



Évaluation de l'approche LAIP/LSC (Leukemia Associated ImmunoPhenotype/Leukemic Stem Cells) au diagnostic et au suivi des leucémies aiguës myéloïdes chez l'adulte

Flora Droguet

► To cite this version:

Flora Droguet. Évaluation de l'approche LAIP/LSC (Leukemia Associated ImmunoPhenotype/Leukemic Stem Cells) au diagnostic et au suivi des leucémies aiguës myéloïdes chez l'adulte. Sciences pharmaceutiques. 2020. dumas-03428311

HAL Id: dumas-03428311

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03428311>

Submitted on 15 Nov 2021

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.



THESE

(Spécialité DES Biologie Médicale)

Conformément aux dispositions de l'arrêté du 4 octobre 2019

Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie

**Evaluation de l'approche LAIP/LSC (Leukemia Associated ImmunoPhenotype/
Leukemic Stem Cells) au diagnostic et au suivi des leucémies aiguës
myéloïdes chez l'adulte**

**Présentée par
Flora DROGUET**

**Soutenue publiquement le Jeudi 10 Décembre 2020
devant le jury composé de**

Mme Pascale SCHUMANN-BARD	Professeur des Universités – Université de Caen Normandie	Président du jury
M. Yohann REPESSE	Professeur des Universités – Praticien Hospitalier, Laboratoire d'hématologie, CHU Caen	Examineur
M. Sylvain CHANTEPIE	Praticien Hospitalier, IHBN, CHU Caen	Examineur
Mme Elsa MAITRE	Assistante Hospitalo-Universitaire, Laboratoire d'hématologie, CHU Caen	Examineur
M. Edouard CORNET	Praticien Hospitalier, Laboratoire d'hématologie, CHU Caen	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Docteur Edouard CORNET

LISTE DES ENSEIGNANTS-CHERCHEURS

Directeur de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques
Professeur Michel BOULOUARD

Assesseurs
Professeur Pascale SCHUMANN-BARD
Professeur Anne-Sophie VOISIN-CHIRET

Directrice administrative
Madame Sarah CHEMTOB

Directrice administrative adjointe
Madame Emmanuelle BOURDON

PROFESSEURS DES UNIVERSITES

BOULOUARD Michel	Physiologie, Pharmacologie
BUREAU Ronan	Biophysique, Chémoinformatique
COLLOT Valérie	Pharmacognosie
DALLEMAGNE Patrick	Chimie médicinale
DAUPHIN François	Physiologie, Pharmacologie
DELEPEE Raphaël	Chimie analytique
FABIS Frédéric	Chimie organique
FRERET Thomas	Physiologie, Pharmacologie
GARON David	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
GIARD Jean-Christophe	Bactériologie, Virologie
MALZERT-FREON Aurélie	Pharmacie galénique
ROCHAIS Christophe	Chimie organique
SCHUMANN-BARD Pascale	Physiologie, Pharmacologie
SICHEL François	Toxicologie
SOPKOVA Jana	Biophysique, Drug design
VOISIN-CHIRET Anne-Sophie	Chimie médicinale

MAITRES DE CONFERENCES DES UNIVERSITES

ANDRE Véronique – HDR	Biochimie, Toxicologie
BOUET Valentine – HDR	Physiologie, Pharmacologie
CAILLY Thomas – HDR	Chimie bio-inorganique, Chimie organique
DENOYELLE Christophe – HDR	Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie, Cancérologie
DHALLUIN Anne	Bactériologie, Virologie, Immunologie
ELDIN de PECOULAS Philippe – HDR	Parasitologie, Mycologie médicale
GROO Anne-Claire	Pharmacie galénique
KIEFFER Charline	Chimie médicinale

KRIEGER Sophie (Praticien hospitalier) – HDR	Biologie clinique
LAPORTE-WOJCIK Catherine	Chimie bio-inorganique
LEBAILLY Pierre – HDR	Santé publique
LECHEVREL Mathilde – HDR	Toxicologie
LEGER Marianne	Physiologie, Pharmacologie
LEPAILLEUR Alban – HDR	Modélisation moléculaire
N'DIAYE Monique	Parasitologie, Mycologie médicale, Biochimie clinique
PAIZANIS Eleni	Physiologie, Pharmacologie
PEREIRA-ROSENFELD Maria de Fatima	Chimie organique et thérapeutique
POTTIER Ivannah	Chimie et toxicologie analytiques
PREVOST Virginie – HDR	Chimie analytique, Nutrition, Education thérapeutique du patient
QUINTIN Jérôme	Pharmacognosie
RIOULT Jean-Philippe	Botanique, Mycologie, Biotechnologies
SINCE Marc	Chimie analytique
VILLEDIEU Marie – HDR	Biologie et thérapies innovantes des cancers

PROFESSEUR AGREGÉ (PRAG)

PRICOT Sophie	Anglais
----------------------------	---------

PERSONNEL ASSOCIÉ À TEMPS PARTIEL (PAST)

SAINT-LORANT Guillaume	Pharmacie clinique
SEDILLO Patrick	Pharmacie officinale
RICHARD Estelle	Pharmacie officinale

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

JOURDAN Jean-Pierre	
----------------------------	--

Enseignants titulaires du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie

REMERCIEMENTS

A Mme le **Professeur Pascale SCHUMANN-BARD**. Vous me faites l'honneur d'accepter la présidence de ce jury de thèse. Je vous remercie d'avoir contribué de par vos enseignements durant mes années de faculté et votre bonne humeur à me confirmer mon aspiration pour les sciences de la santé.

A M. le **Professeur Yohann REPESSE**. Je te remercie d'avoir accepté d'évaluer mon travail sans hésitation. Merci tout particulièrement à toi d'avoir contribué à me faire apprécier autant le côté cytologie que le côté hémostase de par tes enseignements toujours très clairs. Merci pour ta bonne humeur et ton implication dans le parcours des internes.

A M. le **Docteur Sylvain CHANTEPIE**. Ce fut pour moi une évidence de vous proposer de juger ce travail en lien direct avec votre discipline. Veuillez trouver ici l'expression de mes sincères remerciements et de mon profond respect.

A Mme le **Docteur Elsa MAITRE**. Je tiens énormément à te remercier non pas seulement pour avoir accepté sans hésitation d'évaluer ce travail de thèse mais également pour tout ce que tu m'as appris durant cette année d'internat et ce n'est pas fini ! Merci pour tout, pour ta joie de vivre, ta gentillesse, ta disponibilité sans pareille et tous tes bons conseils !

A M. le **Docteur Edouard CORNET**. Merci de m'avoir confié ce travail de thèse si passionnant qui m'a permis d'appréhender de façon plus approfondie cette belle discipline qu'est la cytométrie en flux. Merci à toi pour la direction de ce travail, la transmission de tes connaissances et pour ton temps consacré qui, je le sais, est précieux. Merci pour ta bonne humeur et ton éternel optimisme !

A ma famille, la plus belle de toute.

Merci Maman, merci Papa, merci pour TOUT ! Merci d'avoir cru en moi jusqu'au bout, pour votre amour inconditionnel, pour votre soutien dans les plus beaux moments comme les moins beaux ! Merci d'avoir toujours été là pour moi sans exception, d'avoir toujours trouvé une solution pour me redonner le sourire lors de mes petites galères... <3 Si je suis allée aussi loin aujourd'hui, c'est en grande partie grâce à vous !! Je vous aime.

A mon petit frère Tom, mon futur Nolan et ma petite sœur Emie, la plus géniale de toute ! Quelle fierté d'être votre grande sœur ! Merci pour votre joie de vivre, nos petits moments passés ensemble si précieux et même nos petites chamailleries, je vous aime aussi hein :p

A Mamie et Papy, merci pour tout également ! Personne n'aurait pu rêver mieux comme grands-parents... Merci d'être vous tout simplement ! Merci pour votre implication dans mes études de A à Z. Cette réussite, je vous la dois aussi ! Quelle fierté de vous avoir près de moi. Je vous aime.

A tous mes co-internes et en particulier...

A toi Jul', mon partenaire de fiesta du premier jour de l'internat, ma fraise givrée, l'encyclopédie sur pattes :P Merci d'avoir apporté un peu de soleil au Nord et de m'avoir fait chasser de l'esprit que tous les marseillais n'étaient pas pour l'OM et ne se surnommaient pas tous l'OVNI !

A toi Alex, mon binôme de l'internat... comme si c'était une évidence, mon binôme de toujours ! Merci d'avoir réussi à me supporter pendant tous ces semestres ! Un merci tout particulier pour la relecture de mon travail ! Plus qu'un binôme, un véritable ami, merci d'avoir toujours été à l'écoute <3. Ces années d'internat n'auraient pas du tout eu la même saveur sans toi.

A mes amis de la Fac' et en particulier...

A Justine, mon « ptit cœur », merci pour ta joie de vivre communicative, pour tous ces moments passés ensemble et cela n'est pas prêt de s'arrêter ! Une amie en or !

A Camille, Marine, Gwen, sans qui ces années de fac n'auraient pas été aussi folles !!

A la Boseteam®, une véritable petite famille, une vraie marque déposée, bientôt presque un « docteur » en plus ... :P Merci d'être vous ! <3

A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie du CHU de Caen et en particulier...

A toi Pauline pour ta gentillesse, ta disponibilité et nos moments de déconnade et à toi Bettina, pour avoir été une co-interne exemplaire et pour m'avoir transmis tes connaissances et ta rigueur « hémostasienne » !

A Véronique Salaun pour m'avoir transmis votre passion pour la cytologie, pour vos conseils et votre rigueur.

A Dina Naguib et Margaux, pour leurs explications « moléculaires » !

Aux techniciens de la CMF : Thibault (à qui je dois pas mal de gâteaux mais qui lui aussi m'en doit donc ça ne compte pas... :P), Florent (aussi bon pédagogue que joueur de belote ☺), Eugénie, Lydie, Véronique, Sabrina pour avoir su guetter l'arrivée de mes prélèvements médullaires si précieux. Merci d'avoir répondu à mes innombrables appels téléphoniques et à mes « Y'a des prélèvements pour moi ?? »

A mon amour.

A toi Charlie. Même les plus longs remerciements du monde ne suffiraient pas tellement tu as été (et tu es...) juste parfait. Absolument rien n'aurait été possible sans toi. Merci d'avoir été là 7j/7, 24h/24 et toujours au top ! Merci de m'avoir supportée tout au long de ce travail (et pas que ...) et d'avoir tout simplement su faciliter et ensoleiller ma vie dans les moments les plus difficiles. Merci pour ta patience, tes conseils, tes relectures et ton optimisme hors norme... Merci d'être tout simplement toi !!! A moi de te rendre la pareille l'année prochaine, faire mieux que toi est quasi impossible. Je t'aime de tout mon cœur.

« Je suis de ceux qui pensent que la science est d'une grande beauté. Un scientifique dans son laboratoire est non seulement un technicien : il est aussi un enfant placé devant des phénomènes naturels qui l'impressionnent comme des contes de fées. »

Marie Curie

Table des matières

LISTE DES ABREVIATIONS.....	1
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	3
LISTE DES ANNEXES.....	6
INTRODUCTION.....	7
I. Hématopoïèse et Niche hématopoïétique	7
1. Hématopoïèse physiologique	7
2. Notion de niche hématopoïétique.....	11
II. Les leucémies aiguës myéloïdes	13
1. Définition	13
2. Des hémopathies hétérogènes	14
III. Hématopoïèse clonale et état pré-leucémique	24
IV. Le concept de cellules souches leucémiques (LSC)	25
1. Historique.....	25
2. L'hétérogénéité, une notion phare dans la définition des LSC	26
3. La LSC comme cellule régénératrice de leucémie (LRC) ?.....	27
V. Le suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes.....	28
1. Maladie résiduelle Minimale (MRD) : définition et intérêts	28
2. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire.....	31
3. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux	32
4. Utilisation combinée de l'approche MRD LAIP et de l'approche LSC	44
5. MRD en RT-qPCR Versus MRD en CMF (approche LAIP/DfN).....	45
RATIONNEL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE.....	47
MATERIEL ET METHODE.....	48
I. Matériel.....	48
1. Echantillons de moelle osseuse	48
2. Patients témoins	48
3. Patients au diagnostic de LAM et au suivi.....	48
II. Méthode	49
1. Pré-analytique.....	49
2. Analytique	53
3. Post-analytique	53
RESULTATS.....	66
I. Patients	66
1. Patients témoins	66
2. Patients au diagnostic de leucémie aiguë myéloïde	68
3. Patients au suivi de leucémie aiguë myéloïde	69
II. Approche LAIP/DfN :	70
1. Détermination du seuil pour une MRD positive sur le LAIP CD7/CD56	70
2. Approche LAIP/DfN au diagnostic de LAM.....	71
3. Approche LAIP/DfN au suivi	77
4. Comparaison entre l'approche LAIP/DfN en méthode Ficoll [®] et l'approche LAIP/DfN en Lyse macrovolume.....	79

5.	Approche LAIP/DfN à la rechute	79
6.	Approche LAIP panel LA Versus Approche LAIP panel LSC	79
III.	Approche LSC.....	80
1.	Identification des HSC chez les patients témoins	80
2.	Détermination du seuil de positivité définissant la présence de LSC chez les patients atteints de LAM au suivi.....	81
3.	Approche LSC au diagnostic des patients atteints de LAM.....	82
4.	Approche LSC au suivi des patients atteints de LAM	91
5.	Approche LSC à la rechute d'un patient atteint de LAM.....	93
IV.	Suivi de la MRD en biologie moléculaire des patients de l'étude	96
V.	Distinction fragile entre HSC et LSC, difficulté conceptuelle ?	97
DISCUSSION	100	
I.	Pré-analytique	100
II.	Analytique	101
1.	Standardisation et réglage du cytomètre	101
2.	Robustesse du panel LSC.....	102
3.	Sensibilité et spécificité analytiques	102
III.	Post-analytique.....	103
1.	Approche LAIP.....	103
2.	Approche LSC	108
IV.	Applicabilité des approches de la MRD dans les LAM au CHU de Caen	115
1.	Difficultés organisationnelles.....	115
2.	Proposition de panel au CHU de CAEN	116
CONCLUSION	117	
BIBLIOGRAPHIE.....	118	
ANNEXES	124	
VU, LE PRESIDENT DU JURY	143	

LISTE DES ABREVIATIONS

ARCH	Age-Related Clonal Hematopoiesis
BIG-1	Backbone Inter-Group 1
CBF	Core Binding Factor
CD	Cluster de Différenciation
CFU	Colony Forming Unit
CHIP	Clonal Hematopoiesis of Indeterminate Potential
CIVD	Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée
CMF	Cytométrie en Flux
CLP	Common Lymphoid Progenitor
CMP	Common Myeloid Progenitor
DfN	Different from Normal
ELN	European Leukemia Net
EPO	Erythropoïétine
FAB	French American British
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
Flt3-L	Fms-Like Tyrosin Kinase 3
FSC	Forward Scatter
GMP	Granulocyte-Macrophage Progenitors
GM-CSF	Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor
HSC	Hematopoietic Stem Cell
IL	InterLeukine
LAIP	Leukemia-associated Aberrant ImmunoPhenotype\$
LAL	Leucémie Aiguë Lymphoblastique
LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
LMPP	Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor
LRC	Leukemia-Regenerating Cells
LSC	Leukemia Stem Cell
LTC-IC	Long-Term Culture – Initiating Cells
M-CSF	Macrophage Colony-Stimulating Factor
MEP	Megakaryocyte-Erythroid Progenitors
MFI	Median Fluorescence Intensity
MGG	May-Grünwald Giemsa
MLP	Multi-Lymphoid Progenitor

MNC	Mononuclear Cells
MPO	Myéloperoxydase
MPP	Multi-Potent Progenitor
MRD	Minimal Residual Disease
nHSC	normal Hematopoietic Stem Cell
NK	Natural Killer
NOD/SCID	Non Obese Diabetic / Severely Compromised ImmunoDeficient
NOS	No Otherwise Specification
OXPHOS	Oxidative Phosphorylation
PMT	Photomultiplicateur
PNN	Polynucléaire neutrophile
RFS	Relapse-Free Survival
RT-qPCR	Real Time - quantitative Polymerase Chain Reaction
SL-IC	Severely compromised immunodeficient Leukemia-Initiating Cell
SRC	SCID-Repopulating Cells
SSC	Side Scatter
TPO	Thrombopoïétine
WBC	White Blood Cells

LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX

Figure 1 Modèle actuel de l'hématopoïèse humaine et phénotype des différents progéniteurs.....	10
Figure 2 Représentation schématique de la niche hématopoïétique dans une moelle osseuse adulte (11)	12
Figure 3 Evolution des taux d'incidence entre le début de la période d'étude et 2018, en France métropolitaine, par sexe et âge, pour les leucémie aiguës myéloïdes dont l'incidence est en augmentation durant la période d'étude – Echelle logarithmique (16).....	14
Figure 4 Exemples de morphologies blastiques (photographies prises au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen, coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG), microscope optique, grossissement x1000)	16
Figure 5 Profil d'expression antigénique en fonction du stade de maturation de la lignée granuleuse, d'après (18)	18
Figure 6 Les différentes classes moléculaires des LAM de l'adulte jeune jusqu'à environ 65 ans (19)20	
Figure 7 Evolution clonale chez un patient atteint d'une LAM (UPN933124)(23).....	21
Figure 8 Importance de l'hématopoïèse clonale dans divers scénarios clinico-biologiques, d'après (29)	24
Figure 9 – Modèle comparant l'organisation du système hématopoïétique normal et leucémique, d'après (32)	26
Figure 10 Représentation schématique des différentes évolutions de la MRD dans les LAM après traitement intensif, ainsi que les indications de suivi de la MRD en fonction de la période du prélèvement, d'après (41).....	29
Figure 11 Représentation schématique d'un cytomètre, d'après (47)	33
Figure 12 Histogramme bi-paramétrique SSC/CD45 permettant la sélection des différentes populations leucocytaires (moelle osseuse saine)	34
Figure 13 Incidence cumulée du taux de rechute selon le statut MRD évaluée par CMF, d'après (54)	37
Figure 14 Valeur pronostique de la fréquence des LSC au diagnostic, d'après (56).....	38
Figure 15 Valeur pronostique de la fréquence de LSC au suivi, d'après (56)	38
Figure 16 Hiérarchie évolutive dans les LAM (62)	40
Figure 17 Effet de TIM-3 sur les différents types cellulaires (66).....	42
Figure 18 Valeur pronostique de l'utilisation combinée de l'approche LAIP et de l'approche LSC sur la survie sans rechute (RFS) en post-induction (2ème cycle), d'après (56)	45
Figure 19 Elimination des éventuels doublets et réglage de la fenêtre « Time »	54
Figure 20 Sélection des différentes populations leucocytaires	55
Figure 21 Sélection des populations blastiques d'intérêt	56
Figure 22 Stratégie d'obtention des populations P8, P7 et P6 (tube LSC1).....	57
Figure 23 Histogrammes bi-paramétriques conditionnées sur les populations « Blastos » et « Lympho45+ » permettant la détermination des seuils de positivité des marqueurs du tube LSC1 ...	58
Figure 24 Stratégie de sélection de la fenêtre de positivité pour le CD7/CD56 (tube contrôle)	59
Figure 25 Fenêtrage LAIP1 à LAIP 10 (tube LSC1).....	60

Figure 26 Visualisation du phénotype des populations P8 (bleu foncé), P7 (vert foncé) et P6 (jaune foncé) présentes dans la population MNC34+	61
Figure 27 Vérification de l'existence d'un cluster pour la population résultant de la booléenne d'identification LSCT1.....	62
Figure 28 Histogrammes bi-paramétriques conditionnés sur les populations « Blastos », « Lympho45+ » et « CD45- » permettant la détermination des seuils de positivité des marqueurs du tube LSC2.....	63
Figure 29 Vérification de l'existence d'un cluster pour la population résultant de la booléenne d'identification LSCT2mix	64
Figure 30 Histogrammes bi-paramétriques conditionnés sur les populations « Blastos » et « Lympho45+ » permettant la détermination des seuils de positivité au diagnostic de LAM pour le patient n°4 au diagnostic.	74
Figure 31 Fenêtrage du CD7/CD56 pour le patient n°4 au diagnostic.....	75
Figure 32 Sélection des populations blastiques (patient n°4)	75
Figure 33 Fenêtrage LAIP 1 à 10 pour le patient n°4 au diagnostic	76
Figure 34 Contrôle de la « clusterisation » de la population MRD LAIP	76
Figure 35 Rétro-gating du nombre d'événements récupérés par la booléenne d'intersection des fenêtres LAIP 1 à 10 sur le LAIP CD7/CD56 pour le patient n°4 lors des différents points de suivi.....	78
Figure 36 Histogrammes bi-paramétriques permettant la mise en évidence du phénotype CSH like..	80
Figure 37 Corrélation entre l'approche LSCT1 WBC45+ et l'approche LSCT2 WBC45+ au diagnostic des patients atteints de LAM	83
Figure 38 Histogrammes bi-paramétriques représentant la sélection des différentes populations leucocytaires à gauche et la sélection de la population BL34+/-117+/- à droite (patient n°3)	85
Figure 39 Sélection des populations P8, P7 et P6 (patient n°3)	86
Figure 40 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC1 dans les populations P8, P7 et P6 du patient n°3	86
Figure 41 Vérification de "clusterisation" pour la population LSCT1 obtenue par la booléenne LSCT1 (patient n°3)	87
Figure 42 « Retro-gating » sur le dot plot sélectionnant les différentes populations leucocytaires en SSC/CD45	87
Figure 43 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC2 dans les populations P8, P7 et P6 du patient n°3	88
Figure 44 Visualisation des différentes populations dans P8, P7 et P6 et leurs expressions respectives du CD90 et CD45RA (patient n°3)	88
Figure 45 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des populations leucocytaires en bas (patient n°3)	89
Figure 46 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des populations leucocytaires en bas (patient n°10)	90
Figure 47 Comparaison des images P8, P7 et P6 entre le patient n°3 (à gauche) et le patient n°10 (à droite).....	90
Figure 48 Comparaison de l'expression du CD90 et du CD45RA pour les populations P6 des patients n°10 et n°3.....	91

Figure 49 MRD selon l'approche LSC pour le patient n°3	92
Figure 50 Suivi de la MRD selon l'approche LSC pour le patient n°5.....	93
Figure 51 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des population leucocytaires en bas, à la rechute de LAM du patient n°3	94
Figure 52 Comparaison des intensités du CD34 et du CD38 des populations P8 (bleu foncé), P7 (vert) et P6 (jaune) entre le diagnostic et la rechute.....	95
Figure 53 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC1 dans les populations P8, P7 et P6 à la rechute du patient LAM	95
Figure 54 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC2 dans la population P6 à la rechute du patient n°3	96
Figure 55 Clusters cellulaires dans le compartiment souche P6 du tube LSC2 pour le patient n°7.....	98
Figure 56 Phénotype des CSH <i>like</i> (en bleu) du patient n°7 sur le tube LSC2.....	99
Tableau 1 Classification FAB	17
Tableau 2 Marqueurs recommandés par l'ELN 2017 pour le diagnostic des LAM (19)	19
Tableau 3 Stratification du risque en fonction des anomalies génétiques (19).....	22
Tableau 4 Recommandations de l'ELN pour la prise en charge des patients éligibles à la chimiothérapie intensive (19)	23
Tableau 5 Avantages et inconvénients des deux techniques principales, RT-qPCR et CMF (approche LAIP/DfN), utilisées actuellement dans le suivi de la MRD en pratique hospitalière, adapté de (75), (46), (76)	46
Tableau 6 Panel LA 8 couleurs utilisé en routine au CHU Caen	51
Tableau 7 Fluorochromes et anticorps composant les tubes LSC1 et LSC2 du panel LSC	52
Tableau 8 Indication du myélogramme et aspect cytologique et phénotypique des moelles osseuses des patients témoins.....	67
Tableau 9 Caractéristiques des LA des patients au diagnostic	69
Tableau 10 Détermination du seuil de positivité du CD7/CD56 à partir des moelles osseuses des patients témoins	71
Tableau 11 Détermination du LAIP CD7/CD56 au diagnostic sur le tube LSC1 du panel LSC	73
Tableau 12 Suivi de la MRD du patient n°4 sur le LAIP CD7/CD56 (méthode Ficoll ®)	77
Tableau 13 MRD des patients suivis sur le LAIP CD7/CD56 (méthode Ficoll ®)	78
Tableau 14 Détermination du seuil de positivité de LSCT2mix à partir des moelles osseuses des patients témoins	81
Tableau 15 Détermination de la présence de LSC au diagnostic de LAM selon l'approche LSCT1 et LSCT2mix.....	82
Tableau 16 Phénotypes au diagnostic des LSC déterminés par la booléenne LSCT2mix	84
Tableau 17 MRD des patients suivis sur le pourcentage de LSC (méthode Ficoll ®)	92
Tableau 18 Suivi de la MRD en biologie moléculaire des patients de l'étude.....	97

LISTE DES ANNEXES

Annexe 1 : Amendement au protocole BIG-1 pour l'évaluation de la MRD dans les LAM	124
Annexe 2 : Protocole Ficoll ®	129
Annexe 3 : Protocole Lyse Macrovolume	130
Annexe 4 : "Workflow" d'analyse pour les tubes LSC1 et LSC2 du panel LSC	131
Annexe 5 : Masque d'analyse du tube LSC1 du panel LSC (<i>CQE2019DonMoN</i>)	135
Annexe 6 : Masque d'analyse du tube LSC2 du panel LSC (<i>CQE2019DonMoN</i>)	139

INTRODUCTION

I. Hématopoïèse et Niche hématopoïétique

1. Hématopoïèse physiologique

a. Définition

L'hématopoïèse est un processus physiologique hiérarchisé conduisant à la genèse de l'ensemble des cellules sanguines dont le renouvellement est permanent. Chez l'Homme, l'hématopoïèse normale se déroule dans la moelle osseuse (MO) et ce, tout au long de la vie. Cette MO est à la fois le lieu de la production, de la différenciation et de la prolifération des éléments figurés du sang. Elle produit chaque jour environ 10^{12} cellules hématopoïétiques. Ayant pour finalité de maintenir un nombre constant de ces cellules dans la circulation sanguine, ce processus est finement régulé au niveau transcriptionnel et soumis à l'action de facteurs de croissance.

b. Les cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques ou *Hematopoietic Stem Cells* (HSC) sont présentes au sommet de la hiérarchie de l'hématopoïèse. Ces cellules indifférenciées assurent de façon permanente un renouvellement des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Les HSC sont globalement quiescentes, c'est-à-dire en phase G0 du cycle cellulaire **(1)**.

