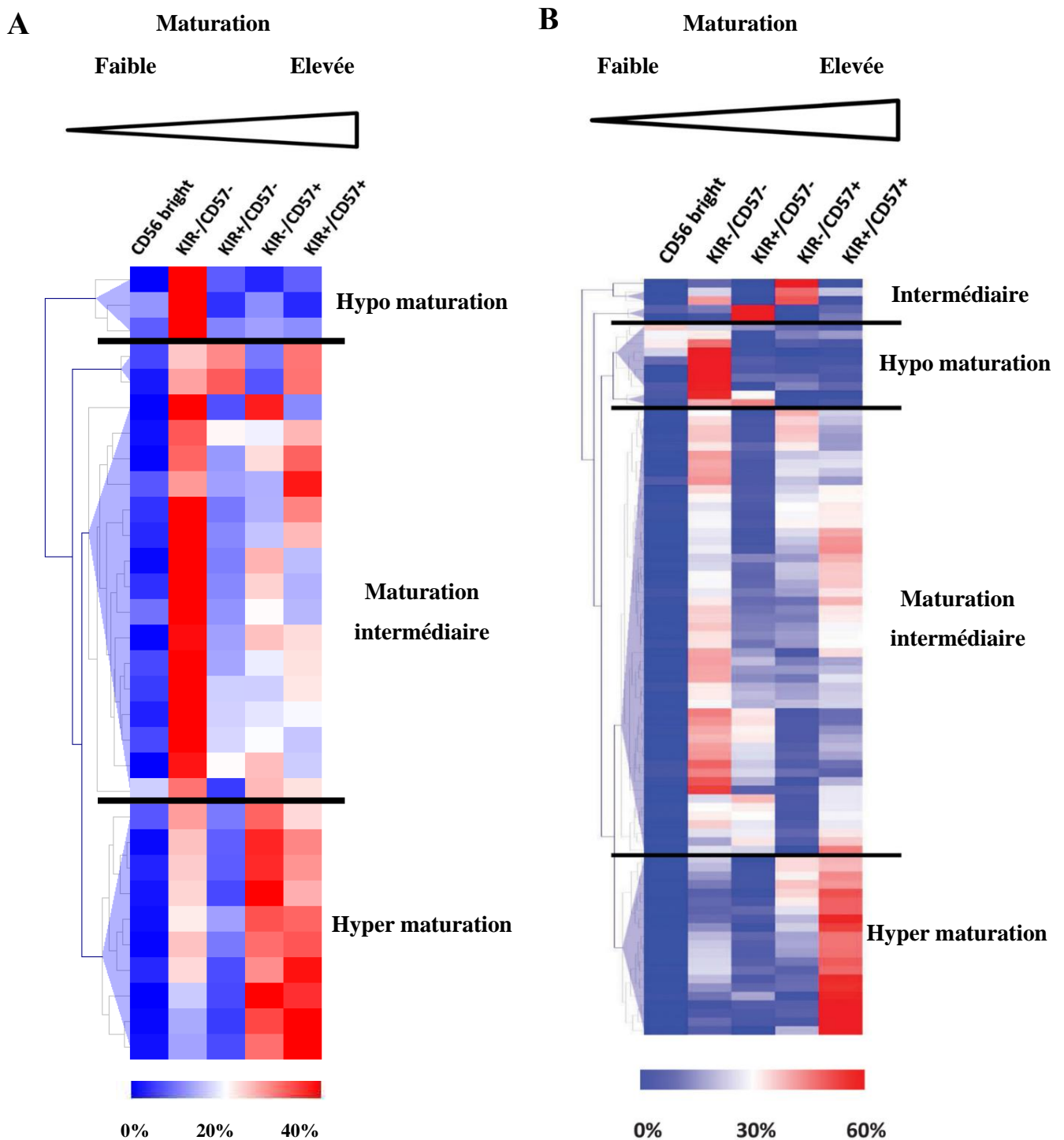
Annexe 3 : Etude des sous-populations cellulaires NKp46⁺ et NKp46⁻ à l'aide de l'algorithme CITRUS.



Arbre CITRUS généré à partir des sous-populations cellulaires NK NKp46⁺ et NKp46⁻ des VS (n=10) et patients atteints de LAM (n=18), selon l'intensité d'expression des marqueurs CD56, NKG2A, CD16, KIR (CD158a,h et CD158b1,b2,j), CD57 et NKG2C.

Chaque nœud représente un ensemble de cellules phénotypiquement similaire, issues des 4 groupes préalablement formés (VS NKp46⁺ (n=10), VS NKp46⁻ (n=10), LAM NKp46⁺ (n=18) et LAM NKp46⁻ (n=18)). La couleur de chaque nœud correspond au niveau d'expression du marqueur correspondant (gradient de couleur allant du bleu pour une faible expression, au rouge pour une forte expression).