Les HSC, dites pluripotentes, sont les seules cellules hématopoïétiques capables de maintenir l'hématopoïèse à long terme et regroupent deux propriétés majeures les définissant intégralement :

- **L'auto-renouvellement** : capacité à donner naissance à une cellule identique à elle-même
- **La multi-potentialité** : capacité de se différencier et d'engendrer tous les types de cellules sanguines

Cette dualité de propriétés est autorisée grâce à l'asymétrie qui sous-tend le mécanisme de division des HSC. En effet, cette division aboutit à deux cellules filles aux caractéristiques bien différentes : une première cellule identique à elle-même et une deuxième cellule progénitrice ayant perdu la capacité à s'auto-renouveler à long terme mais gardant la capacité de multipotence. Les HSC sont également douées d'un pouvoir de division symétrique permettant leur auto-renouvellement permanent **(2)**.

La propriété fondamentale d'une cellule souche est de pouvoir reformer entièrement à elle seule l'intégralité du compartiment hématopoïétique après une irradiation létale. Afin d'étudier le potentiel souche d'une cellule, des méthodes d'expérimentation biologique ont été mises en place. C'est grâce à ces méthodes qu'ont pu être mis en évidence par la suite le potentiel souche de certaines populations cellulaires leucémiques.

Premièrement, le test de culture à long terme (LTC-IC), modèle *in vitro*, permet la numération des cellules souches en se basant sur leur capacité à produire une descendance myéloïde pendant au moins 5 semaines. Pour cela, une suspension cellulaire à tester en dilution limite est mise en contact sur un tapis de cellules stromales qui mime le micro-environnement des HSC. Au bout de 28 jours, les cellules sont récupérées et cultivées en milieu méthylcellulose pendant environ 10 jours. Les *Colony Forming Unit* (CFU) sont ensuite observées : si toutes les lignées myéloïdes sont observables sur la culture alors il est possible de conclure que la suspension cellulaire initiale contient des LTC-IC, c'est-à-dire des cellules immatures ayant un potentiel cellule souche. Il est également possible de calculer le nombre initial de LTC-IC grâce à la production moyenne de CFU par LTC-IC déterminée par un essai de dilution limite **(3)**.

Deuxièmement, grâce à des xénogreffes effectuées en série chez la souris, il est possible d'évaluer *in vivo* la capacité de cellules hématopoïétiques à reconstituer toute l'hématopoïèse normale. En pratique, des souris ayant un syndrome d'immunodéficience combinée sévère (souris NOD/SCID) subissent initialement une irradiation et sont greffées par voie intraveineuse avec des cellules hématopoïétiques humaines. Ces dernières sont qualifiées de *SCID-repopulating cells* (SRC) si elles démontrent la capacité de coloniser la moelle osseuse murine, d'y proliférer et reproduire ainsi toute l'hématopoïèse **(4)**. Le potentiel souche de ces cellules est affirmé, si lors d'une greffe chez une seconde souris réceptrice à partir de la première souris greffée (greffe en série), l'hématopoïèse est relancée dans la moelle osseuse murine.

c. L'hématopoïèse, un processus hiérarchisé

Lorsqu'elles ne se s'auto-renouvellent pas, les HSC se différencient en un progéniteur cellulaire multipotent non engagé vers une lignée cellulaire (MPP) qui, lui, engendre de façon schématique et simplifiée deux progéniteurs multipotents engagés : le progéniteur commun myéloïde (CMP) et le progéniteur commun lymphoïdes (CLP) qui sont capable d'engendrer à eux seuls et respectivement les lignées myéloïde et lymphoïde.

Le CMP donne naissance au progéniteur de la lignée granuleuse-macrophagique (GMP) et au progéniteur de la lignée érythro-mégacaryocytaire (MEP) tandis que le CLP aboutit aux différentes cellules lymphocytaires : B, T et *Natural Killer* (NK).

Au stade final de maturation, la lignée myéloïde regroupe les plaquettes, les érythrocytes, les granulocytes et les monocytes. Tous les précurseurs de ces cellules (blastés, promyélocytes, myélocytes, érythroblastés...) se retrouvent dans la moelle osseuse.

Cytologiquement, les différents progéniteurs ont un aspect monomorphe et sont donc non identifiables dans la moelle osseuse contrairement aux précurseurs qui eux sont polymorphes et identifiables.

Récemment, la théorie selon laquelle le modèle hiérarchique hématopoïétique humain découle d'une dichotomie restrictive myéloïde/lymphoïde a été remise en question suite à la découverte de progéniteurs lymphoïdes dont le potentiel myéloïde a été démontré. Ces nouveaux intermédiaires s'inscrivant directement dans la hiérarchie hématopoïétique ont été mis en évidence grâce à des études phénotypiques par cytométrie en flux (CMF). Une fois séparés par tri cellulaire induit par fluorescence (FACS), le potentiel de lignée de ces progéniteurs a été étudié grâce aux techniques de LTC-IC et de xénogreffes en séries.

La découverte du *Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor* (LMPP) initialement chez la souris en est l'exemple phare. Ce progéniteur détient partiellement un potentiel de lignée myéloïde et assoit la théorie que les granuleux peuvent à la fois découler de progéniteurs précoces myéloïdes mais aussi lymphoïdes **(5)(6)**. De plus, grâce à des analyses phénotypiques, Doulatov et ses collègues décrivent en 2010, un nouveau progéniteur dans la hiérarchie hématopoïétique portant le nom de *Multi-Lymphoid Progenitor* (MLP). Ce MLP est capable d'engendrer toutes les cellules lymphoïdes

mais également des cellules de la lignée myéloïde en proportion moins importante tels que des monocytes ou encore des cellules dendritiques (7). Le MLP, selon le modèle révisé d'Adolfsson, serait situé en aval du LMPP (5).

Tous ces progéniteurs peuvent être identifiés grâce aux études phénotypiques qui permettent actuellement une modélisation de la hiérarchie hématopoïétique [Figure 1].

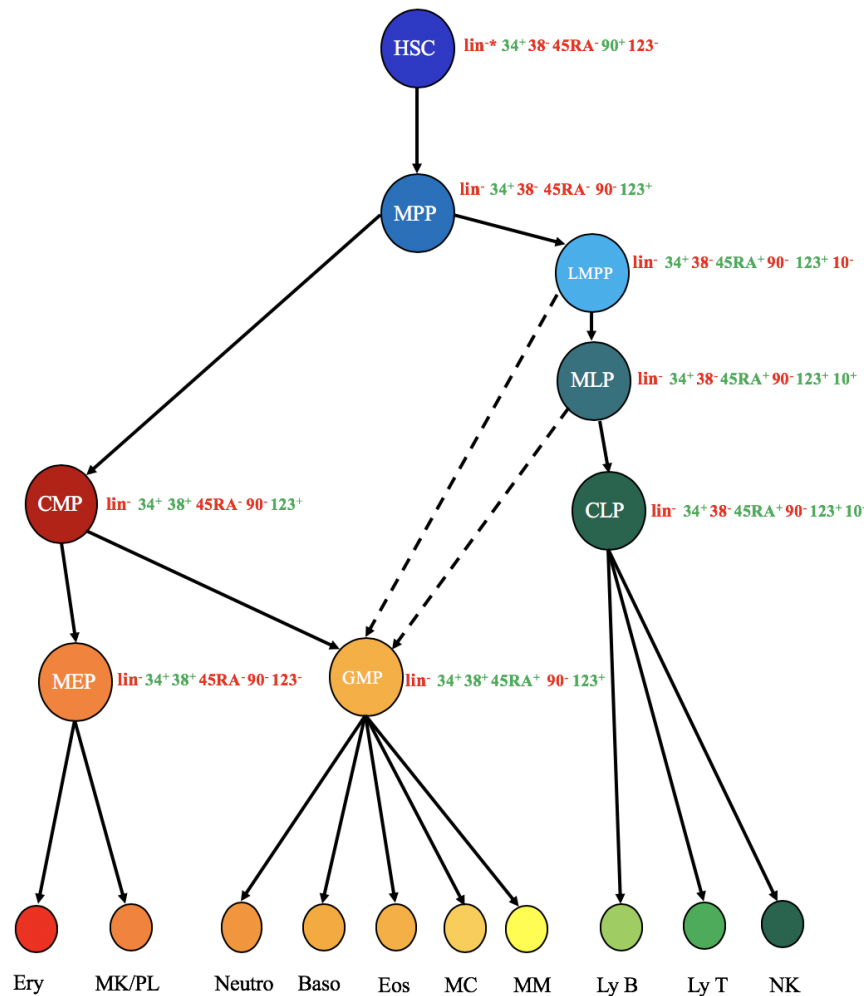


Figure 1 Modèle actuel de l'hématopoïèse humaine et phénotype des différents progéniteurs

HSC : Hematopoietic Stem Cell, MPP : Multipotent Progenitor Cell, LMPP : Lymphoid-Primed Multipotent Progenitor, MLP : Multi-Lymphoid Progenitor, CMP : Common Myeloid Progenitor, MEP : Megakaryocyte/Erythroid Progenitor, GMP : Granulocyte/Macrophage Progenitor, CLP : Common Lymphoid Progenitor, Ery : Erythrocytes, Mk/Pla : Megakaryocytes/Platelets, Neutr : Neutrophils, Baso : Basophils, Eos : Eosinophils, MC : Mast Cells, M/M : Monocytes/Macrophages, B : B cells, T : T cells, NK : Natural Killer cells

* Lin = marqueurs spécifiques de lignée (CD2 / CD3 / CD11b / CD11c / CD14 / CD16 / CD19 / CD24 / CD56 / CD66b / CD235a)

En tant que processus dynamique soumis à l'action de facteurs environnementaux extérieurs, cette hématopoïèse ne peut s'effectuer sans l'action de facteurs de croissance hématopoïétiques qui assurent la prolifération des cellules sanguines et leur régulation. Ces facteurs de croissance sont de différents types :

- Des facteurs dits synergiques comme les interleukines (IL-6, IL-11), le *Stem Cell Factor* (SCF) ou le *Fms-like tyrosine kinase 3* (Flt3-L) qui vont avoir pour rôle d'augmenter le nombre de cellules en cycle cellulaire et la sensibilité des cellules aux autres facteurs de croissance.

- Des facteurs multipotents comme l'Interleukine 3 (IL-3), l'Interleukine 7 (IL-7) et le *Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor* (GM-CSF) qui vont principalement avoir pour rôle d'augmenter la survie cellulaire des progéniteurs précoces après sensibilisation par les facteurs dits synergiques.

- Des facteurs restreints comme le *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF), l'érythropoïétine (EPO) ou la thrombopoïétine (TPO) qui vont avoir un rôle majeur dans la différenciation terminale des cellules et donc dans la maturation.

2. Notion de niche hématopoïétique

Le concept de niche hématopoïétique a été énoncé pour la première fois en 1978 par Schofield et *al.* fait suite à la démonstration que la rate était incapable de soutenir à elle seule les HSC contrairement à la moelle osseuse. Cela suggérait ainsi la présence dans la moelle osseuse d'une zone spécifique composée de cellules particulières participant au maintien et à la régulation des cellules souches **(8)**.

Par définition, la niche hématopoïétique regroupe les HSC ainsi que le micro-environnement dans lequel ces cellules sont retrouvées et peut être perçue comme un espace bien défini. Des interactions cellulaires étroites y ont lieu ainsi que la sécrétion de nombreux facteurs solubles interagissant avec les cellules souches hématopoïétiques [**Figure 2**].

Plusieurs composants de cette niche hématopoïétique ont été proposés durant les dernières années : des cellules extra-hématopoïétiques comme les ostéoblastes/ostéocytes, les cellules endothéliales, les cellules stromales mésenchymateuses, les cellules de Schwann mais également des cellules hématopoïétiques comme les macrophages ou les lymphocytes T régulateurs.

A travers cette niche, les HSC détiennent un support leur permettant de maintenir leur potentiel d'auto-renouvellement ainsi que leur capacité de

différenciation. Grâce aux chimiokines telles que CXCR4, elles sont accrochées au stroma médullaire constitué de fibroblastes et d'adipocytes. D'une façon simplifiée, les adipocytes permettent la nutrition et la protection des HSC. Cet environnement leur offre une protection contre les agressions environnementales extérieures potentielles : effets du système immunitaire ou agents cytotoxiques.

Ces niches sont généralement localisées proches des travées osseuses et portent souvent le nom de niches ostéoblastiques. Les ostéoblastes détiendrait un rôle majeur dans la régulation de l'hématopoïèse notamment par le biais de l'activation de la voie de signalisation Notch1 impliquée dans la différenciation cellulaire des HSC (9).

Par ailleurs, les lymphocytes T régulateurs présents dans la niche sécrètent de l'IL-10 afin de maintenir les cellules souches proches de l'endosteum et ainsi les protéger de la clairance immunitaire en supprimant l'activation des lymphocytes T (10).

De plus, CXCL12 est un des facteurs majeurs sécrétés dans la niche hématopoïétique. Il aurait un rôle essentiel dans le maintien du pool de cellules souches mais également dans le maintien de leur état de quiescence dans le cycle cellulaire [Figure 2].

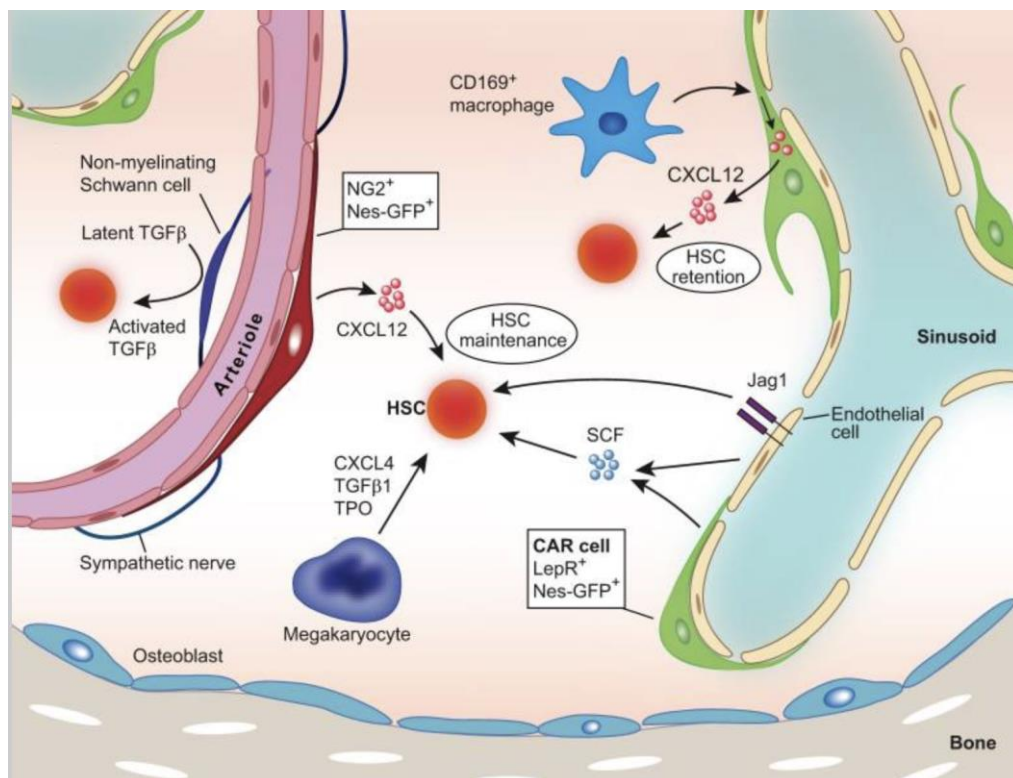


Figure 2 Représentation schématique de la niche hématopoïétique dans une moelle osseuse adulte (11)

II. Les leucémies aiguës myéloïdes

1. Définition

En conséquence de l'altération de l'hématopoïèse physiologique qui bascule alors vers une hématopoïèse pathologique, un grand nombre de maladies ou hémopathies existent actuellement.

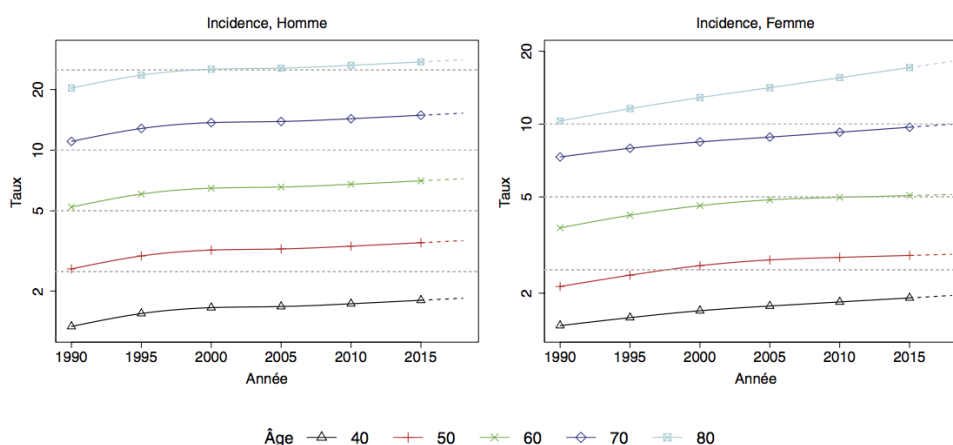
Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies malignes agressives caractérisées par l'expansion clonale d'un précurseur myéloïde ayant perdu sa capacité à se différencier et devenant donc incapable d'achever une maturation correcte pour devenir fonctionnel **(12)**. En conséquence, l'altération de l'hématopoïèse normale entraîne l'accumulation et/ou la prolifération dans la moelle osseuse de cellules immatures, dénommées blastes. Par définition, le diagnostic de LAM est posé lorsqu'au minimum 20% de blastes (sauf exceptions) sont recensés dans la moelle osseuse. Pouvant engager le pronostic vital à court terme, la LAM est une urgence diagnostique et nécessite une prise en charge thérapeutique rapide **(13)**.

Ce sont les leucémies aiguës les plus communes chez l'adulte mais également celles qui ont le taux de survie le plus faible avec une survie globale à 5 ans d'environ 24%**(14)**. Tout comme les cancers dits solides, ces hémopathies sont initiées par des désordres génétiques. Ainsi, plusieurs facteurs de risques ont pu être identifiés comme par exemple l'existence au préalable chez les patients d'une maladie génétique tel que le syndrome de Down, ou encore l'exposition à des agents chimiques ou physiques comme le benzène, les chimiothérapies ou les radiations **(15)**.

Selon le rapport Synthèse de l'Estimation Nationale de l'Incidence et de la Mortalité par Cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 publié en 2019 par Santé Publique France **[Figure 3]**, le nombre de cas incident estimé de LAM en France en 2018 est de 3428 avec un âge médian au diagnostic de 69 ans pour les hommes et de 72 ans pour les femmes. Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale pour cette période est de 1,2 pour 100 000 personnes années pour les hommes contre 0,9 pour les femmes ; ce taux augmentant avec l'âge.

Leucémies aiguës myéloïdes

Âge (années)	Homme			Femme		
	Taux ^[1] 1990	Taux ^[1] 2018	VAM ^[2] (%) et [IC 95%]	Taux ^[1] 1990	Taux ^[1] 2018	VAM ^[2] (%) et [IC 95%]
40	1,3	1,8	1,2 [0,8 ; 1,6]	1,5	2,0	1,0 [-0,2 ; 2,2]
50	2,6	3,6	1,2 [0,8 ; 1,6]	2,1	2,9	1,1 [0,0 ; 2,2]
60	5,2	7,2	1,2 [0,8 ; 1,6]	3,7	5,1	1,1 [0,3 ; 2,0]
70	11,1	15,3	1,2 [0,8 ; 1,6]	7,3	10,0	1,1 [0,3 ; 1,9]
80	20,3	28,1	1,2 [0,8 ; 1,6]	10,3	18,1	2,0 [1,3 ; 2,8]



^[1] Taux d'incidence exprimés pour 100 000 personnes-années
^[2] VAM : variation annuelle moyenne et intervalle de confiance à 95%
 Source : Données des registres des cancers du réseau Francim

Figure 3 Evolution des taux d'incidence entre le début de la période d'étude et 2018, en France métropolitaine, par sexe et âge, pour les leucémie aiguës myéloïdes dont l'incidence est en augmentation durant la période d'étude – Echelle logarithmique (16)

2. Des hémopathies hétérogènes

a. Hétérogénéité clinique

La présentation clinique des LAM est très différente d'un patient à l'autre. Il n'existe pas de signes cliniques pathognomoniques pour cette pathologie. Caractérisée par un envahissement médullaire de cellules immatures et souvent par des cytopénies liées à l'insuffisance médullaire, la présentation clinique découle généralement de ces anomalies. Peuvent être présents au diagnostic et/ou au cours de l'évolution de la pathologie :

- Un syndrome tumoral pouvant se caractériser par la présence d'une splénomégalie, d'une infiltration gingivale ou de leucémides dans les cas les plus graves
- Un syndrome d'insuffisance médullaire en lien avec les cytopénies induites pouvant aller de la symptomatologie simple d'une anémie classique (asthénie, pâleur cutanéomuqueuse, tachycardie) ou alors se présenter par des syndromes hémorragiques ou des infections sévères liées aux neutropénies

- Un syndrome de leucostase particulièrement corrélée à l'importance de la leucocytose et pouvant être responsable de thrombus
- Une coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD) fréquemment retrouvée dans les leucémies aiguës promyélocyaires
- Un syndrome de lyse comme étant la conséquence de la sécrétion de produits de lyse cellulaire par les cellules tumorales
- Une localisation extra-médullaire comme par exemple une atteinte neuro-méningée

b. Hétérogénéité biologique

L'aspect biologique peut être également très différent d'un patient à l'autre de par sa présentation au niveau de l'hémogramme (cytopénies fréquentes mais pas systématiques) mais surtout sous sa présentation cytologique. Il existe autant de morphologies blastiques que de patients. Cependant, des critères cytologiques définis permettent dans la plupart des cas d'orienter la lignée cellulaire à laquelle appartient la cellule immature dénommée blaste.

Associé à la présence quasi constante de cytopénies (anémie et/ou thrombopénie et/ou neutropénie), le frottis sanguin révèle dans la plupart des cas la présence de cellules immatures circulantes pouvant orienter déjà fortement vers le diagnostic de leucémie aiguë. Cependant, ce n'est qu'après l'analyse attentive de la moelle osseuse par le cytologiste que le diagnostic de leucémie aiguë peut être retenu. Le pourcentage de blastes dans la MO peut varier de 20% à 100% et des signes de dysplasie sur les lignées mégacaryocytaire, érythroblastique et granuleuse peuvent être présents de façon variable. Les blastes myéloïdes sont classiquement décrits comme étant des cellules de taille moyenne à grande, au rapport nucléocytoplasmique élevé, à la chromatine fine et nucléolée et au cytoplasme basophile renfermant parfois des granulations, des corps d'Auer ou des corps de Chédiak. Le noyau est plus ou moins régulier en fonction de la classe cytologique à laquelle appartient la prolifération blastique **[Figure 4]**.

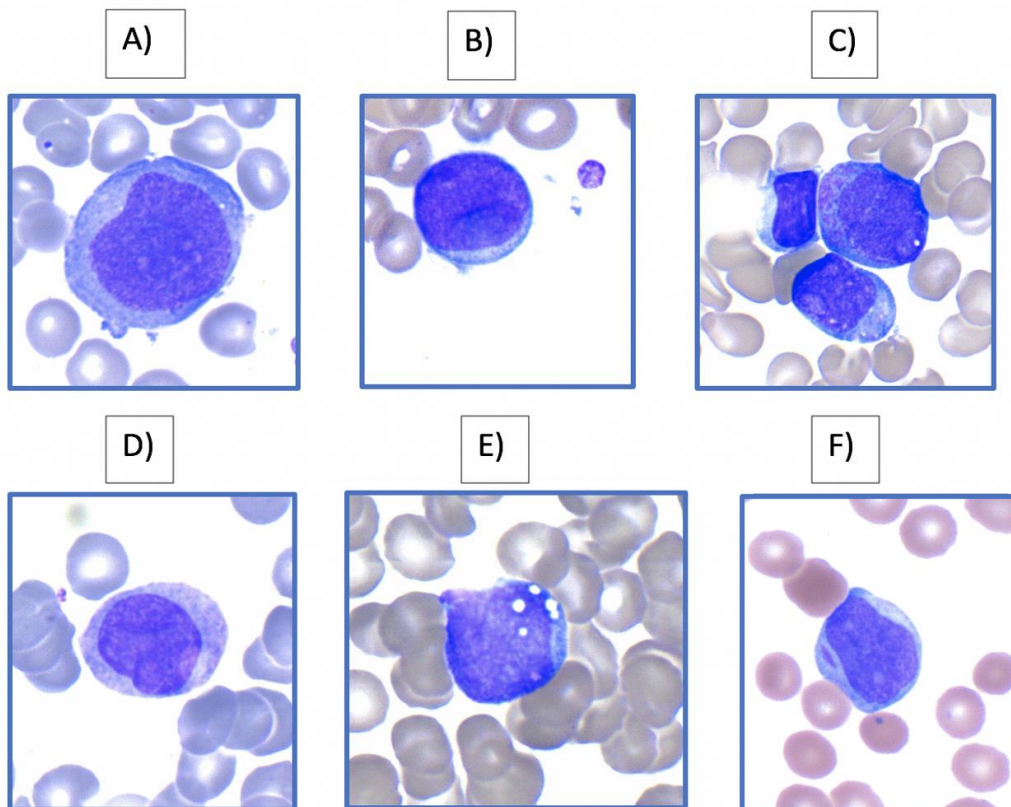


Figure 4 Exemples de morphologies blastiques (photographies prises au laboratoire d'hématologie du CHU de Caen, coloration au May-Grünwald Giemsa (MGG), microscope optique, grossissement x1000)

A) Cellule blastique de grande taille de type monoblaste ; B) Cellule blastique dont la chromatine fine contient une inclusion de type « Cup-Like » ; C) Un lymphocyte (en haut à gauche) et deux cellules blastiques à la chromatine fine et multi-nucléolée et au cytoplasme renfermant de fines granulations ; D) Un promonocyte au noyau circonvoluté et au cytoplasme « bleu ciel d'orage » (compté en cellules blastiques dans les LAM monoblastiques) ; E) Cellule blastique contenant quelques vacuoles. F) Cellule blastique à la chromatine fine et multi-nucléolée et au cytoplasme renfermant un corps d'Auer unique.

L'ancienne classification *French American British* (FAB) (17) permettait de classer les leucémies en fonction de critères morphologiques et cytochimiques mais n'est actuellement plus recommandée [Tableau 1]. Cependant, elle reste très utile pour le cytologiste afin d'évaluer la lignée et le stade de maturation incriminés dans la prolifération clonale.

Tableau 1 Classification FAB

LAM	CYTOLOGIE
M0	Avec différenciation minimale
M1	Sans maturation
M2	Avec maturation
M3	Promyélocytaire
M4	Myélomonocytaire
M5	Monoblastique
M6	Erythroblastique
M7	Mégacaryocytaire

En fonction de la lignée cellulaire atteinte, du stade de maturation et parfois des anomalies génétiques caractérisant la cellule immature, l'aspect cytologique différera.

La positivité et l'intensité de l'activité myéloperoxydase (MPO) peut également varier en fonction du sous-type cytologique de LAM. Le caractère myéloïde de la prolifération blastique peut être affirmé si au moins 3% des blastes sont positifs à la cytochimie de la myéloperoxydase ; l'inverse n'est pas applicable en revanche.

L'hétérogénéité biologique se démontre également lors de l'analyse du phénotype des cellules blastiques par CMF. Cette étape est majeure au diagnostic des leucémies aiguës puisqu'elle permet à la fois l'assignement de lignée atteinte, la détection d'expression de marqueurs pouvant éventuellement être ciblés par certaines thérapies mais également la détection d'éventuelles aberrations phénotypiques utiles dans le suivi de la maladie résiduelle.

De façon physiologique, l'apparition et l'intensité des marqueurs pour la lignée myéloïde varient en fonction du stade de maturation **[Figure 5]**.

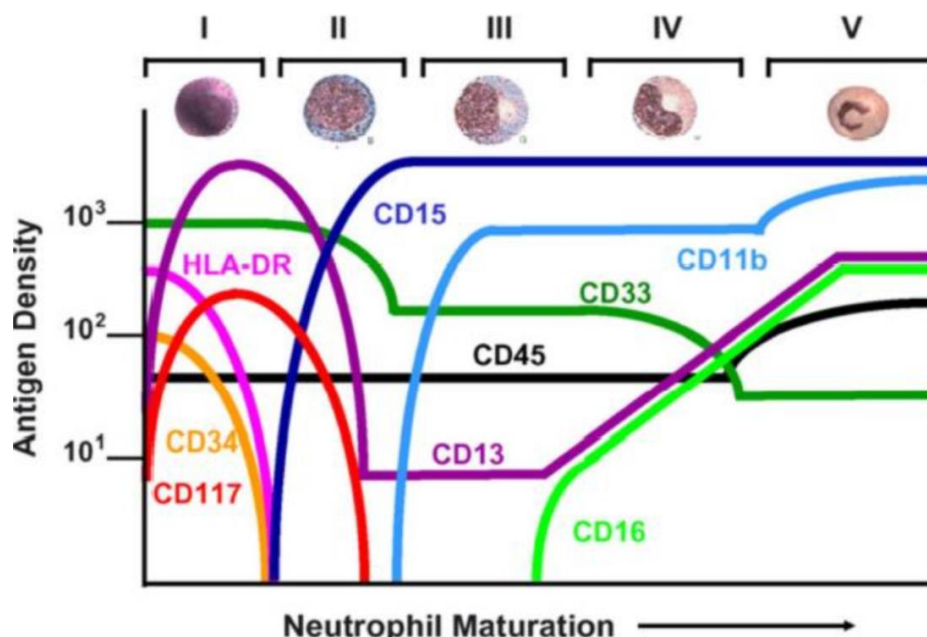


Figure 5 Profil d'expression antigénique en fonction du stade de maturation de la lignée granuleuse, d'après (18)

Alors qu'un myéloblaste sain exprime de façon constante les marqueurs d'immaturité CD34 et HLA-DR ainsi que les marqueurs de lignées myéloïdes CD117 et CD33 avec une intensité faible, les myéloblastes clonaux présentent dans la grande majorité des cas des aberrations phénotypiques permettant d'affirmer le caractère anormal de la population blastique.

Une cellule leucémique appartient à la lignée myéloïde si elle exprime au moins deux marqueurs de la lignée myéloïde (CD33, CD117, CD13, MPO) mais peut de façon aberrante exprimer un marqueur lymphoïde B (comme le CD19) ou un marqueur lymphoïde T comme le CD7. Cependant, si une cellule leucémique myéloïde exprime fortement le CD3 intra-cytoplasmique ou le CD3 en surface, la leucémie aiguë est classée d'emblée en phénotype mixte (lignée myéloïde/lignée T). D'autre part, si le marqueur CD19 est exprimé avec une intensité forte et associé à l'expression d'au moins un des marqueurs de la lignée B tels que les marqueurs cCD79a, cCD22 ou CD10 alors la leucémie est classée également en phénotype mixte (lignée myéloïde/lignée B). A noter que si le marqueur CD19 est exprimé par la cellule leucémique myéloïde avec une faible intensité mais que sont présents deux des marqueurs B cités ci-dessus, le phénotype mixte est également retenu (19).

Un panel de marqueurs est recommandé par l'European Leukemia Net (ELN) pour le diagnostic des LAM [Tableau 2].

Tableau 2 Marqueurs recommandés par l'ELN 2017 pour le diagnostic des LAM (19)

Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-Dr
Marqueurs granuleux	CD65, MPO
Marqueurs monocytaires	CD14, CD36, CD64
Marqueurs mégacaryocytaires	CD41, CD61
Marqueurs érythroblastiques	Glycophorine A (CD235a) CD36

Dans la grande majorité des cas, l'étude de la cytologie des cellules leucémiques en parallèle de l'étude phénotypique permet d'établir la lignée cellulaire ainsi que le stade de maturation dont est issue l'hémopathie.

c. Hétérogénéité génétique

A l'ère des découvertes majeures concernant les anomalies génétiques régissant la compréhension des modèles d'évolution cancéreuse, les leucémies aiguës myéloïdes sont désormais définies et classées selon la classification OMS révisée en 2016 qui se base sur la présence d'anomalies génétiques récurrentes ou non dans ces hémopathies et permet ainsi une meilleure stratification pronostique des LAM (20).

La classification OMS 2016 est composée de six grandes classes :

- **LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes**

- LAM avec t(8;21) (q22;q22) ; *RUNX1 – RUNX1T1*
- LA promyélocytaire avec *PML – RARA*
- LAM avec inv(16) (p13.1q22) ou t(16;16) (p13.1q22) ; *CBFB – MYH11*
- LAM avec t(6;9) (p23;q34) ; *DEK – NUP214*
- LAM avec inv(3) (q21q26.2) ou t(3;3) (q21;q26.2) ; *GATA2, MECOM*
- LAM mégacaryoblastique avec t(1;22) (p13;q13) ; *RBM15 – MKL1*
- LAM avec mutation bi-allélique *CEBPA*
- LAM *NPM1* muté

Entités provisoires : LAM avec *BCR-ABL1*, LAM *RUNX1* mutée

- **LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies**

- **Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie**
- **LAM sans autres spécifications par ailleurs (NOS)** : cette catégorie se calque sur l'ancienne classification FAB.
- **Sarcome granulocyttaire** : localisation extra-médullaire d'une prolifération clonale myéloïde
- **Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle**

Les différentes anomalies moléculaires ainsi que leurs co-apparitions ont été répertoriées dans les dernières recommandations de l'ELN de 2016 [Figure 6] (19).

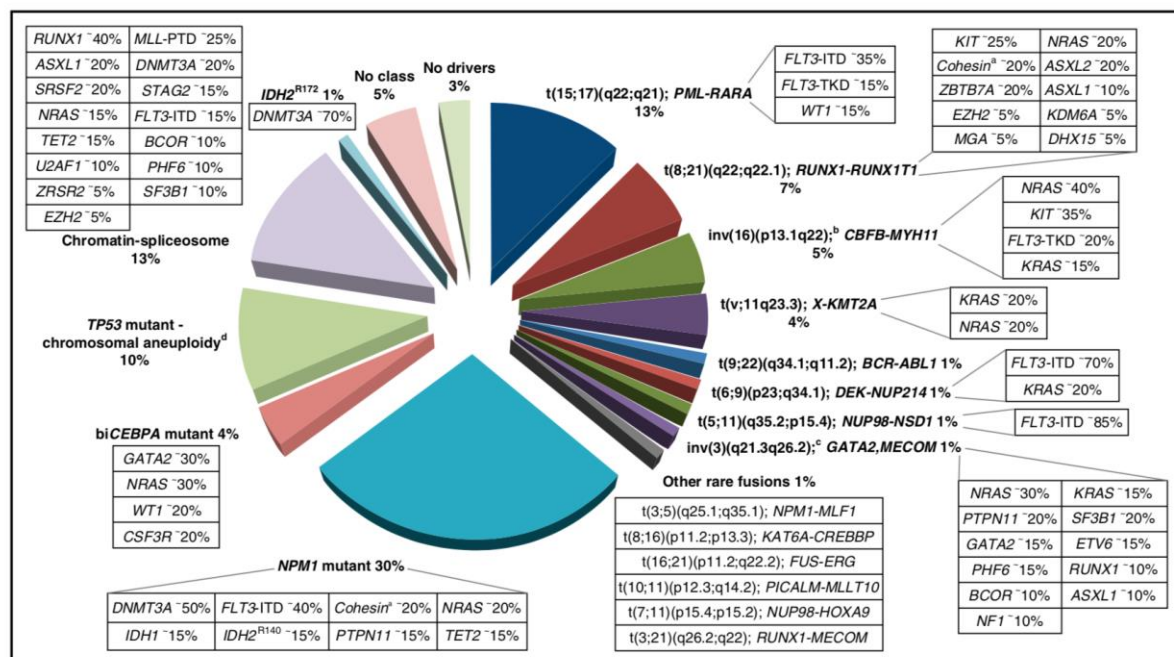


Figure 6 Les différentes classes moléculaires des LAM de l'adulte jeune jusqu'à environ 65 ans (19)

d. Modélisation de l'hétérogénéité

A la fin du XX^{ème} siècle, deux grands modèles étaient en compétition afin d'expliquer la grande hétérogénéité clinique, génétique, phénotypique et biologique des LAM.

Le premier, dénommé « Modèle stochastique », stipulait que plusieurs types de cellules progénitrices hématopoïétiques étaient susceptibles d'acquérir des mutations, de se transformer, afin d'engendrer par la suite une prolifération clonale anormale (21).

Le deuxième, le « Modèle hiérarchique » suggérait que les mutations responsables de la transformation et de la progression de la maladie ne survenaient que dans les cellules souches primitives (22).

Durant les dernières années, beaucoup d'auteurs se sont penchés sur le sujet afin de trancher sur l'origine de la maladie et essayer de comprendre pourquoi les cellules leucémiques variaient à l'intérieur d'une même tumeur.

Aujourd'hui, il est de plus en plus admis que le modèle hiérarchique au sommet duquel serait présent un petit pool de cellules capables de générer à lui seul la maladie puisse être la solution à la compréhension de l'hétérogénéité clonale de ces hémopathies malignes.

e. Hétérogénéité clonale

En 2012, Ding et *al.* séquencent intégralement au diagnostic et à la rechute le génome de 8 patients atteints de LAM et proposent deux modèles d'évolution clonale après chimiothérapie. La première hypothèse met en avant le fait qu'une partie du clone dominant initial est résistante à la chimiothérapie grâce à l'acquisition de nouvelles mutations et que le patient rechute donc avec ces cellules. Le deuxième modèle propose que le clone dominant soit sensible à la chimiothérapie mais qu'un sous-clone minoritaire résistant puisse devenir majoritaire grâce à l'acquisition de mutations lui confiant un avantage prolifératif [Figure 7]. Ainsi, de façon objective, un patient ne rechute pas toujours avec le clone initial (23).

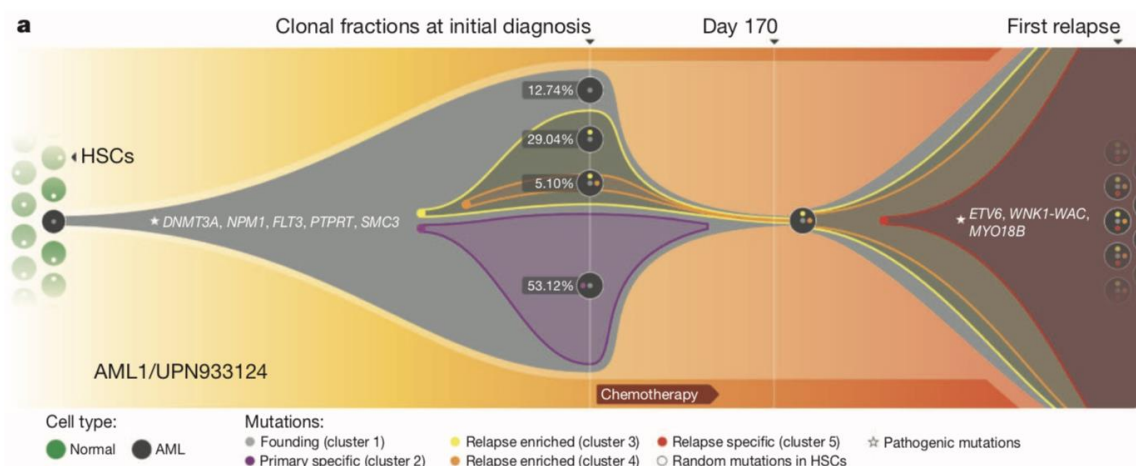


Figure 7 Evolution clonale chez un patient atteint d'une LAM (UPN933124)(23)

f. Pronostic et aspect thérapeutique

La prise en charge des LAM se base non seulement sur les caractéristiques intrinsèques du patient (âge, comorbidités) mais également sur le type de LAM, la clinique, la biologie et sur les classifications pronostiques prenant en compte principalement les anomalies cytogénétiques et moléculaires [Tableau 3]. L'analyse de l'ensemble de ces données oriente le clinicien vers différentes options thérapeutiques : chimiothérapie intensive ou conventionnelle, thérapies ciblées, thérapies novatrices, greffe de cellules souches hématopoïétiques ou soins de support.

Tableau 3 Stratification du risque en fonction des anomalies génétiques (19)

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3</i> -ITD or with <i>FLT3</i> -ITD ^{low} † (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EVI1)</i> –5 or del(5q); –7; –17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3</i> -ITD ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

Actuellement, pour les patients éligibles à la chimiothérapie intensive, le protocole d'induction standard de chimiothérapie dans les LAM est basé sur le « 3 + 7 ». De façon concrète, la cytarabine (anti-métabolite) est administrée en continu pendant 7 jours, suivie de l'administration d'une anthracycline comme la daunorubicine une fois par jour pendant 3 jours [Tableau 4]. La prise en charge débute par une phase d'induction dont le but est d'obtenir la rémission complète suivie d'une phase de consolidation. D'une façon générale, cette deuxième phase fait appel à l'injection de cycles répétés de cytarabine à dose forte ou intermédiaire pour les patients plutôt de bon pronostic et à l'allogreffe de cellules souches pour ceux ayant un pronostic défavorable. Les patients non éligibles à l'allogreffe ou de mauvais pronostic peuvent

bénéficier de thérapies novatrices dans certains protocoles de recherche, d'agents hypométhylants ou de faibles doses de cytarabine (24).

En France, les patients âgés entre 18 et 61 ans au diagnostic de LAM *de novo* (excepté la leucémie aiguë promyélocytaire) ou d'acutisation de syndrome myélo-dysplasique (SMD) et éligibles à la chimiothérapie intensive, entrent généralement dans un protocole d'essai clinique dénommé *Backbone Inter-Group 1* (BIG-1). Cet essai clinique, ayant pour objectif d'améliorer la survie globale des patients atteints de LAM, vise à comparer l'idarubicine à forte dose à la daunorubicine à l'induction et la cytarabine à haute dose et à dose intermédiaire en consolidation. De plus, l'effet du mycophénolate mofétil en comparaison à la prophylaxie standard dans la prévention de la maladie du greffon contre l'hôte chez les patients allogreffés en première rémission complète est également étudié.

Tableau 4 Recommandations de l'ELN pour la prise en charge des patients éligibles à la chimiothérapie intensive (19)

Selected conventional care regimens	
Patients eligible for intensive chemotherapy	
Induction therapy (all ages) (*7+3)*,†,‡	• 3 d of an IV anthracycline: daunorubicin at least 60 mg/m ² ; idarubicin 12 mg/m ² ; or mitoxantrone 12 mg/m ² , and 7 d of continuous infusion cytarabine (100-200 mg/m ²)
Consolidation therapy‡,§	
Younger patients (18-60/65 y)	
• Favorable-risk genetics	• 2-4 cycles of IDAC (1000-1500 mg/m ² IV over 3 h q12h, d1-3; or 1000-1500 mg/m ² IV over 3 h d1-5 or 6)
• Intermediate-risk genetics	• Allogeneic HCT from matched-related or unrelated donor
	• 2-4 cycles of IDAC (1000-1500 mg/m ² IV over 3 h q12h, d1-3; or 1000-1500 mg/m ² IV over 3 h d1-5 or 6), or
	• High-dose therapy and autologous HCT
• Adverse-risk genetics	• Allogeneic HCT from matched-related or unrelated donor
Older patients (>60/65 y)	
• Favorable-risk genetics	• 2-3 cycles of IDAC (500-1000 mg/m ² IV over 3 h q12h, d1-3; or 500-1000 mg/m ² IV over 3 h d1-5 or 6)
• Intermediate/adverse-risk genetics	• No established value of intensive consolidation therapy; consider allogeneic HCT in patients with low HCT-Comorbidity Index, or investigational therapy

Des thérapies plus ciblées ont également récemment fait leur apparition dans l'arsenal thérapeutique des LAM comme les inhibiteurs de FLT3-ITD ou encore le Gemtuzumab Ozogamicin, anticorps monoclonal dirigé contre le CD33, et font l'objet d'études cliniques (25).