Annexe 4 : Classification non supervisée des patients LAM selon le profil de maturation des cellules NK



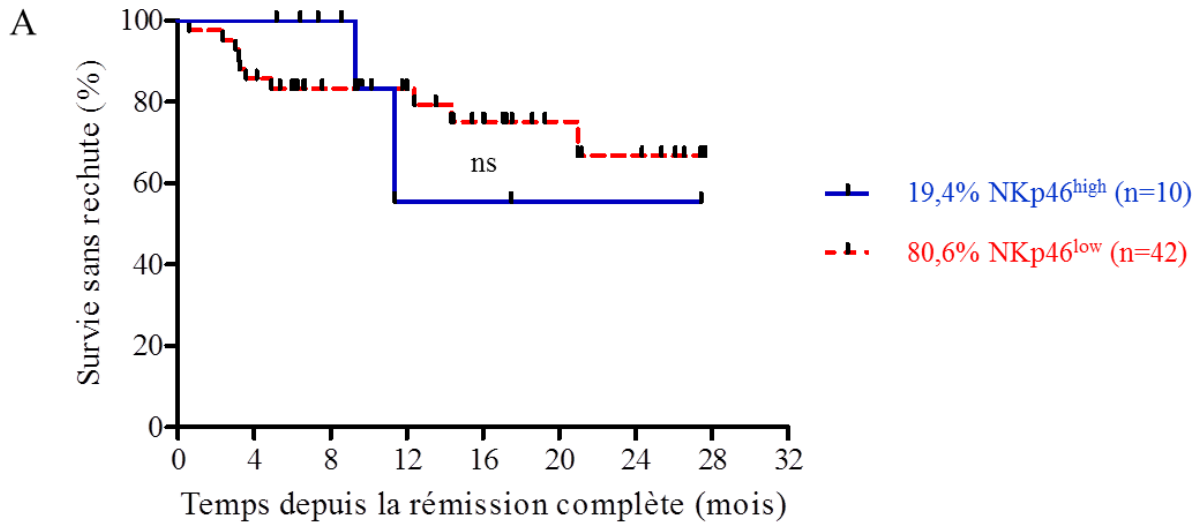
(A) Classification hiérarchique (distance Euclidienne) des cellules NK des échantillons de VS (n=10), LAM NKp46^{high} (n=6) et LAM NKp46^{low} (n=15) selon leur profil de maturation.

(B) Classification hiérarchique (distance Euclidienne) des cellules NK des échantillons de VS (n=19), LAM (n=87) issus de la publication de *Chretien et al.*, *Frontiers immunology*, 2017.

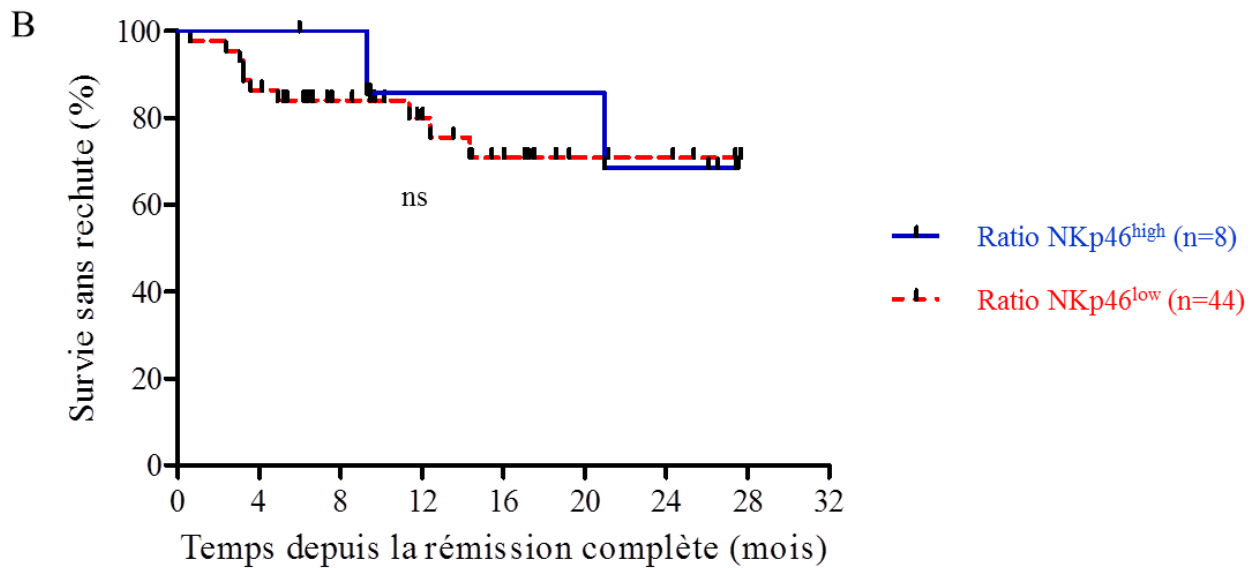
Annexe 5 : Survie sans rechute des patients NKp46^{high} et NKp46^{low}