L'allogreffe reste le traitement de choix pour les patients éligibles plutôt de mauvais pronostic ou réfractaires au traitement standard.

III. Hématopoïèse clonale et état pré-leucémique

Certaines mutations génétiques connues pour être impliquées dans la genèse des leucémies aiguës sont détectées également chez des individus sains suggérant l'existence d'une hématopoïèse clonale pré-leucémique (26). Cet état est aujourd'hui plus connu sous l'appellation d'hématopoïèse clonale à potentiel indéterminé (CHIP). Les gènes *DNMT3A*, *ASXL1*, *TET2*, *JAK2*, *SF3B1*, *SRSF2* et *TP53* semblent constituer un panel de gènes retrouvés fréquemment mutés dans cette CHIP. D'une façon plus générale, des mutations affectant la méthylation de l'ADN ou la modification de la chromatine ont été identifiées comme étant des événements pré-leucémiques alors que des mutations activant des voies de signalisation apparaissent plus tardivement dans la leucémogénèse (27).

De plus, une hématopoïèse clonale peut s'installer avec l'âge (ARCH) et est retrouvée chez plus de 10% des patients dont l'âge excède 70 ans suggérant une fois de plus que l'instabilité hématopoïétique est corrélée positivement à l'âge des patients (28).

En fonction des scénarios clinico-biologiques, l'évolution clonale est différente [Figure 8] (29).

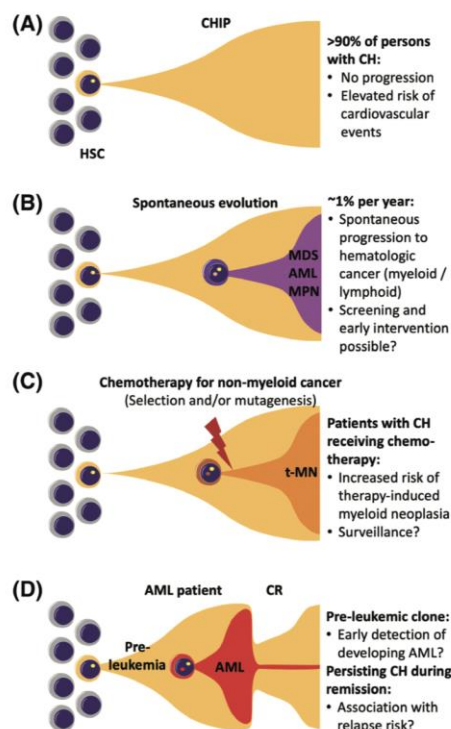


Figure 8 Importance de l'hématopoïèse clonale dans divers scénarios clinico-biologiques, d'après (29)

IV. Le concept de cellules souches leucémiques (LSC)

1. Historique

Durant les deux dernières décennies, de nombreuses études se sont intéressées au modèle de cellule souche cancéreuse, modèle défini premièrement pour les tumeurs solides mais approuvé et applicable également dans les leucémies aiguës myéloïdes **(30)**.

La naissance du concept de *Leukemia Stem Cell* (LSC) date de la fin du XX^{ème} siècle. Les premiers travaux réalisés sur le sujet, à partir de xénogreffes de cellules leucémiques chez des souris immuno-déficientes (NOD/SCID), ont montré l'existence de cette sous-population ; population nommée initialement *SCID Leukemia-initiating cell* (SL-IC) car capable de générer le même type de LAM chez ces souris après une transplantation de cellules leucémiques humaines. Ces cellules souches leucémiques ont été caractérisées phénotypiquement par la positivité du CD34 et par la négativité du CD38, à l'identique des cellules souches hématopoïétiques normales.

Par définition, ces LSC regroupent les capacités d'auto-renouvellement, de prolifération et de différenciation tout comme les HSC. En d'autres termes, les cellules capables de prendre greffe après transplantation en série, de s'auto-renouveler à l'intérieur de l'hôte et de produire des progéniteurs non-LSC sont qualifiées sous le terme de LSC. Les cellules non-LSC sont incapables de prendre greffe après transplantation chez la souris.

Suite à ces études pionnières, la conception d'une organisation hiérarchique dans les LAM a commencé à émerger **[Figure 9]**. Cette organisation place les cellules souches leucémiques au sommet de la hiérarchie de différenciation cellulaire qui maintient finalement la progression de la maladie **(31)(32)**.

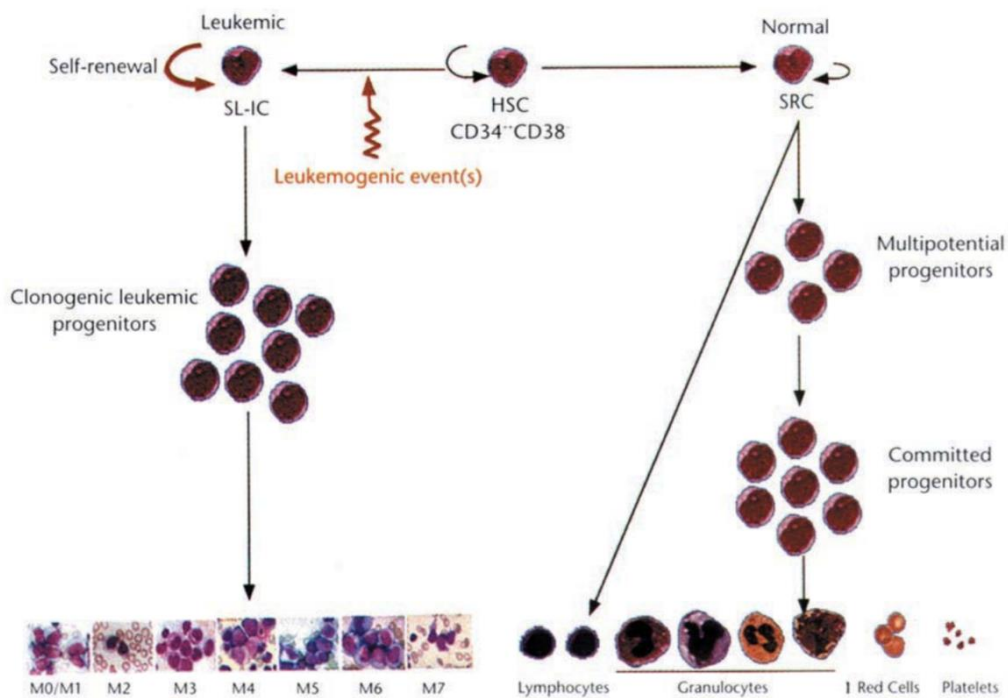


Figure 9 – Modèle comparant l'organisation du système hématopoïétique normal et leucémique, d'après (32)

Ainsi, la notion de compartiment CD34⁺/CD38⁻ enrichi en LSC est le point de départ clé de l'identification et de la caractérisation de ces cellules. Ce compartiment phénotypique est considéré aujourd'hui comme étant celui où sont retrouvées très majoritairement les cellules les plus immatures de l'hématopoïèse normale et pathologique.

2. L'hétérogénéité, une notion phare dans la définition des LSC

Le concept de LSC est complexe de par l'existence de clones différents dans les LAM, appelés sous-clones. Cela peut s'expliquer par la grande hétérogénéité de l'évolution clonale dans cette maladie et les différentes anomalies génétiques qui apparaissent non seulement à l'initiation mais également tout le long de la maladie **(33)**. Les LSC présentent donc une grande hétérogénéité phénotypique et génétique d'un patient à l'autre ; ce qui rend difficile leur caractérisation. De plus, chaque sous-clone leucémique présent chez un même patient est relié à sa propre LSC rajoutant un degré de complexité supplémentaire.

3. La LSC comme cellule régénératrice de leucémie (LRC) ?

Le terme LRC désigne le pool cellulaire capable à lui seul d'engendrer une prolifération clonale anormale, d'entraîner une leucémie. Pour la première fois en 2016, une étude a caractérisé l'évolution phénotypique et génétique des LSC *in vivo* après chimiothérapie. La fréquence de ces LSC augmente de façon significative entre le diagnostic et la rechute suggérant leur résistance aux chimiothérapies et leur implication dans le mécanisme de rechute **(34)**.

Cependant, il est important de souligner que les cellules leucémiques résiduelles post-chimiothérapie ne semblent pas toujours être enrichies en LSC mais également en cellules ayant une forte activité mitochondriale et notamment un statut de phosphorylation oxydative élevé (OXPHOS) ; ce qui laisse entrevoir de nouvelles pistes en matière de thérapie avec le ciblage des voies mitochondriales **(35)**.

En résumé, bien que la tendance actuelle semble démontrer que les cellules régénératrices de leucémie responsables de rechutes soient dénommées cellules souches leucémiques, il est important de souligner que trop peu de preuves existent afin d'affirmer que les termes LRC et LSC sont équivalents.

Les LSC seraient des cellules quiescentes dans le cycle de division cellulaire ; ce qui expliquerait en partie leur résistance à la chimiothérapie intensive actuelle qui cible principalement les cellules à division rapide constituant la majorité de la population leucémique : les cellules blastiques et les précurseurs des blastes autres que les cellules souches leucémiques **(36) (37)**. De façon concordante à cet état de quiescence, les LSC présentent un métabolisme oxydatif faible par rapport aux cellules souches hématopoïétiques normales (nHSC) **(38)**.

V. Le suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes

1. Maladie résiduelle Minimale (MRD) : définition et intérêts

Le principal objectif du traitement dans les LAM est l'atteinte d'une rémission complète, durable et sans rechute. De façon conventionnelle, la rémission complète dans le cadre des LAM se définit par la présence de moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse, par la disparition des signes cliniques, par la normalisation de l'hémogramme (polynucléaires neutrophiles > 1G/L et plaquettes > 100 G/L) et par l'absence de localisation extra-médullaire.

Actuellement, le critère principal de rémission complète est purement cytologique. Bien que très informatif pour attester ou non de l'efficacité du traitement, l'évaluation cytologique au myélogramme de la quantité médullaire de cellules blastiques présente des limites. Ce critère est purement observationnel. Il existe une incertitude de mesure concernant le rendu en pourcentage des cellules blastiques comptées au microscope. Par exemple, selon Rümke et *al.*, s'il est retrouvé 5% de blastes pour 500 cellules comptées, la valeur exacte peut en réalité se situer entre 3% et 8% (intervalle de confiance), intervalle encadrant la valeur seuil de rémission cytologique égale à 5% **(39)**. Ainsi, le rendu du pourcentage de blastes au microscope peut varier légèrement d'un cytologiste à l'autre ; ce qui autour du seuil de décision clinique, peut impacter la suite de la prise en charge des patients.

De plus, un nombre important de ces patients rechuteront par la suite après avoir atteint le statut défini de rémission complète. Actuellement, le taux de rémission chez les patients dont l'âge est inférieur à 60 ans est compris entre 60 et 70% alors que celui des patients plus âgés présentant des caractéristiques génétiques de mauvais pronostic est bien plus faible, entre 35 et 50%. La survie globale à 5 ans est d'environ 25% parmi tous les patients atteints de LAM, ce qui est très insatisfaisant en regard d'autres hémopathies qui obtiennent de bien meilleurs résultats pour la survie, notamment pour les leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques **(40)**. Les patients en rémission complète (RC) continuent souvent d'héberger des cellules leucémiques résiduelles qui sont à probablement à l'origine du phénomène de rechute de la maladie. Il est donc clair que la quantification des cellules blastiques dans la MO

par l'analyse cytologique du myélogramme n'est ni assez sensible ni assez spécifique pour détecter la persistance de cellules résiduelles leucémiques. De ces constats découle donc la nécessité de détecter ces clones résiduels : la recherche de la maladie résiduelle ou MRD.

Après une thérapie donnée, la MRD peut se définir comme étant la quantification du contingent de cellules leucémiques résiduelles chez un patient en nombre inférieur au seuil de détection en cytologie qui peut, en fonction de son évolution, être responsable d'échecs thérapeutiques ou de rechutes [Figure 10].

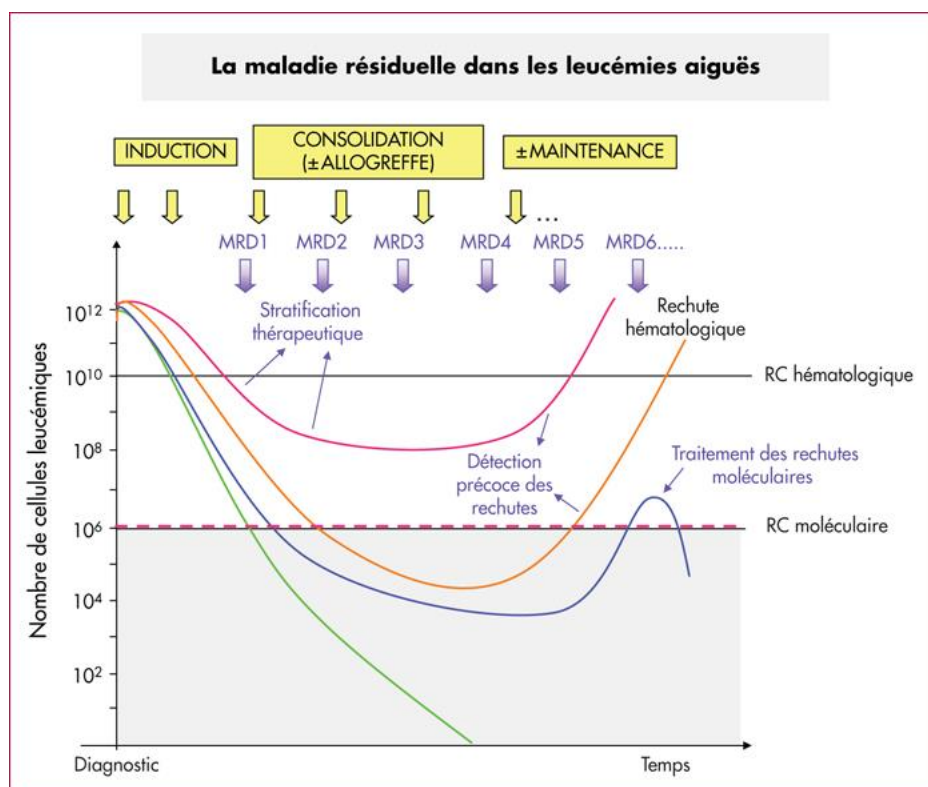


Figure 10 Représentation schématique des différentes évolutions de la MRD dans les LAM après traitement intensif, ainsi que les indications de suivi de la MRD en fonction de la période du prélèvement, d'après (41)

La détermination de la MRD a principalement un intérêt pronostique et son résultat peut conditionner une suite de prise en charge dans certains protocoles. Il apparaît désormais que si la rémission est profonde, c'est-à-dire que la MRD est indétectable, le risque de rechute est significativement diminué (42).

La MRD est un facteur pronostique indépendant donnant des informations précieuses sur la profondeur de la rémission après traitement (43). Ainsi, il est essentiel de pouvoir déterminer de façon la plus sensible et la plus fiable possible la persistance de ces cellules résiduelles afin de pouvoir par la suite fournir une indication

pronostique supplémentaire qui, à terme, pourra orienter la décision thérapeutique chez certains patients. En 2018, l'ELN publie ses premières recommandations concernant ce sujet et propose la mesure de cette MRD chez tous les patients traités pour une LAM **(44)**. Malheureusement aujourd'hui, la standardisation des méthodes permettant d'approcher cette MRD manque cruellement dans les LAM. De plus, aucune preuve n'existe encore concernant le fait qu'agir sur une MRD positive modifie par la suite l'évolution à long terme de la maladie mais cela est en cours d'étude. Il est cependant important de souligner que la MRD fait maintenant partie des standards dans le management d'autres hémopathies malignes comme les leucémies myéloïdes chroniques ou les leucémies aiguës lymphoblastiques où sa détermination est désormais bien définie **(45)**.

Dans les LAM, l'évaluation de la MRD peut être un véritable outil pour stratifier davantage le risque de rechute chez les patients et guider leur prise en charge. Etant donnée l'arrivée de nouvelles thérapies dans ces hémopathies, la nécessité d'établir des algorithmes prenant en considération lors de *check-points* donnés l'évaluation de la MRD est plus que jamais requise pour mettre en place de nouveaux essais cliniques.

Le terme de *Minimal Residual Disease* tend petit à petit à devenir *Measurable Residual Disease*, l'avantage majeur de ce deuxième terme étant de prendre en compte les contraintes techniques de détection et notamment la notion de seuil de sensibilité. En effet, les méthodes actuelles ne permettent pas d'affirmer de façon certaine la présence ou non de cellules leucémiques résiduelles car aucune technique ne permet de descendre en dessous de 10^{-6} (1 cellule leucémique pour 10^6 cellules nucléées).

La MRD peut s'approcher par deux grandes méthodes techniques analytiques : la cytométrie en flux ou la biologie moléculaire (Real Time- quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR)). Aujourd'hui, le Gold Standard pour évaluer la MRD reste la biologie moléculaire. Ces deux techniques ont pour point commun la sélection d'un marqueur d'intérêt à suivre. Des critères de choix de marqueurs de suivi doivent être pour le mieux vérifiés **(41)** :

- Avoir la plus grande sensibilité possible
- Être spécifique de la maladie

- Être stable entre la maladie et la rechute
- Être applicable au plus grand nombre de patients
- Être détectable par une technique facilement réalisable en milieu hospitalier
- Résulter d'une technique ayant un coût acceptable

2. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire

Comme décrites précédemment, les LAM sont des maladies dont l'hétérogénéité génétique d'un patient à l'autre n'est plus à démontrer. Classiquement, la diminution de certaines aberrations génétiques retrouvées au diagnostic est suivie au cours du traitement et constitue l'évaluation par biologie moléculaire de la MRD. Cela impose un screening des désordres génétiques les plus fréquemment retrouvés dans les LAM au diagnostic. Les différents transcrits de fusion découlant de réarrangement chromosomique, certaines mutations géniques comme *NPM1*, *FLT3-ITD* ou *CEBPα*, et la surexpression génique de *WT1* sont les principales anomalies utilisées pour détecter la MRD. La sensibilité de cette technique varie de 10^{-4} à 10^{-6} (44).

L'ELN recommande pour l'évaluation de la MRD le suivi des mutations de *NPM1* ainsi que celui des transcrits de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* ou encore *PML-RARA* dans le cas de la leucémie aiguë promyélocytaire. Du fait de son manque de sensibilité et de spécificité, le suivi de la surexpression de *WT1* n'est recommandé seulement en l'absence d'autres marqueurs à suivre (y compris en CMF). Il en est de même pour les mutations de *FLT3* étant donné leur manque de stabilité au cours de l'évolution de la maladie.

L'exemple phare pour étudier la maladie résiduelle en RT-qPCR concerne le suivi de la mutation de *NPM1*. Les mutations de *NPM1*, gène situé sur le chromosome 5 codant pour la nucléophosmine, sont des marqueurs leucémiques au même titre que les mutations de *CEBPA* ou les transcrits de fusion habituellement rencontrés dans les LAM du groupe *Core Binding Factor* (CBF) comme *RUNX1-RUNX1T1* t(8 ;21) ou encore *CBFB-MYH11* (inv 16). Puisque le nombre de copies de *NPM1* muté est généralement élevé au diagnostic et que ces mutations sont stables au cours du temps, ce marqueur est excellent pour le suivi de la MRD. Par exemple, chez les patients *NPM1* muté et inclus dans le protocole d'essai clinique BIG-1, l'évaluation de

la MRD est décisionnelle en post-consolidation 1 pour orienter le traitement ou non vers l'allogreffe.

Le suivi de la MRD par approche moléculaire semble applicable qu'à environ 40% des patients présentant une LAM car ces aberrations ne sont pas toujours retrouvées, ce qui en fait sa principale limite **(44)**.

L'avènement récent du séquençage à haut débit (NGS) ouvre une perspective d'amélioration dans la détection d'anomalies génétiques pouvant être pertinentes pour le suivi en maladie résiduelle. Cependant, la détection de certaines mutations des gènes *DNMT3A*, *ASXL1* et *TET2* rendue possible par le NGS pose le problème de la spécificité. En effet, ces mutations peuvent également être retrouvées chez des personnes saines et font partie des mutations décrites dans les états pré-leucémiques et dans le CHIP précédemment défini, ce qui fait actuellement du NGS une méthode moins spécifique que le suivi par RT-qPCR **(46)**.

3. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux

a. Principe de la cytométrie en flux

La cytométrie en flux est une technique analytique sophistiquée permettant l'analyse de caractéristiques physiques et biologiques de chaque cellule présente dans une suspension **(47)**. La mise en évidence de ces caractéristiques est permise :

- Par l'analyse de la diffusion de la lumière par les cellules (taille/structure des cellules)
- Par leur marquage par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes ciblant des molécules extra-cellulaires ou intra-cellulaires

Le cytomètre est composé d'un système fluidique, d'un système optique et d'un système informatique **[Figure 11]**.

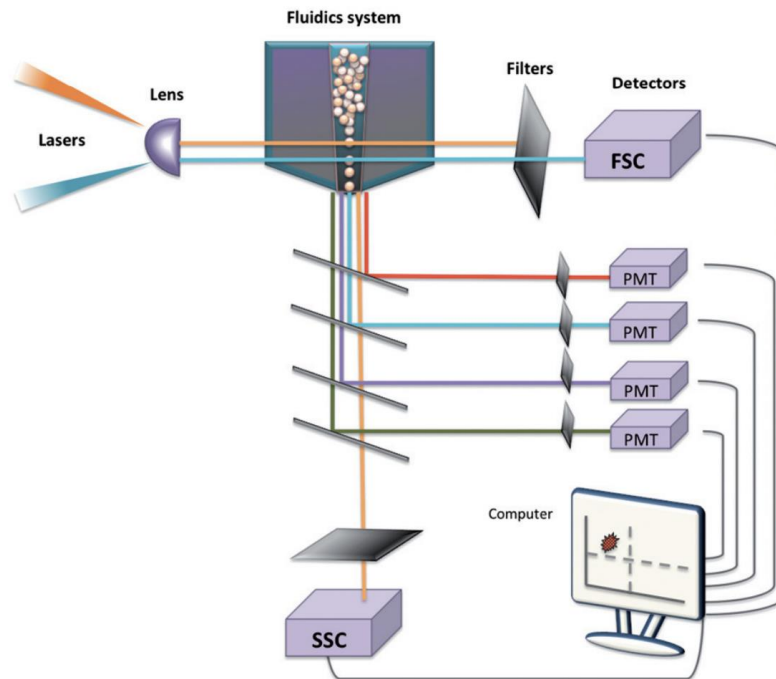


Figure 11 Représentation schématique d'un cytomètre, d'après (47)

PMT : Photomultiplicateurs ; SSC : Side Scatter ; FSC : Forward Side Scatter

Les cellules défilent séparément dans un flux liquidien grâce à un processus d'hydrofocalisation et sont soumises à des excitations par différents lasers monochromatiques. Le cytomètre va détecter d'une part la capacité de diffraction de la lumière qui diffère en fonction de la taille et de la structure des différentes cellules. Plus une cellule est de petite taille, moins elle diffractera la lumière incidente à petit angle (diffraction frontale) et plus une cellule contient des granulations, plus elle diffractera la lumière à grand angle (diffraction latérale à 90°C).

D'autre part, grâce aux anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes, les cellules vont pouvoir être différenciées en fonction de leur phénotype. Après excitation par les lasers correspondants, ces fluorochromes vont émettre de la lumière à une longueur d'onde plus élevée qui sera captée par les photomultiplicateurs (PMT) générant un signal électrique amplifié qui sera transformé informatiquement en données analysables par le cytométriste.

Les anticorps monoclonaux utilisés portent le nom Cluster de Différenciation (CD) et sont dirigés contre des glycoprotéines portées par certains types cellulaires. Cependant, aucun marqueur n'est spécifique d'une cellule donnée. Par exemple, le CD34 est un marqueur d'immaturité sans assignement de lignée et est mis en

évidence sur les cellules blastiques mais également sur les cellules souches hématopoïétiques.

La représentation graphique sous forme d'histogramme bi-paramétrique (« dot plot ») permet de visualiser deux paramètres et donc de mettre en évidence la co-expression de marqueurs d'intérêts afin d'établir des phénotypes cellulaires. Ces dot plot donnent deux informations majeures : la positivité ou non du marqueur ainsi que son intensité de fluorescence. Cette dernière reflète le nombre de sites antigéniques présents sur une cellule. De façon conventionnelle, la positivité d'un marqueur pour une population donnée est retenue si au moins 20% de ces cellules sont positives et si son intensité de fluorescence est égale ou supérieure au double de celle de la population négative de référence si elle existe.

Un histogramme permet la représentation des différents événements sous forme de points en fonction de leur taille (FSC) et de leur structure (SSC). Cette représentation permet de mettre en évidence des sous-populations et permet par la suite de se focaliser sur celle(s) d'intérêt [Figure 12].

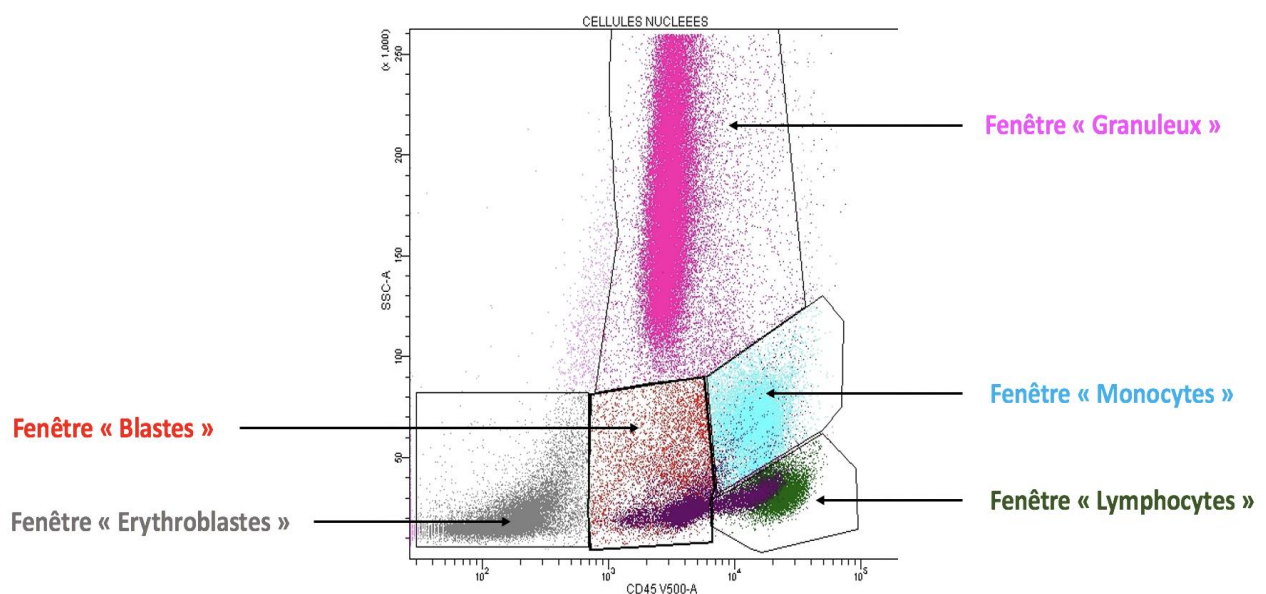


Figure 12 Histogramme bi-paramétrique SSC/CD45 permettant la sélection des différentes populations leucocytaires (moelle osseuse saine)

La population cellulaire (en violet) présente à la fois dans la fenêtre « Blastos » et la fenêtre « Lymphocytes » correspond aux hémotogones (précurseurs des cellules lymphoïdes B) dont la maturation est corrélée positivement avec l'intensité du CD45.

Par la suite, l'analyse de la co-expression des marqueurs (CD) permet d'étudier les différentes lignées cellulaires ainsi que les processus de maturation. A un stade de maturation donné correspond une expression de glycoprotéines aboutissant à un phénotype bien particulier ; ce qui en fait le principal intérêt de la CMF dans le diagnostic des leucémies aiguës.

b. Approche LAIP/DfN pour le suivi de la MRD dans les LAM

Actuellement, le suivi de la MRD en CMF dans les LAM manque cruellement de standardisation. Selon le premier consensus de l'ELN, deux approches complémentaires devraient être prises en considération en CMF : l'approche *Leukemia-associated Aberrant ImmunoPhenotype* (LAIP) et l'approche *Different from Normal* (DfN).

Un LAIP correspond au phénotype aberrant exprimé par les blastes en comparaison avec le phénotype d'une cellule blastique saine. Cette approche est applicable pour 90% des cas de LAM. Il est important de noter qu'un LAIP peut être retrouvé en quantité très faibles dans des moelles osseuses de patients sains. Afin d'être pris en compte dans le suivi de la MRD, un LAIP doit être retrouvé en faible quantité dans des moelles osseuses de sujets sains (48).

Quatre types de LAIP sont actuellement décrits (49) :

- **L'asynchronisme de maturation** : c'est le cas d'une cellule blastique immature CD34+/CD33+ exprimant également un marqueur de maturation comme le CD15 qui ne se voit pas physiologiquement sur un myéloblaste
- **L'expression aberrante de marqueur** : l'expression du CD19 (marqueur lymphoïde B) ou du CD7 (marqueur lymphoïde T) par un myéloblaste par exemple
- **La sous ou la surexpression d'un marqueur** : par exemple, la surexpression du CD33 (marqueur de lignée myéloïde) sur un myéloblaste
- **La perte de marqueur** : perte du CD34 ou de l'HLA-DR (marqueurs d'immaturité) sur une cellule blastique

En combinant de multiples marqueurs de surface en CMF, un LAIP peut être utilisé afin de différencier les cellules blastiques anormales des cellules de

l'hématopoïèse normale et peut ainsi servir comme marqueur de suivi pour évaluer la MRD.

La recherche des LAIP doit être réalisée sur prélèvement médullaire et un minimum de 500.000 cellules nucléées si possible, excluant les cellules CD45 négatif et les débris cellulaires, doit être acquis afin d'atteindre une sensibilité satisfaisante pour l'évaluation de la MRD. Le suivi des LAIP implique leur identification au diagnostic. Cependant, cette détermination n'est pas toujours effectuée ou disponible. L'approche DfN permet de s'affranchir de la comparaison obligatoire avec le phénotype des cellules leucémiques au diagnostic si ce dernier n'est pas disponible. L'approche DfN a pour principe l'identification d'expressions phénotypiques aberrantes portées par les cellules leucémiques à un moment donné dans le suivi. Cette méthode est donc basée sur la comparaison des cellules leucémiques au phénotype normal des cellules blastiques. L'approche DfN a pour avantage de ne pas être restrictive au suivi d'un LAIP fixe. Cette approche a toute sa place dans l'évaluation de la MRD en regard des nombreuses études qui ont montré que des changements phénotypiques pouvaient avoir lieu au cours de l'évolution de la maladie au même titre que des modifications génétiques **(50)**. Cette méthode permet de détecter l'apparition de nouveaux LAIP. Finalement, l'ELN recommande la combinaison des deux approches ; un LAIP étant finalement une anomalie DfN dans la majorité des cas.

En théorie, la sensibilité de 10^{-6} pourrait être atteinte pour le suivi de la MRD en CMF. Cependant, l'expression aberrante de certains marqueurs peut se rencontrer en petites proportions chez les individus sains ; ce qui augmente la possibilité de faux positifs lorsque la sensibilité est augmentée **(51) (52)**. En pratique quotidienne, des sensibilités de l'ordre de 10^{-4} sont obtenues pour l'évaluation de la MRD en CMF.

L'importance du suivi de ces marqueurs pour l'évaluation de la MRD réside dans l'impact pronostic significatif qu'il démontre. En effet, la différence de quantification des cellules leucémiques exprimant des LAIP entre le diagnostic et la rémission complète, mesurée en *Log Difference* (LD), est corrélée à la survie sans rechute (RFS) en post-induction et post-consolidation. La mesure de la LD est un facteur indépendant pronostic sur la RFS **(53)**. Par ailleurs, Terjwin et *al.*, dans l'étude HOVON/SAAK 42A, apportent une fois de plus la preuve que la MRD évaluée par CMF

est un facteur pronostic indépendant avec notamment la mise en évidence d'une augmentation du risque de rechute significatif en cas de MRD positive (> 0,1% des leucocytes totaux) après deux cycles d'induction mais également en post-consolidation [Figure 13].

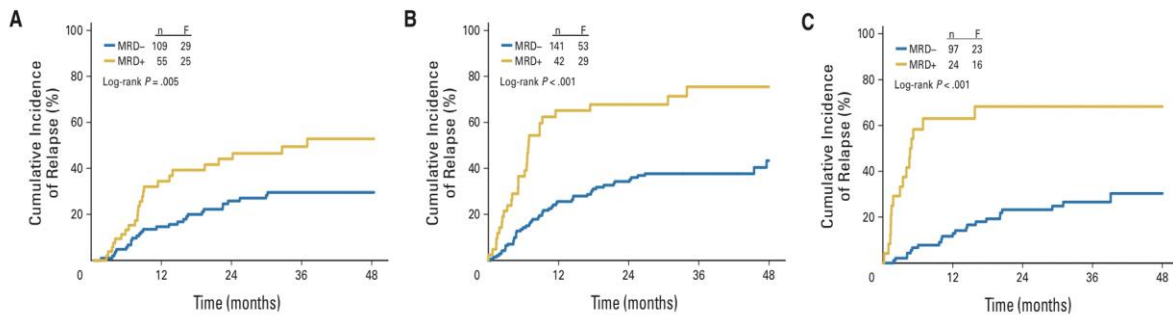


Figure 13 Incidence cumulée du taux de rechute selon le statut MRD évaluée par CMF, d'après (54)

A : Après cycle d'induction n°1 ; B : Après cycle d'induction n°2 ; C : Après traitement de consolidation

c. Approche LSC pour le suivi de la MRD dans les LAM

Malgré les différentes thérapies constituant l'arsenal thérapeutique dans les LAM, environ 50% des patients atteignant la rémission complète rechutent (55). Ainsi, une meilleure évaluation de la rémission complète semble nécessaire afin de proposer de meilleurs indicateurs pronostiques à long terme. Depuis qu'il est maintenant admis que les LSC sont à l'origine, entre autres, du phénomène de rechute, leur identification au diagnostic et lors des différents points de suivi en MRD semble être une piste sérieuse afin d'établir de nouveaux scores pronostiques mais également de créer de nouvelles thérapies capables de détruire ce pool cellulaire.

Au diagnostic et en fonction des *cut-off* de significativité utilisés pour la détection des LSC en CMF, le taux de rechute est significativement différent entre les patients LSC+ et LSC- [Figure 14] (56).

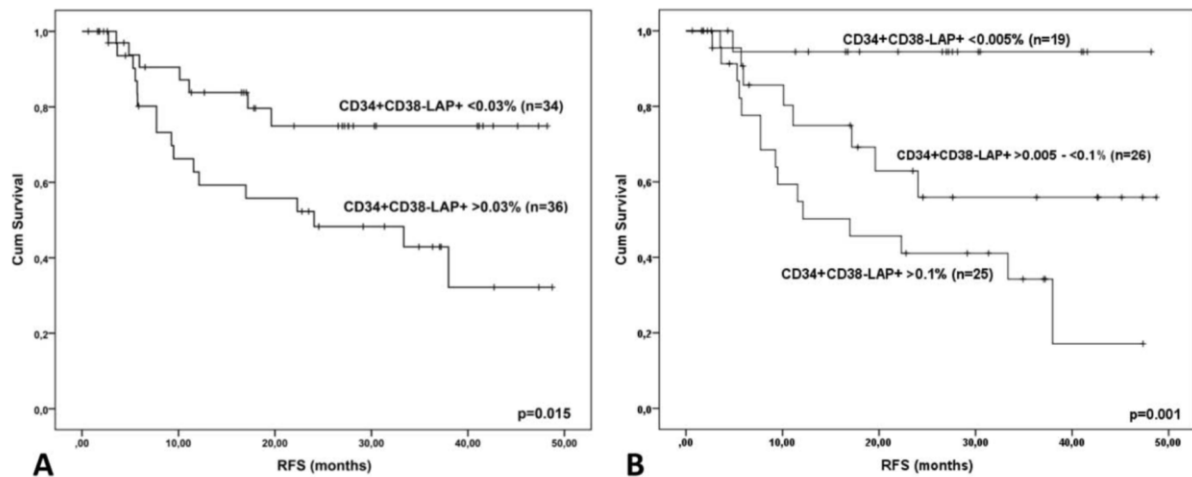


Figure 14 Valeur pronostique de la fréquence des LSC au diagnostic, d'après (56)

A : Survie sans rechute (RFS) chez les patients en rémission avec un diagnostic de LSC+ basé sur un cut-off > 0,03% (p=0,015) ; B : Survie sans rechute (RFS) chez les patients en rémission avec un diagnostic de LSC+ basé sur un cut-off > 0,005% et sur un cut-off de LSC > 0,1% (p=0,001)

La même équipe démontre également l'impact pronostic de la présence de LSC lors des différents points de suivi en utilisant un seuil décisionnel de 0,0003 % ($3 \cdot 10^{-4}$) pour le premier cycle d'induction et un *cut-off* de 0,0001% ($1 \cdot 10^{-4}$) pour le deuxième cycle d'induction et la consolidation [Figure 15] (56).

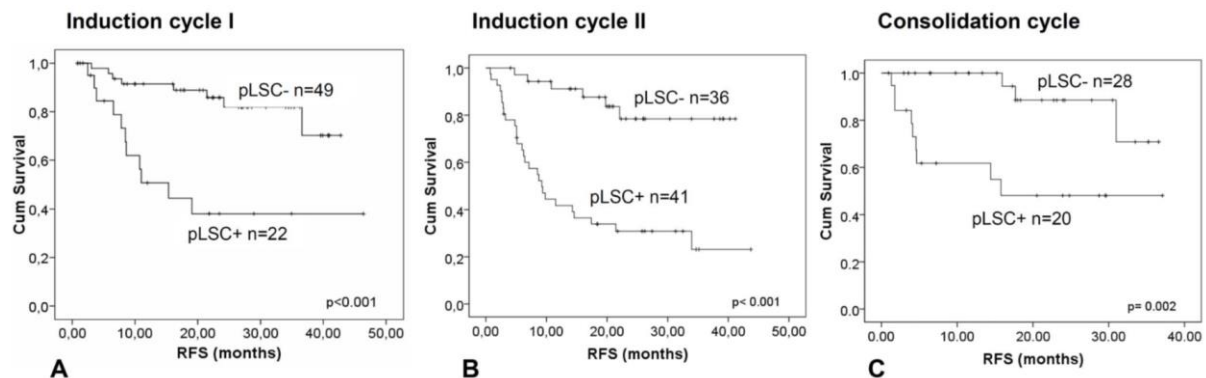


Figure 15 Valeur pronostique de la fréquence de LSC au suivi, d'après (56)

A : Survie sans rechute (RFS) chez les patients en rémission en post-induction (cycle n°1) basé sur un *cut-off* de 0,0003% (p< 0,001) ; B : Survie sans rechute (RFS) chez les patients en rémission en post-induction (cycle n°2) basé sur un *cut-off* de 0,0001% ; C : Survie sans rechute (RFS) chez les patients en rémission en consolidation basé sur un *cut-off* de 0,0001%

Comme vu précédemment, l'isolement des LSC repose historiquement sur l'expression de l'antigène de surface CD34 et la non-expression du CD38. Cependant, le compartiment CD34+/CD38-, à lui seul, ne suffit pas à caractériser ces LSC. En

effet, ce compartiment est également le siège des cellules souches hématopoïétiques saines.

Certains marqueurs de lignée comme le CD2, le CD7, le CD11b, le CD19, le CD22 et le CD56 peuvent être positifs sur les LSC alors qu'ils ne sont jamais retrouvés sur les HSC en théorie **(57)**. De plus, l'absence d'expression du CD13, du CD33 et du HLA-DR peuvent être considérées comme une aberration phénotypique puisque les HSC les expriment toujours, classant la cellule CD34+/CD38- en LSC **(58)**. Par ailleurs, il a été démontré que les LSC avaient une intensité de CD34 et de CD45, une taille et une structure plus importantes que les HSC **(56)**. Suite à la mise en évidence de ces aberrations, d'autres marqueurs d'intérêt ont été étudiés afin de parvenir à différencier phénotypiquement et de façon la plus robuste possible ces deux groupes cellulaires chez les patients atteints de LAM : HSC et LSC.

d. CD90

Le CD90 ou THY-1 est une glycoprotéine de surface cellulaire ancrée au glycoposphatidylinositol (GPI) impliquée dans la communication et l'adhésion cellulaire principalement. Elle est habituellement exprimée dans de nombreux types cellulaires et notamment dans les cellules souches hématopoïétiques, les cellules NK et les thymocytes.

En 1992, la LTC-IC a permis d'identifier, par l'expression du CD34 et du CD90 et par l'absence de l'expression des marqueurs de lignée (Lin-), des cellules partageant les propriétés définissant les HSC **(59)**. L'absence d'expression du CD90 par les LSC permet alors de les différencier dans un premier temps et phénotypiquement des HSC **(60)**.

e. CD45RA

Le CD45, une glycoprotéine à activité tyrosine phosphatase, est connu comme étant le marqueur pan-leucocytaire et est exprimé physiologiquement par toutes les cellules nucléées du système hématopoïétique (exceptés les érythroblastes). Le CD45RA en est un de ses isoformes. L'expression du CD45RA dans les cellules souches leucémiques de la majorité des patients atteints de LAM en fait son principal intérêt. En effet, CD45RA est exprimé par les cellules LSC CD34+/38- mais n'est ni

retrouvé sur les cellules HSC ni sur les MPP. CD45RA est un des marqueurs incontournables pour la différenciation HSC/LSC (61).

f. Utilisation combinée des clusters de différenciation 34/38/90/45RA

En 2011, Goardon et son équipe mettent en évidence l'existence de plusieurs phénotypes parmi les cellules qualifiées de LSC. Deux populations majeures ayant des propriétés LSC émergent dans le compartiment CD34⁺ des patients atteints de LAM : une première population majoritaire caractérisée par le phénotype CD34⁺/CD38⁻/CD90⁻/CD45RA⁺ pouvant donner naissance à une deuxième population minoritaire caractérisée par le phénotype CD34⁺/CD38⁺/CD90⁻/CD45RA⁺ (phénotype *GMP-like*) [Figure 16]. Par ailleurs, les cellules retrouvées dans le compartiment CD38⁻/CD45RA⁺ sont capables d'engendrer des GMP mais n'ont pas de potentiel de lignée érythroïde ou mégacaryocytaire. Les CMP, les MEP et les GMP sont uniquement retrouvés dans le compartiment CD34⁺/CD38⁺ (62).

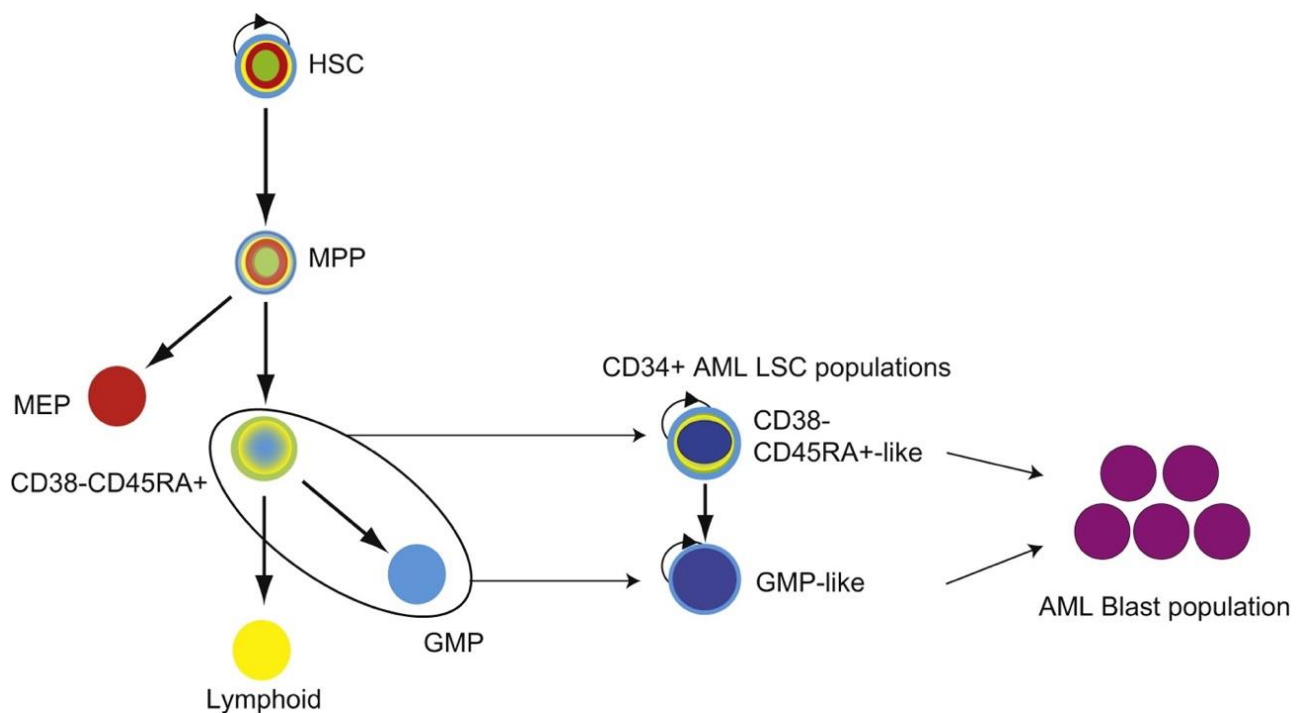


Figure 16 Hiérarchie évolutive dans les LAM (62)

Grâce à ces études phénotypiques, il est important de souligner qu'il est impossible de superposer la hiérarchie de l'hématopoïèse physiologique à celle de l'hématopoïèse pathologique. Dans le versant de l'hématopoïèse clonale, la LSC n'est pas l'équivalent de la HSC. La HSC est l'unique cellule ayant un potentiel « souche »

dans l'hématopoïèse physiologique. La complexité est bien plus importante dans l'hématopoïèse clonale où plusieurs cellules leucémiques aux phénotypes cellulaires différents semblent démontrer un potentiel « souche » et sont donc capable à elles seules de régénérer des leucémies après transplantations. En effet, malgré le fait que la population LSC majoritaire au phénotype Lin⁻/CD34⁺/**CD38**⁻/CD45RA⁺/CD90⁻ (phénotype *LMMP-like*) soit la population stipulée comme étant présente au sommet de la hiérarchie de l'hématopoïèse clonale, il apparaît que certaines cellules leucémiques plus minoritaires, au phénotype Lin⁻/CD34⁺/**CD38**⁺/CD45RA⁺/CD90⁻ (phénotype *GMP-like*), détiennent également un potentiel LSC.

g. CD123

Le CD123 correspond à la chaîne α du récepteur de l'interleukine 3 (IL-3R α). Il est exprimé très fortement par les cellules dendritiques. Il est également exprimé par les progéniteurs myéloïdes, par les monocytes et peut être présent sur certaines cellules jeunes de la lignée lymphoïde B. Il est en revanche absent du phénotype caractérisant les érythroblastes.