(A) selon une répartition respective de 19,4% et 80,6%

(B) selon le ratio MFI par rapport à l'isotype



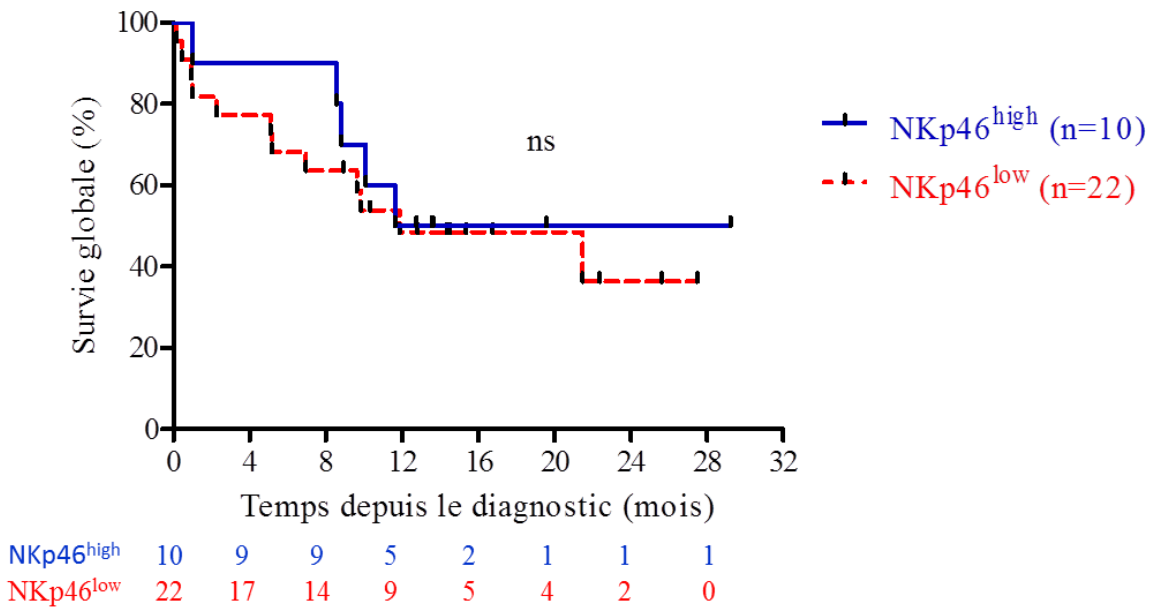
NKp46 ^{high}	10	10	8	3	3	2	2	0
NKp46 ^{low}	42	37	27	23	17	10	8	0



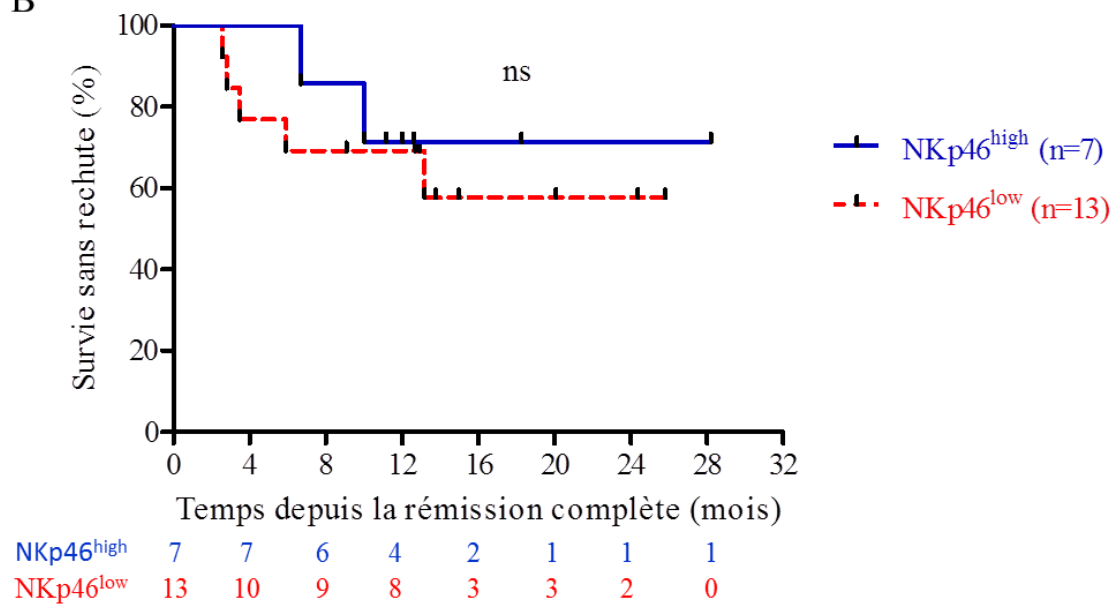
NKp46 ^{high}	8	8	8	6	6	6	5	0
NKp46 ^{low}	44	39	27	19	14	6	5	0

Annexe 6 : Survie globale (A) et sans rechute (B) des patients induits âgés de plus de 65 ans en fonction de leur statut NKp46 au diagnostic

A



B



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.