Le marqueur CD123 est hautement exprimé dans le compartiment leucémique CD34⁺/CD38⁻ mais est absent de ce compartiment dans l'hématopoïèse normale **(63)**; ce qui en fait un marqueur de choix également pour identifier les LSC tout en excluant les HSC.

Fait intéressant, l'expression du CD123 serait plus importante dans les LAM *NPM1* ou *FLT3-ITD* muté **(64)**.

h. TIM-3

De façon physiologique, TIM-3, pour « T-cell Immunoglobulin Mucin-3 », est une molécule de surface réceptrice pouvant être exprimée sur les lymphocytes T helper de type 1 (Th1) producteurs d'interférons gamma, les lymphocytes T régulateurs, les lymphocytes T cytotoxiques, les cellules dendritiques, les cellules NK ou encore les cellules myéloïdes suppressives ou les monocytes. Elle joue un rôle majeur dans la régulation de l'immunité acquise et adaptative. Par exemple, le ligand Gal-9 une fois lié sur TIM-3 entraîne l'apoptose du lymphocyte Th1 et donc régule négativement la production d'interféron gamma **(65)**. La [Figure 17] illustre brièvement le rôle de TIM-3 en fonction des différents types cellulaires sur lesquels il est exprimé.

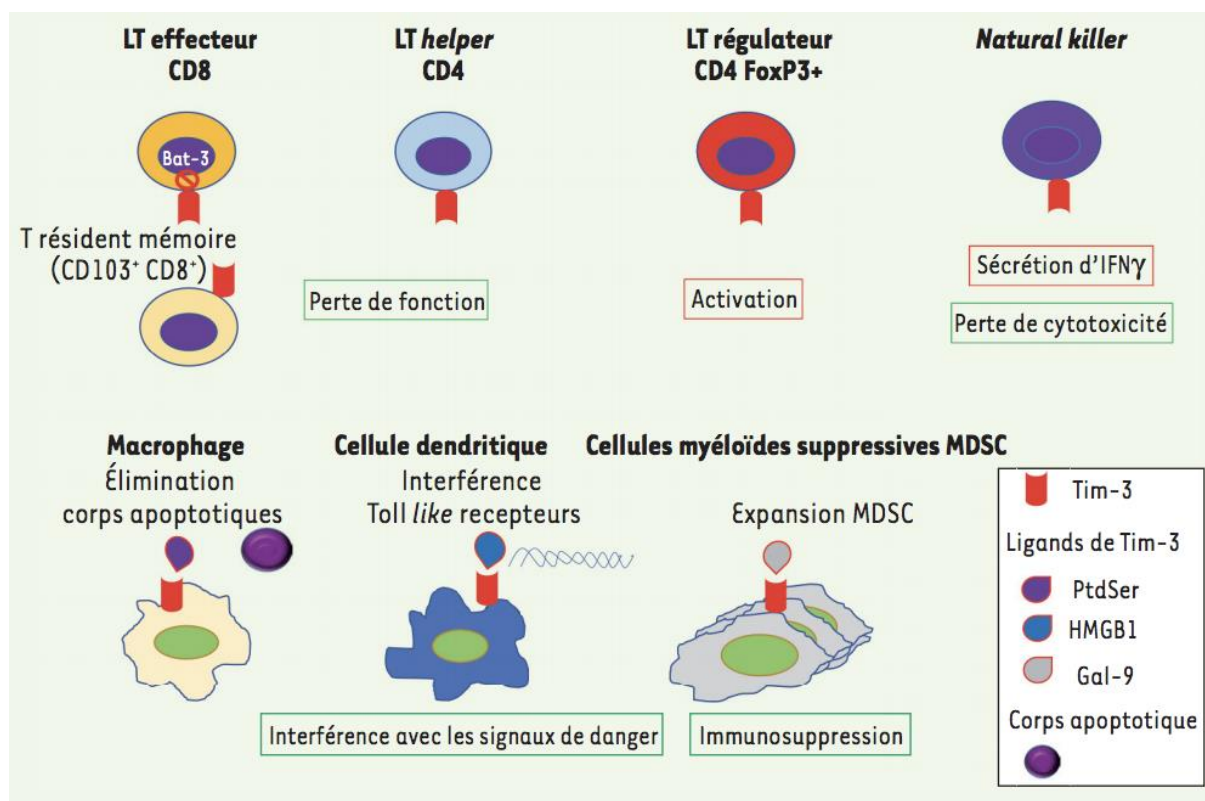


Figure 17 Effet de TIM-3 sur les différents types cellulaires (66)

Dans les LAM, son intérêt réside dans le fait qu'il apparaît être un marqueur spécifique des LSC dans le compartiment CD34+/CD38-. Les HSC, quant à elles, ne l'expriment pas **(67)**. Ainsi, TIM-3 semble être un marqueur très utile et spécifique afin de différencier clairement les LSC des cellules résiduelles HSC dans les LAM. TIM-3 est exprimé à la surface des LSC dans tous les types de LAM excepté la leucémie aiguë promyélocytaire. Il convient également de noter que TIM-3 est exprimé uniformément par les cellules leucémiques se trouvant dans le compartiment CD34+/CD38+ également. De plus, son expression semblerait plus importante dans les LAM du groupe CBF **(68)**.

i. CLL-1

CLL-1, pour « C-type lectin-like molecule-1, a été décrite pour la première fois en 2004 et appartient à la famille des lectines type C. Elle serait impliquée dans plusieurs voies de signalisation, son domaine intracellulaire contenant un motif tyrosine et un motif YXXM **(69)**. Cependant, ses propriétés restent aujourd'hui peu connues. En conditions physiologiques, son expression est limitée aux cellules

hématopoïétiques et plus particulièrement aux cellules granuleuses présentes dans le sang périphérique et dans la moelle osseuse. Son expression est absente des progéniteurs retrouvés dans les compartiments CD34+/CD38- mais peut apparaître sur quelques cellules retrouvées dans le compartiment CD34+/CD38+ ou CD34+/CD33+. Dans les LAM, CLL-1 est exprimé à la surface des blastes au diagnostic dans la majorité des cas **(69)**.

Tout comme TIM-3, CLL-1 est largement exprimée sur les cellules LSC CD34+/CD38- contrairement aux cellules résiduelles HSC CD34+/CD38-. De plus, CLL-1 peut être détecté sur les cellules résiduelles leucémiques CD34+/CD38- après chimiothérapie et sur des patients en rémission complète ; ce qui en fait, de par sa stabilité, un potentiel marqueur de suivi sérieux pour la quantification de la maladie résiduelle minimale **(70)**.

j. CD97

CD97 est une molécule transmembranaire faisant partie de la famille des récepteurs couplés aux protéines G et plus précisément de la sous-famille des récepteurs de type EGF-TM7. Codée par le gène *ADGRE5*, elle aurait un rôle dans les mécanismes d'adhésion cellulaire notamment suite à la fixation d'un de ses premiers ligands découverts récemment, le CD55 **(71)**. Concernant les cellules hématopoïétiques, CD97 est retrouvé sur les cellules granuleuses, les monocytes et apparaît sur les lymphocytes qu'après activation et plus particulièrement sur les lymphocytes T **(72)**.

Récemment, CD97 a été décrit comme étant un régulateur majeur des LSC. CD97 promeut, en situation pathologique, la prolifération et la survie des cellules leucémiques tout en maintenant l'état indifférencié des LSC. Ces mécanismes seraient partiellement médiés par l'activation des voies de signalisation Pi3k/Akt et MEK/ERK. Alors que les progéniteurs engagés sont largement CD97 négatif et les HSC pouvant être CD97 intermédiaire, les LSC, quant à elles, sur-expriment ce marqueur. Son expression est stable dans les LAM entre le diagnostic et la rechute ; ce qui en fait un bon marqueur de suivi pour la maladie résiduelle. Il est également important de mentionner que ce marqueur semble être un facteur indépendant de mauvais

pronostic dans les LAM et ce, lié à l'agressivité qu'il entraîne par le maintien de l'auto-renouvellement des LSC **(73)**.

En résumé, cette approche permet l'utilisation simultanée des marqueurs définissant les LSC afin de permettre leur identification et leur quantification au diagnostic et lors des points de contrôles en MRD ; le but ultime étant d'espérer un jour pouvoir prédire à terme le risque de rechute chez les patients atteints de LAM. Grâce à l'utilisation simultanée des marqueurs décrits ci-dessus, le phénotype typique des LSC serait le suivant :

CD34⁺/CD38⁻/CD45RA⁺/CD90⁻/CD123⁺/CD97⁺/TIM-3⁺/CLL-1⁺

Cependant, en raison de la découverte récente du concept de LSC ainsi que de ces nouveaux marqueurs, aucune standardisation n'existe actuellement sur cette approche et les études exploratoires sont toujours en cours.

4. Utilisation combinée de l'approche MRD LAIP et de l'approche LSC

L'approche LAIP et l'approche LSC ne semblent pas être exclusives l'une de l'autre et peuvent avoir un intérêt lorsqu'elles sont évaluées simultanément pour un même patient. En effet, Zeiljemaker et *al.* s'intéressent à l'intérêt de l'utilisation combinées de ces deux approches et démontrent que seuls les patients présentant une MRD positive aux deux approches ont significativement une survie globale moins bonne et un taux de rechute plus important que les autres groupes. Les seuils utilisés dans cette étude sont de 0,1% pour l'approche LAIP et 0,03% pour l'approche LSC **(74)**.

Ce constat est davantage développé par l'équipe de Terwijn où est proposée en finalité une classification pronostique selon les résultats de la MRD LAIP (*cut-off* à 0,1%) et de la MRD LSC (*cut-off* à 0,0001%) **[Figure 18]**. Parmi l'ensemble des patients MRD-, les patients LSC+ sont de plus mauvais pronostic. Les sous-groupes extrêmes ont un pronostic significativement différent ($p < 0,001$) et le pronostic le plus

sombre est attribué au groupe de patients MRD+/LSC+ alors que les patients MRD-/LSC- restent de bon pronostic.

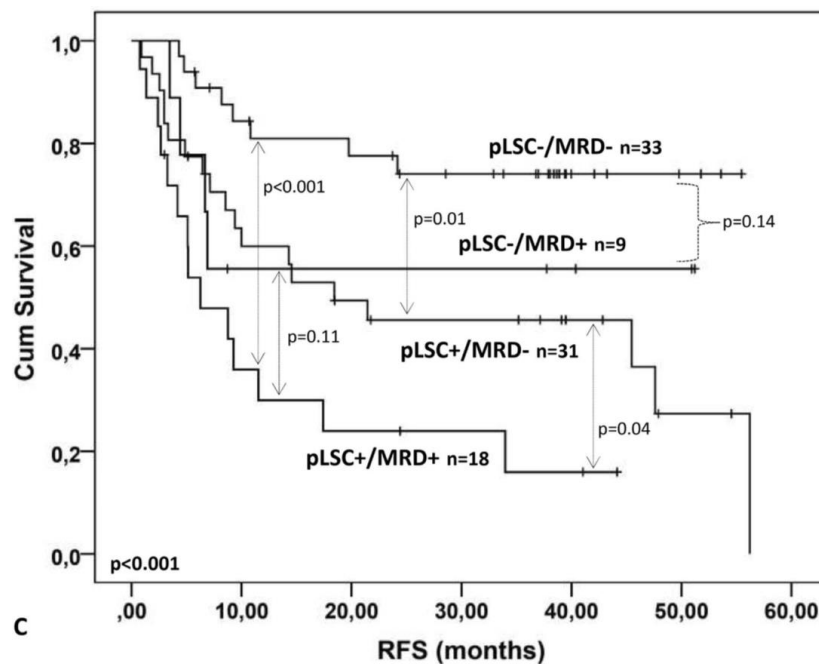


Figure 18 Valeur pronostique de l'utilisation combinée de l'approche LAIP et de l'approche LSC sur la survie sans rechute (RFS) en post-induction (2ème cycle), d'après (56)

Les variabilités rencontrées quant à l'interprétation pronostique en fonction des différents sous-groupes d'une étude à l'autre peuvent s'expliquer par les *cut-off* utilisés qui sont différents car aucune standardisation existe concernant les seuils à utilisés en MRD selon l'approche LSC.

5. MRD en RT-qPCR Versus MRD en CMF (approche LAIP/DfN)

La biologie moléculaire et la CMF sont actuellement les deux techniques principales pour l'étude de la MRD dans les LAM. Des avantages et des inconvénients sont propres à ces deux techniques [Tableau 5].

Tableau 5 Avantages et inconvénients des deux techniques principales, RT-qPCR et CMF (approche LAIP/DfN), utilisées actuellement dans le suivi de la MRD en pratique hospitalière, adapté de (75), (46), (76)

Techniques d'évaluation de la MRD	Avantages	Inconvénients
RT-qPCR	Mieux standardisée que la CMF Meilleure sensibilité que la CMF ($10^{-3} - 10^{-6}$) Robuste	Applicable seulement pour 25-30% des patients Chronophage Réalisée par série (résultat rendu tardivement) Faux positifs possibles
CMF	Applicable pour la grande majorité des patients (> 90%) Sensibilité correcte ($10^{-3} - 10^{-4}$) Economique Rapide (résultat rendu dans la journée) Travail sur cellules vivantes Pertinence de l'étude des compartiments souches dorénavant possible Robuste	Technique validée mais non standardisée Suivi difficile, expérience nécessaire de l'opérateur Variabilité inter-opérateur importante si manque d'expérience et de standardisation Changement phénotypique possible lors du suivi Requiert de larges panels d'anticorps

RATIONNEL ET OBJECTIFS DE L'ETUDE

Comme explicité précédemment, la complexité des LAM réside particulièrement dans la présentation hétérogène qu'elles peuvent adopter. En effet, les cellules malignes à l'origine du processus peuvent varier non seulement d'un individu à l'autre pour le même sous-type de leucémie aiguë myéloïde (variation inter-individuelle) mais également chez un même individu donné (variation intra-individuelle) au moment du diagnostic, du suivi et de la rechute. Il est de plus en plus admis que les cellules souches leucémiques sont à l'origine des rechutes. Il apparaît donc intéressant de les traquer et de les caractériser phénotypiquement étant donné leur impact de plus en plus certain sur le pronostic. Par ailleurs, pouvoir imaginer à plus long terme de nouvelles thérapies capables de les cibler pour espérer un jour contrôler durablement cette maladie semble être une piste sérieuse.

C'est dans ce contexte que le groupe MRD CMF LAM LSC a vu le jour et s'inscrit directement dans les objectifs de l'intergroupe français des LAM (ALFA-GOELAMS). Les docteurs Adriana Plesa et Christophe Roumier, cytométristes lyonnais et lillois respectivement, sont à l'origine d'un panel d'anticorps en cytométrie destiné à évaluer la MRD dans les LAM par l'approche LAIP/DfN (tube LSC1) et par l'approche LSC (tube LSC2). En mai 2018, un amendement au protocole BIG-1 a été instauré afin de permettre à titre observationnel, l'intégration de ce panel d'anticorps pour le suivi de la MRD résiduelle des patients jeunes atteints de LAM à différents points : MRD1, MRD2, MRD3, pré-allogreffe et 3 mois post-allogreffe **[Annexe 1]**.

Pour ce travail de thèse et de façon prospective, nous avons décidé d'évaluer les tubes d'anticorps LSC1 et LSC2 qui constituent ce panel et ce, sur quelques échantillons de moelle osseuse de patients afin d'étudier son applicabilité au CHU de Caen. Ce panel sera nommé « Panel LSC » dans ce manuscrit. Les objectifs principaux de ce travail sont la mise en place et la rédaction d'une stratégie d'analyse reproductible (détaillée dans la partie « Matériel et Méthode ») en vue d'une standardisation interne au CHU de Caen, l'évaluation de ce panel pour l'approche LAIP, la mise en évidence d'éventuelles anomalies phénotypiques durant le suivi (approche DfN) et la détection des LSC potentielles au diagnostic et au suivi. Nous discuterons des avantages de cette nouvelle approche de suivi de la MRD dans les LAM et de ses limites.

MATERIEL ET METHODE

I. Matériel

1. Echantillons de moelle osseuse

Pour cette étude, tous les échantillons de moelle osseuse des patients atteints de LAM ont été prélevés au CHU de Caen, à l'Institut d'Hématologie de Basse-Normandie, selon les bonnes pratiques de réalisation du prélèvement médullaire. Ces échantillons ont été acheminés au laboratoire d'hématologie dans un délai conforme au Répertoire des Analyses du CHU de Caen, à l'intérieur d'un tube EDTA conservé à température ambiante. Il est également à noter que quelques moelles osseuses de patients constituant le pool de moelles osseuses témoins proviennent d'hôpitaux périphériques de la région. Tous les échantillons analysés constituent des reliquats de prélèvements analysés dans la routine du laboratoire.

2. Patients témoins

Les deux tubes du panel LSC (LSC1 et LSC2) ont été testés sur des moelles osseuses considérées comme moelles témoins et stipulées dans le meilleur des cas exemptes de toutes anomalies de la lignée myéloïde et plus particulièrement de la cellule souche hématopoïétique. Les moelles osseuses présentant des signes de dysplasie en faveur d'un syndrome myélodysplasique ou les moelles osseuses de rémission cytologique de LAM n'ont pas été retenues pour des raisons évidentes d'anomalies de la cellule souche hématopoïétique sur le versant myéloïde.

3. Patients au diagnostic de LAM et au suivi

Les tubes du panel LSC ont été testés au diagnostic et au suivi, quand cela était possible, sur des patients dont le diagnostic de LAM a été effectué en cytologie et en cytométrie en flux au CHU de Caen. Les leucémies aiguës promyélocyaires ont été exclues de même que les LAM CD34 négatives à composante monocyttaire étant donné l'absence de marqueurs suffisants pour caractériser les monocytes dans ce panel. Le choix s'est également restreint sur des patients de préférence jeunes (âge <

65 ans) susceptibles d'être éligibles dans les protocoles thérapeutiques BIG-1 ou CBF. Les patients plus âgés mais éligibles à la chimiothérapie intensive (âge > 65 ans) et pouvant être inclus dans le protocole observationnel ALFA 1200 ont été également retenus. Tout comme le stipulent les critères d'inclusion dans le protocole BIG-1, les patients en acutisation de syndrome myéloprolifératif ont été exclus alors que les patients présentant une acutisation de syndrome myélodysplasique pouvaient être inclus. L'inclusion des patients au diagnostic de LAM s'est déroulée de janvier 2020 à juin 2020. Les suivis des patients inclus se sont arrêtés en septembre 2020 dans le cadre de ce travail de thèse.

II. Méthode

1. Pré-analytique

a. Ficoll ® et Lyse Macrovolume ®

En fonction de leur indication, les échantillons de moelle osseuse ont été techniqués selon deux protocoles.

Les échantillons de moelles témoins ainsi que les patients au diagnostic de LAM ont été traités par Ficoll ® dont le protocole est détaillé en [Annexe 2]. La moelle osseuse est déposée dans un tube à centrifuger, au-dessus d'une couche de polyfluorocarbène liquide. Cette technique permet la récupération des cellules mononucléées et l'élimination des érythrocytes et des polynucléaires. Au CHU de Caen, en routine, tous les échantillons sanguins ou de moelle osseuse sont techniqués sous ce protocole.

Les échantillons de moelles de patients LAM au suivi ont été techniqués selon deux protocoles en parallèle :

- Protocole Ficoll ® de façon identique aux moelles osseuses témoins
- Lyse macrovolume NH₄Cl dont le protocole est détaillé en [Annexe 3].

Théoriquement, la lyse macrovolume a l'avantage d'éliminer la totalité des érythrocytes en s'affranchissant d'une perte potentielle de polynucléaires neutrophiles

(PNN). Les proportions de cellules nucléées obtenues pour une même moelle osseuse diffèrent alors en fonction du traitement utilisé.

La lyse macrovolume est le protocole pré-analytique recommandé pour l'étude de la MRD. Cependant, compte-tenu de la validation au CHU de Caen de l'utilisation du protocole Ficoll® en routine, il a été convenu de tester majoritairement le panel LSC sur les échantillons médullaires suite à l'application de cette méthode pré-analytique.

Les suspensions cellulaires obtenues ont été par la suite ajustées à une concentration de 10 millions de cellules par mL quand la quantité de cellules récupérées le permettait.

b. Panel LA au CHU de Caen

Au diagnostic de LAM, les échantillons de patients ont été typés par le panel LA du CHU de Caen [Tableau 6]. Le phénotype des cellules blastiques a été obtenu ainsi que la mise en évidence de LAIP.

Le panel LA actuellement utilisé en routine au CHU de Caen est composée de 5 tubes 8 couleurs comprenant des marqueurs extra-cellulaires. Le tube 1 permet principalement la recherche des cellules blastiques de par la présence des marqueurs d'immaturité CD34 et HLA-DR ainsi que l'assignement à la lignée myéloïde si tel est le cas ; le CD117 et le CD33 étant des marqueurs de lignée myéloïde. Le tube 2 a pour objectif la caractérisation des composantes monocytaires et/ou érythroblastiques. Les tubes 3 et 4 permettent l'étude de l'expression des marqueurs lymphoïdes B principalement afin de permettre l'assignement de lignée B ou de mettre en évidence des aberrations phénotypiques présents sur des blastes myéloïdes (LAIP). Le tube 5 est composé majoritairement de marqueurs lymphoïdes T et est nécessaire à l'assignement de la lignée T et à la détection d'aberrations phénotypiques (LAIP) sur des blastes myéloïdes.

Tableau 6 Panel LA 8 couleurs utilisé en routine au CHU Caen

Fluorochrome	FITC	PE	PerCp Cy 5.5	Pe Cy7	APC	APC H7	V450	V500
Tube LA 1	CD15	CD7	CD33	CD34	CD117	HLA DR	CD56	CD45
Tube LA 2	CD65	GlycoA	CD64	CD34	CD36	CD14	CD11c	CD45
Tube LA 3	CD38	CD22	CD5	CD34	CD10	CD20	CD19	CD45
Tube LA 4	IgM	CD13	CD4	CD34	CD33	/	CD19	CD45
Tube LA 5	CD3	CD7	CD4	CD34	CD2	CD8	CD5	CD45

A ces 5 tubes s'ajoutent 3 tubes de marqueurs intra-cellulaires déterminants pour l'assignement de lignée qui ne seront pas détaillés car peu utiles dans la recherche de la maladie résiduelle.

Lors des points de suivi, les cellules résiduelles anormales dont le phénotype est défini au diagnostic sont recherchées. L'approche actuelle de l'évaluation de la MRD au CHU de Caen en CMF se base sur le rendu spécifique de la détection de ces cellules blastiques résiduelles ou l'apparition de nouvelles cellules blastiques anormales. Le compte-rendu apparaît pour le clinicien selon un mode quasi binaire :

- « Il n'a pas été détecté de cellules blastiques dont le phénotype correspond à celui décrit précédemment »

- « Il persiste XX% de cellules blastiques similaires à celles décrites au diagnostic » :

Approche inspirée de l'approche LAIP

- « Il a détecté XX% de cellules blastiques anormales exprimant les marqueurs....

Cette population est différente de celle décrite au diagnostic » : Approche inspirée de l'approche DfN

Le suivi de la maladie résiduelle au CHU de Caen n'étant pas réellement standardisée, le terme MRD n'apparaît pas distinctement dans le compte-rendu.

c. Panel LSC

En parallèle du panel LA du CHU de Caen, les cellules de la moelle osseuse des patients au diagnostic de LAM et au suivi ont été marquées par le panel LSC. Ce panel est composé de 3 tubes : un tube LSC1, un tube LSC2 et un tube Contrôle.

Le tube contrôle comporte uniquement du CD45 V500 afin de pouvoir évaluer l'auto-fluorescence des populations cellulaires différenciées grâce à l'histogramme SSC/CD45.

Les tubes LSC1 (BD Lyotube Stain 368 ®) et LSC2 (BD Lyotube Stain 369 ®) sont des tubes comprenant des anticorps lyophilisés. Ils contiennent chacun 8 anticorps couplés à des fluorochromes différents et sont détaillés dans le [Tableau 7].

Tableau 7 Fluorochromes et anticorps composant les tubes LSC1 et LSC2 du panel LSC

Fluorochrome	FITC	PE	PerCp Cy 5.5	Pe Cy7	APC	APC H7	BV421	V500
Tube LSC1	CD7/CD56	CD13	CD33	CD38	CD34	CD19	CD117	CD45
Tube LSC2	CD90	Mix*	CD123	CD38	CD34	CD45RA	CD117	CD45

*Mix = CD97 + TIM-3 + CLL1

Chaque lyotube a été reconstitué avec 100 µL de CellWash ® (Becton Dickinson) avant l'ajout des anticorps manquant.

10µL de CD56 FITC Becton-Dickinson ® ont été ajoutés manuellement dans chaque tube LSC1.

10µL de CD97 PE, de TIM-3 PE et de CLL-1 PE Becton-Dickinson Pharmingen ® ont été ajoutés manuellement dans chaque tube LSC2 afin de constituer le Mix.

Au mieux, 100 µL de suspensions cellulaires ont été déposées dans les tubes LSC1, LSC2 et contrôle afin de marquer environ 1 million de cellules.

Les quantités finales d'anticorps présentes dans les lyotubes sont validées par le fournisseur pour le marquage d'1 million de cellules.

Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, les cellules marquées et obtenues après Ficoll ® ont été lysées et lavées à l'aide de l'automate BD Lyse Wash Assistant ® (Becton-Dickinson) selon le cycle prédéfini pour l'utilisation en routine au CHU de Caen.

Les cellules marquées obtenues après lyse macrovolume, quant à elles, ont seulement bénéficié de cycles de lavage (Wash Only) dans ce même automate.

2. Analytique

Les échantillons marqués avec le panel LA ont été analysés sur le cytomètre BD FACS Canto ®, cytomètre réglé et standardisé selon les recommandations du groupe FranceFlow. La standardisation et la reproductibilité des mesures de fluorescence sont établies à l'aide de valeurs cibles fixes vérifiées quotidiennement (utilisation de Rainbow Beads (BD)).

Les échantillons marqués selon le panel LSC ont été passés sur le cytomètre BD FACS Lyric ®, cytomètre réglé et standardisé pour le passage en routine des échantillons. La standardisation et la reproductibilité de ce cytomètre sont obtenues automatiquement en utilisant la fonction interne au logiciel FACSuite (BD) dénommée « Assay Tube Settings » permettant d'obtenir d'un jour à l'autre les mêmes valeurs cibles pour chaque PMT. De plus, cette stabilité des valeurs cibles par PMT est vérifiée à l'aide des Rainbow Beads (BD).

3. Post-analytique

Les données brutes fournies par le cytomètre ont été récupérées sous le format **.FCS** et analysées sur le logiciel FACS DiVa ® (BD).

a. Stratégie de « gating » initiale du panel LSC

Un masque d'analyse pour la stratégie de « gating » a été proposé par le groupe initiateur du projet CMF LAM MRD que nous nous sommes attachés à reproduire sur notre logiciel d'analyse FACS DiVa ® (BD).

Après réflexion sur les grandes lignes de la stratégie d'analyse exposées par les fondateurs de ce panel, nous avons rédigé un « workflow » d'analyse présenté en [

Annexe 4] afin d'établir une standardisation interne au CHU de Caen. Ce « workflow » permet de s'assurer de la reproductibilité de la stratégie d'analyse d'un patient à l'autre et d'un opérateur à l'autre. Il est à noter qu'aucune stratégie d'analyse stricte n'a été détaillée par le groupe et rien n'est encore à l'heure actuelle standardisée entre les différents centres participants.

Le masque d'analyse calqué sur un échantillon d'un contrôle externe de la qualité est présenté en [Annexe 5] pour le tube LSC1 et en [Annexe 6] pour le tube LSC2.

L'initiation de l'analyse est commune aux deux tubes LSC1 et LSC2 constituant le panel.

La vérification des plots de compensations permet de s'assurer de la présence d'éventuelles fuites de signal et de valider l'application de la matrice de compensation sur l'échantillon à analyser.

La sélection de la fenêtre « Singles » parmi tous les événements acquis permet de s'affranchir d'éventuels doublets correspondant au passage de deux cellules non séparées lors de l'hydro-focalisation dans le cytomètre. Le réglage de la fenêtre « Time » permet de vérifier le bon déroulé de l'acquisition par le cytomètre d'une part, et permet de s'affranchir de la fin de l'acquisition qui pourrait être le résultat d'une acquisition aspécifique (prise de bulles d'air dans le fond du tube) [Figure 19].

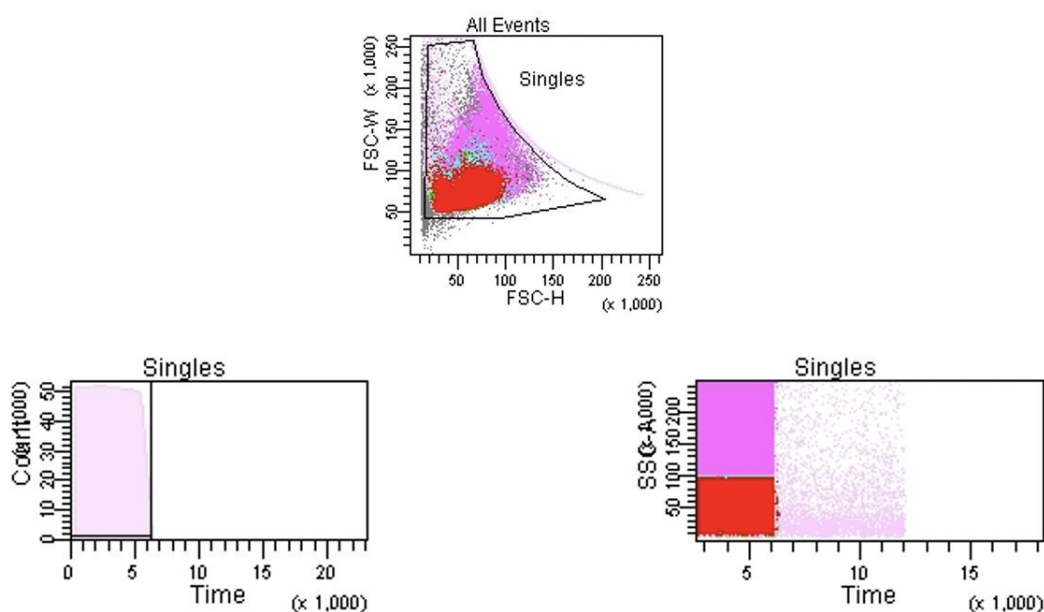


Figure 19 Elimination des éventuels doublets et réglage de la fenêtre « Time »

L'histogramme bi-paramétrique SSC/FSC permet la sélection de l'ensemble des cellules nucléées vivantes « Live Cells » de la moelle osseuse en s'affranchissant des débris cellulaires qui présentent une taille et une structure très faibles. Cette étape permet également la création de la fenêtre « MNC » (Mononuclear Cells) représentant les cellules nucléées totales amputées des granuleux matures [Figure 20 - A]].

Des fenêtres permettent la sélection des différentes populations leucocytaires grâce à l'histogramme bi-paramétrique représentant la SSC en fonction du CD45, marqueur pan-leucocytaire [Figure 20 - B)]. La fenêtre « Blastos », définie selon l'intensité intermédiaire du CD45 et une structure faible, permet la sélection des cellules blastiques myéloïdes. Les lymphocytes sont les cellules nucléées exprimant le plus fortement le CD45. Les monocytes quant à eux, expriment plus fortement le CD45 que les cellules blastiques et ont une structure plus importante que les lymphocytes. Les granuleux se distinguent par leur structure très importante. Enfin, les érythroblastes se reconnaissent par l'absence d'expression du marqueur CD45 et leur structure faible.

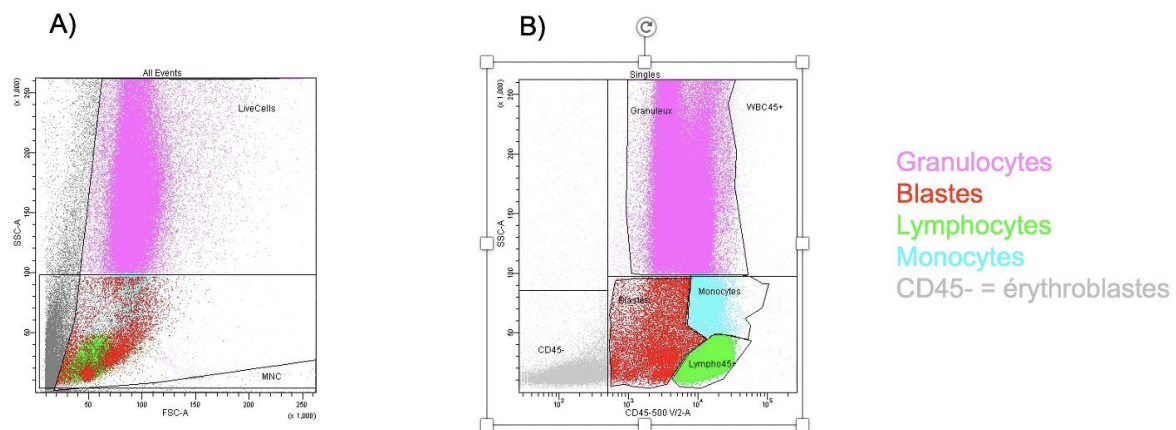


Figure 20 Sélection des différentes populations leucocytaires

A) Histogramme bi-paramétrique SSC/FSC pour la création des fenêtres « Live Cells » et « MNC ». B) Création des fenêtres représentant les différentes populations cellulaires en particulier leucocytaires selon un histogramme bi-paramétrique SSC/CD45. En rose : fenêtre « granulocytes matures », en rouge : fenêtre « Blastos », en vert : fenêtre « Lympho45+ », en bleu ciel : fenêtre « Monocytes », en gris : fenêtre « CD45- ». La fenêtre « WBC45+ » (WBC = White Blood Cells) comprend l'ensemble des populations leucocytaires définies précédemment.

Pour l'ensemble de la stratégie d'analyse détaillée dans ce manuscrit, les couleurs correspondant aux différentes populations sont identiques d'une figure à une autre afin de faciliter la compréhension.

La création d'une fenêtre « Mononuclear Cells 34+ » fort à intermédiaire (« MNC 34+ ») parmi les « Singles » [Figure 21 – A)], permet par la suite d'affiner la sélection des cellules blastiques présentes dans la population leucocytaire rouge

dénommée « Blastes ». La création de la fenêtre « BL34+/-117+/- » et la fenêtre « Blastes CD34+ /CD117+ » permet de sélectionner encore plus précisément la population blastique d'intérêt pour la réalisation de l'approche LAIP qui sera détaillée par la suite [Figure 21 – B)].

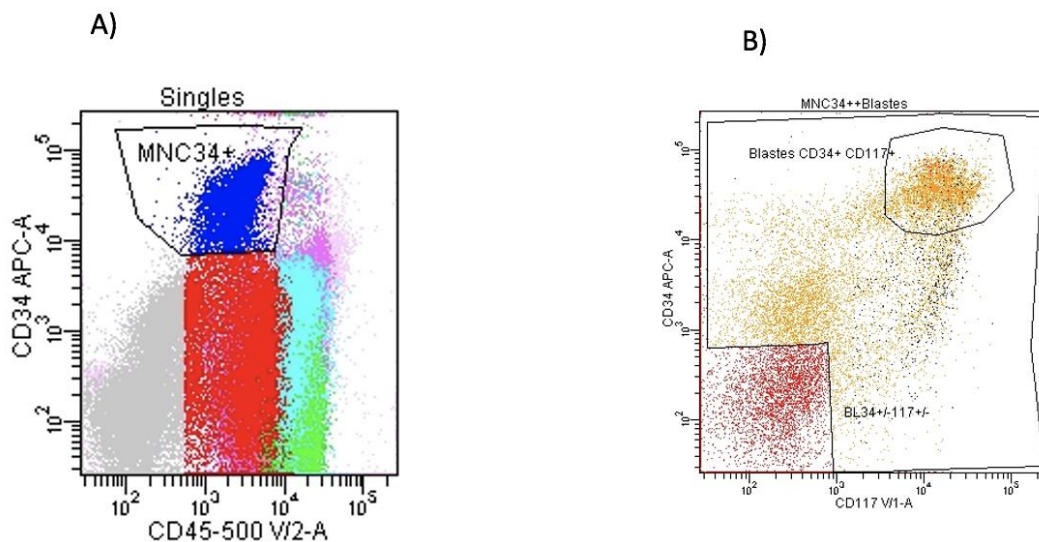


Figure 21 Sélection des populations blastiques d'intérêt

A) Sélection des MNC34+ présentant un CD45 intermédiaire parmi les "Singles". B) Sélection des populations blastiques d'intérêt « BL34+/-117+/- » en orange et « Blastes CD34+CD117+ » en fenêtre restreinte à l'aide d'un histogramme bi-paramétrique CD34/CD117.

La sélection de la population « MNC34+ » permet également par la suite, la séparation des cellules immatures CD34+ intermédiaire à fort en trois populations distinctes nommées P8, P7 et P6 qui sont différenciées par l'intensité d'expression du marqueur CD38 [Figure 22 – E)]. Les plasmocytes étant les cellules mononucléées exprimant le plus fortement le CD38, la borne supérieure de la population P8 a été déterminée par rapport aux plasmocytes [Figure 22 – B) E)]. Le seuil entre les populations P8 et P7 a été quant à lui défini par rapport à l'intensité du CD38 des hématogones (précurseurs des cellules lymphoïdes) présents dans l'échantillon [Figure 22 – B)]. La sélection des hématogones est affinée sur un histogramme bi-paramétrique CD33/CD19 afin de vérifier l'absence de blastes myéloïdes CD33+ exprimant de façon aberrante le CD19 [Figure 22 – A) C)]. Enfin, le seuil entre P7 et P6, seuil critique car définissant le compartiment souche P6, a lui été défini en utilisant l'intensité du début de la positivité des cellules granuleuses matures CD45 intermédiaire pour le CD38 [Figure 22 – D)]. C'est dans cette population P6 dont le

phénotype correspond aux cellules immatures CD34+/CD38-, que sera recherchée la présence des LSC.

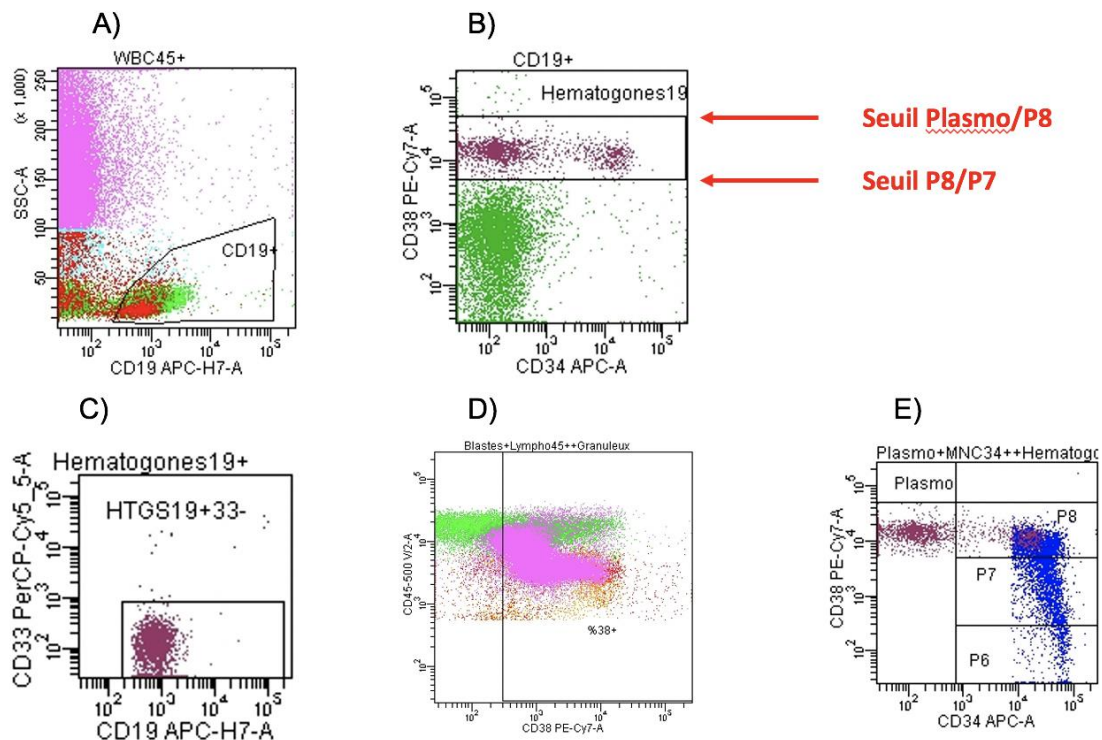


Figure 22 Stratégie d'obtention des populations P8, P7 et P6 (tube LSC1)

A) Sélection de la population CD19+ parmi les cellules nucléées totales CD45+ (WBC45+). B) Détermination du seuil P8/P7 par rapport à l'intensité du CD38 des hématogones. C) Affinement de la sélection des hématogones en CD19+/CD33-. D) Détermination du seuil P7/P6 grâce au positionnement du seuil de la positivité de CD38 par rapport à l'intensité des granuleux CD45 intermédiaire. E) Visualisation des populations Plasm0, P8, P7, P6 (MNC34+ en bleu, Hématogones en violet).

b. Approche LAIP dans le tube LSC1

Le tube LSC1 a pour objectif principal la mise en évidence d'un LAIP. Pour ce travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au LAIP CD7/CD56. En effet, grâce à l'étude de l'expression de ces marqueurs sur les cellules blastiques de nos moelles témoins, nous avons pu déterminer notre propre seuil au-delà duquel la présence de cellules immatures exprimant le CD7/CD56 est considérée comme étant une aberration phénotypique. Dans ce panel LSC, les LAIP CD7 et CD56 doivent être considérés comme un ensemble indissociable dans la mesure où ces deux marqueurs sont présents sur le même fluorochrome PE.

A l'exception des marqueurs CD38 et du CD7/CD56, le placement des fenêtres sélectionnant les populations cellulaires positives pour les marqueurs présents dans le tube LSC1 est déterminé visuellement sur les histogrammes bi-paramétriques qui présentent le marqueur CD45 en fonction des marqueurs d'intérêt respectifs CD34, CD33, CD117, CD13, CD19 [Figure 23]. La positivité des marqueurs myéloïdes CD33, CD117 et CD13 ainsi que celle du CD34 sont définies par rapport aux lymphocytes, population négative de référence choisie ici. La fenêtre de positivité du CD19 se place par rapport au début de la positivité de la population de référence choisie : les lymphocytes B.

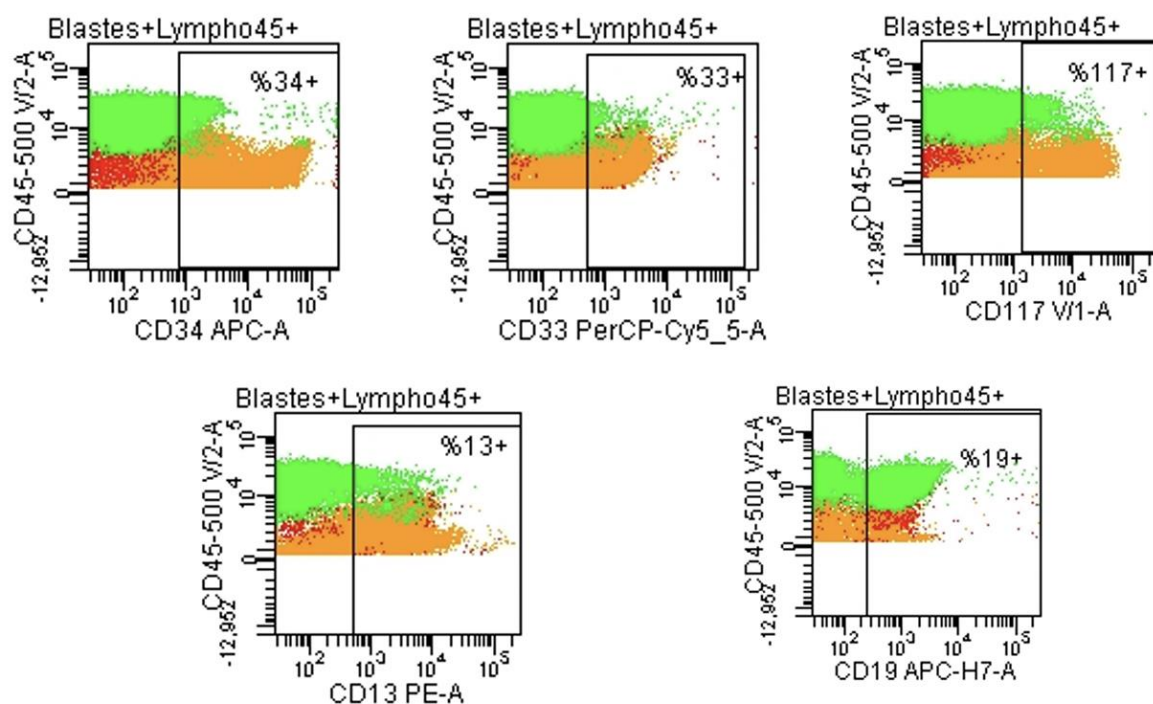


Figure 23 Histogrammes bi-paramétriques conditionnées sur les populations « Blastes » et « Lympho45+ » permettant la détermination des seuils de positivité des marqueurs du tube LSC1

De gauche à droite et de haut en bas : CD45/CD34, CD45/CD33, CD45/CD117, CD45/CD13 et CD45/CD19.

Le placement de la fenêtre caractérisant les cellules positives pour le CD7/CD56 fait appel à l'utilisation de l'auto-fluorescence des blastes pour le fluorochrome FITC dans le tube contrôle ne contenant que du CD45 sur fluorochrome V500 [Figure 24]. Cette ligne de seuil a ensuite été validée par rapport à une population contrôle négative pour le CD7/CD56 correspondant aux lymphocytes B dans les échantillons des patients quand la discrimination entre ces deux populations était visuellement possible.

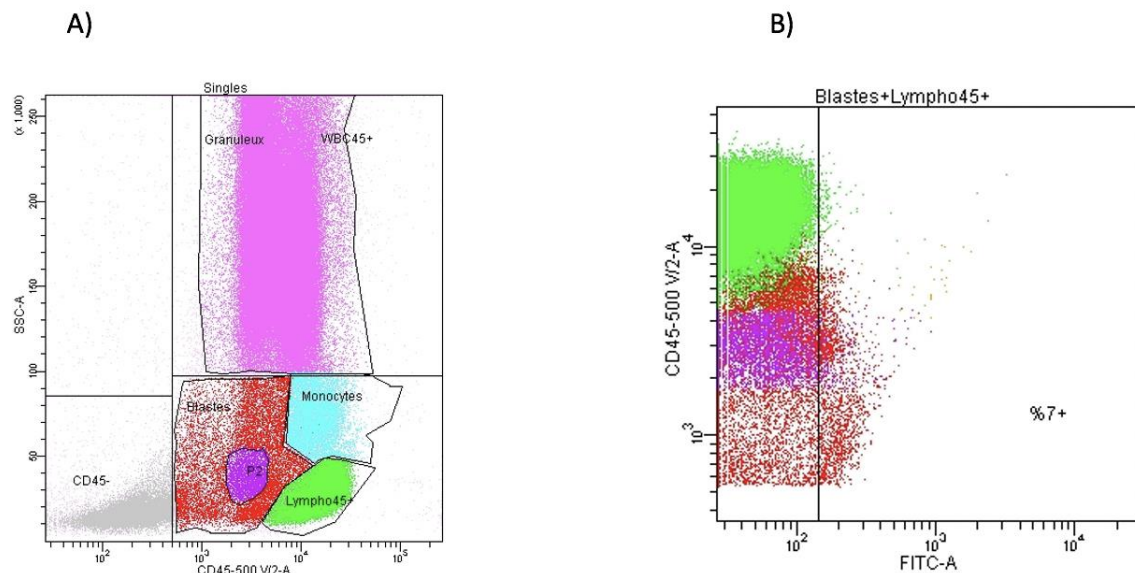


Figure 24 Stratégie de sélection de la fenêtre de positivité pour le CD7/CD56 (tube contrôle)

A) Sélection d'une population nommée P2 dans la fenêtre "Blastes" correspondant au positionnement habituel en CD45 des cellules blastiques (en violet). B) Placement de la fenêtre de positivité du CD7/CD56 par rapport à l'autofluorescence des blastes pour le fluorochrome FITC.

Le nombre d'événements correspondant au LAIP CD7/CD56 est conditionné sur les populations précédemment définies par le masque d'analyse « BL34+/-117+ » et « MNC34+ » et est la résultante d'une booléenne d'identification d'intersection de 10 fenêtres LAIP (LAIP1 à LAIP10) présentées ci-dessous :

LAIP1 : Histogramme biparamétrique CD38 versus CD34

LAIP2 : Histogramme biparamétrique CD13 versus CD117

LAIP3 : Histogramme biparamétrique CD33 versus CD117

LAIP4 : Histogramme biparamétrique CD33 versus CD13

LAIP5 : Histogramme biparamétrique CD7/CD56 versus CD33

LAIP6 : Histogramme biparamétrique CD7/CD56 versus CD13

LAIP7 : Histogramme biparamétrique CD19 versus CD117

LAIP8 : Histogramme biparamétrique CD7/CD56 versus CD117

LAIP9 : Histogramme biparamétrique CD19 versus CD33

LAIP10 : Histogramme biparamétrique CD19 versus CD13

Cette booléenne d'intersection est nommée « MRD LAIP ». Pour le suivi du LAIP CD7/CD56, le cytométriste devra s'assurer que le fenêtrage de chaque dot plot ne représentant pas le paramètre CD7/CD56 englobe la totalité de la population

blastique phénotypée au diagnostic selon la positivité ou la négativité des marqueurs d'intérêts composant les fenêtres LAIP. Inversement, les dot plot comprenant le LAIP CD7/CD56 devront être fenêtrés de façon à ce que la population positive pour le LAIP soit isolée des autres. Ainsi, la booléenne d'intersection de ces 10 fenêtres sera la résultante stricte de la population blastique exprimant de façon anormale le LAIP CD7/CD56 [Figure 25].

Booléenne d'identification MRD LAIP = LAIP1 AND LAIP2 AND LAIP3 AND LAIP4 AND LAIP5 AND LAIP6 AND LAIP7 AND LAIP8 AND LAIP9 AND LAIP10

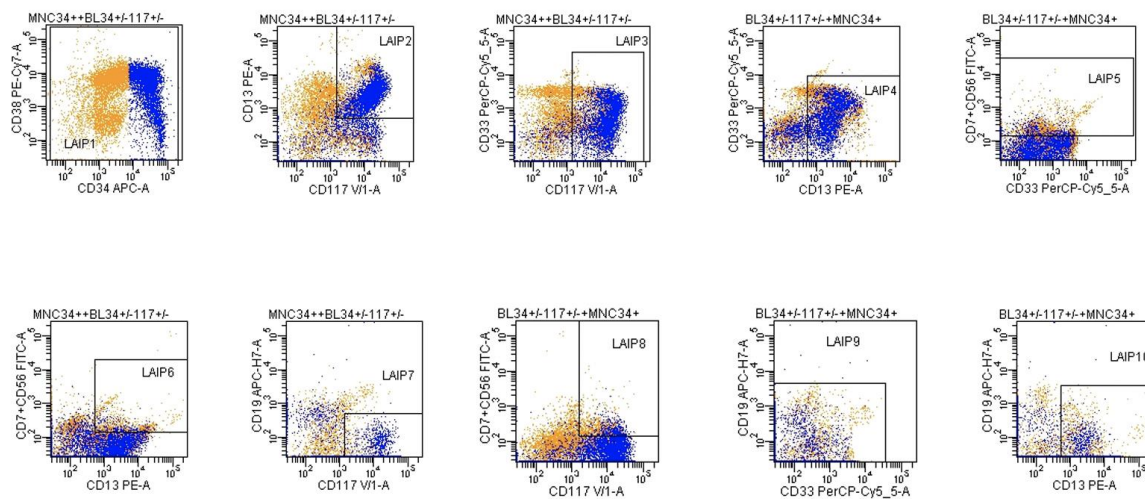


Figure 25 Fenêtrage LAIP1 à LAIP 10 (tube LSC1)

Le pourcentage de la MRD LAIP CD7/CD56 sera rendu sur le total des cellules nucléées CD45+.

Le LAIP est retenu pour le suivi dès lors qu'un minimum de 10% des cellules blastiques l'exprime. Néanmoins, les sous-clones bien différenciés de la population blastique majoritaire et exprimant le LAIP sont également suivis.

c. Approche LSC dans le tube LSC1

Le tube LSC1 permet une première approche de la composante LSC du patient étudié. La quantification de ces LSC repose également sur une booléenne d'identification conditionnée sur la population P6, c'est-à-dire la population CD34+/CD38-.

Booléenne d'identification LSCT1 = (CD33+ OR CD7+ OR CD19+) AND (CD13+ OR CD117+)

Afin d'obtenir le résultat de cette booléenne étudiant l'expression des marqueurs d'intérêt du tube LSC1 dans la population P6, des fenêtres sont placées sur les histogrammes bi-paramétriques mettant en regard le CD38 et un des marqueurs impliqués dans la booléenne étudiant la population MNC34+, en respectant les seuils déterminés précédemment pour les différents marqueurs du tube LSC1 [Figure 26]. Le fenêtrage s'effectue manuellement en plaçant la barre de seuil de positivité à la même valeur sur l'axe des abscisses que sur les fenêtres déterminant les seuils de positivités pour chacun des marqueurs.

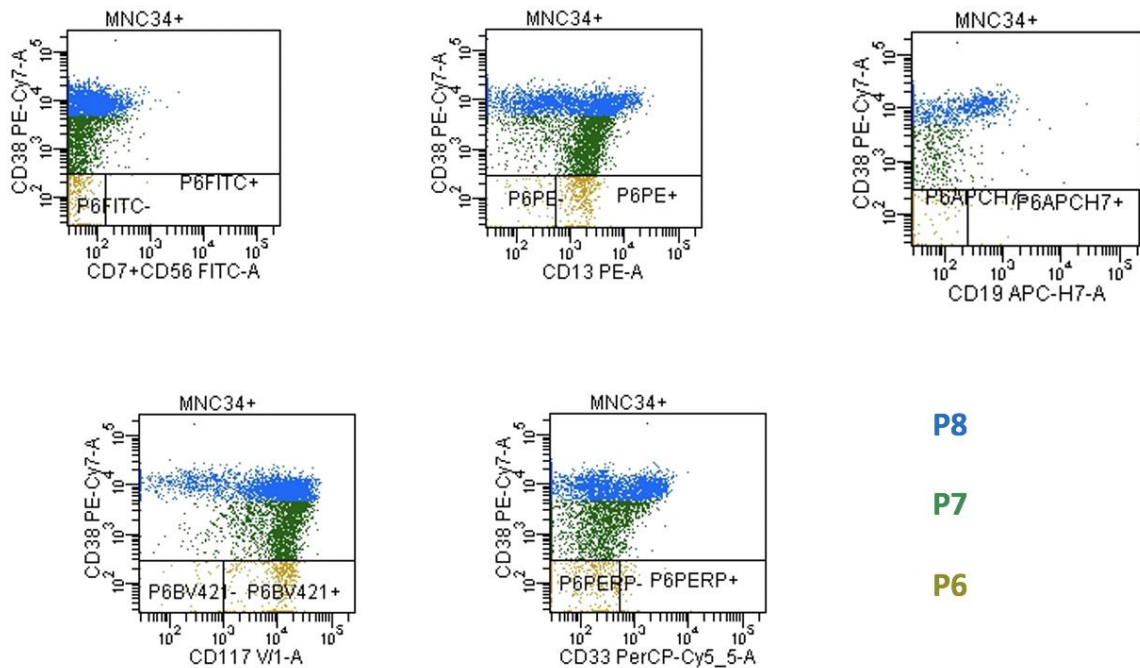


Figure 26 Visualisation du phénotype des populations P8 (bleu foncé), P7 (vert foncé) et P6 (jaune foncé) présentes dans la population MNC34+

Les événements obtenus après application de la booléenne d'identification LSC1 sont reportés sur des histogrammes bi-paramétriques intégrant les paramètres de structure, de taille et le CD45 afin de vérifier l'existence d'un cluster définissant l'intégrité de la population cellulaire [Figure 27].

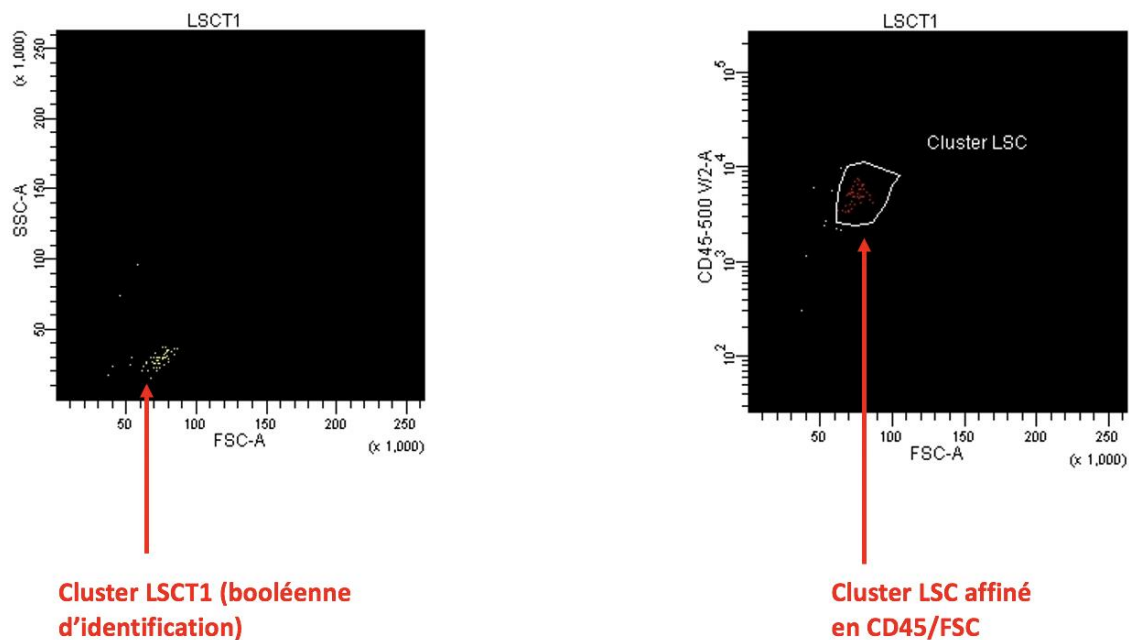


Figure 27 Vérification de l'existence d'un cluster pour la population résultant de la booléenne d'identification LSCT1

Le pourcentage de LSC dans le tube 1 nommé LSCT1 sera rendu sur le total des « BL34+/-117+/- » au diagnostic et sur le total des cellules nucléées CD45+ au suivi. La présence du CD33, CD7 ou CD19 sur une cellule immature du compartiment P6 est considérée comme une aberration phénotypique classant la cellule en LSC.

d. Approche LSC dans le tube LSC2

Le tube LSC2 est plus prompt à identifier les cellules souches leucémiques de par la présence de marqueurs spécifiques discriminant les phénotypes HSC et LSC. Ainsi, dans ce travail de thèse, nous analyserons le compartiment souche principalement via les données récupérées de ce deuxième tube.

Dans le tube LSC2, le seuil entre les populations P6 et P7 est reporté à la même valeur d'intensité du CD38 que celle déterminée dans le tube LSC1 afin de s'assurer de la reproductibilité de la sélection du compartiment souche entre ces deux tubes.

Il en va de même pour la sélection de la population « MNC34+ », population sur laquelle est étudié le compartiment souche.

Une fois le fenêtrage initial commun au tube LSC1 effectué sur le tube LSC2, la recherche des LSC s'effectue grâce à l'utilisation d'une booléenne d'identification LSCT2mix conditionnée sur la population P6.

Booléenne d'identification LSCT2mix = CD123+ OR CD45RA+ OR MIX+

Le placement des fenêtres sélectionnant les populations cellulaires positives pour les marqueurs présents dans le tube LSC2 est déterminé visuellement sur les histogrammes bi-paramétriques. Les fenêtres sont placées à la fin de la population CD45- correspondant aux érythroblastes, population négative pour ces marqueurs [Figure 28].

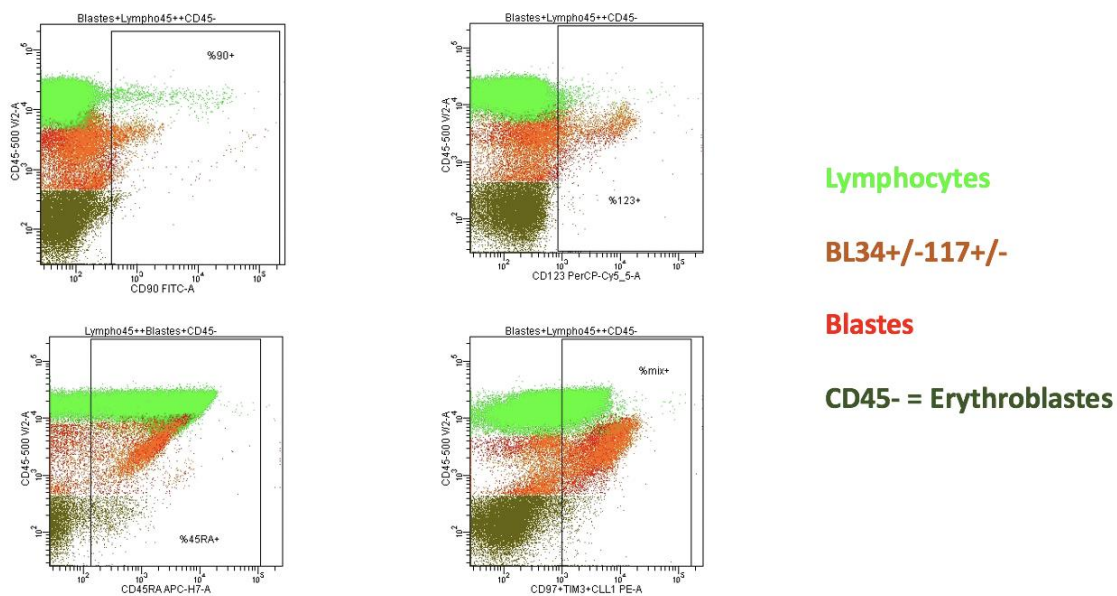


Figure 28 Histogrammes bi-paramétriques conditionnés sur les populations « Blastés », « Lympho45+ » et « CD45- » permettant la détermination des seuils de positivité des marqueurs du tube LSC2

De gauche à droite et de haut en bas : CD90, CD123, CD45RA, MIX (CD97/TIM-3/CLL1).

De façon similaire au tube LSC1, une vérification de présence de cluster pour le résultat de la booléenne est effectuée afin de s'affranchir au maximum du bruit de fond [Figure 29].

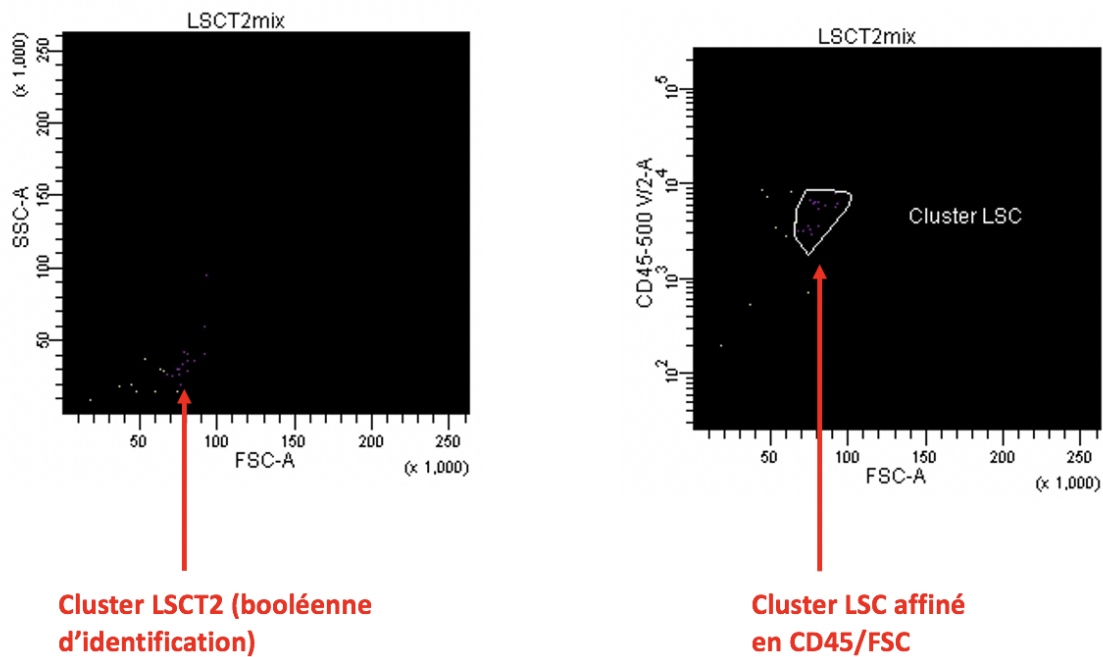


Figure 29 Vérification de l'existence d'un cluster pour la population résultant de la booléenne d'identification LSCT2mix

Le pourcentage de LSC dans le tube 2 nommé LSCT2mix sera rendu sur le pourcentage de « BL34+/-117+/- » au diagnostic et sur le total des cellules nucléées CD45+ au suivi. La positivité d'une cellule en P6 pour l'un des trois marqueurs de la booléenne LSCT2mix suffit à la classer en LSC.

L'ensemble de la stratégie d'analyse pour les tubes LSC1 et LSC2 a été suivie aussi bien pour l'analyse des moelles témoins que les diagnostics des LAM.

e. Stratégie de « gating » au suivi des patients atteints de LAM

Lors des points de suivi en MRD, le masque ainsi que le positionnement des différentes fenêtres ont été enregistrés au diagnostic pour chaque patient afin de les superposer informatiquement sur leurs échantillons de suivis respectifs.

Si cela le nécessitait, les positionnements des différentes fenêtres « Granuleux », « Blastés », « Monocytes » et « LymphoCD45+ » ont pu être ajustés. Les fenêtres déterminant les seuils de positivité des marqueurs d'intérêt n'ont quant à elles jamais été modifiées.

f. Moelles osseuses des patients témoins

Le marquage des cellules nucléées par le panel LSC des moelles de patients témoins non atteints de LAM permet la détermination de l'expression de CD7/CD56 considérée ici comme physiologique par les blastes sains. Ainsi, un seuil de positivité pour étudier *in fine* la MRD pour les blastes présentant cette aberration phénotypique au diagnostic de LAM peut être déterminé et sera détaillé dans la partie « RESULTATS ».

De plus, la détermination de la présence potentielle de cellules au phénotype LSC obtenues après application des booléennes d'identification de la stratégie d'analyse appliquée sur les moelles témoins permet la création d'un seuil LSC comme indicateur de comparaison avec les patients malades.

RESULTATS

I. Patients

1. Patients témoins

Un total de 15 échantillons de moelle osseuse issus de patients considérés comme témoins a été techniqué et analysé ainsi qu'une moelle osseuse témoin issue d'un contrôle externe de la qualité (MO témoin n°16) du groupe MRD CMF LAM LSC.

Le [Tableau 8] résume les indications du myélogramme pour chacun des 15 patients sélectionnés et peuvent être réparties en cinq catégories classées par ordre de pertinence :

- Exploration d'une thrombopénie isolée dont l'analyse cytologique a révélé une origine périphérique de l'anomalie ou bilan d'hyperéosinophilie : moelle considérée comme exempte de toute anomalie à priori de la cellule souche hématopoïétique
- Bilan d'extension de lymphome dont l'examen cytologique de la moelle n'a pas révélé d'infiltration massive lymphomateuse
- Exploration d'un pic monoclonal à l'électrophorèse des protéines dont l'examen cytologique de la moelle n'a pas révélé de maladie de Waldenström ou d'infiltration plasmocytaire classant le patient en stade myélome
- Exploration de cytopénies chroniques (hors thrombopénie isolée) dont l'analyse cytologique de la moelle n'a pas mis en évidence d'anomalies qualitatives majeures classant le patient en syndrome myélodysplasique
- Moelle de rémission de patient atteint de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL)

A posteriori, nous avons vérifié que les cytopénies chroniques pour lesquelles l'examen du myélogramme n'a révélé aucune anomalie au moment de l'exploration s'étaient résolues lors d'un hémogramme de contrôle ou avaient été étiquetées secondaires à des étiologies périphériques. Ainsi, la neutropénie chronique du patient témoin n°12 est secondaire à une cause auto-immune, l'anémie aiguë du patient témoin n°13 est secondaire à un ulcère gastro-duodéal et les cytopénies du patient témoin n°14 se sont résolues suite à la correction d'un syndrome inflammatoire.

Cependant, il est à noter que pour le patient n°11, le syndrome d'Evans sera retenu sous réserve de l'absence d'anomalie cytologique et caryotypique d'un

myélogramme réitéré ultérieurement compte-tenu de la part d'hémodilution probable du prélèvement initial.

Concernant le patient témoin n°3, la cause retenue de l'hyperéosinophilie (s'étant avérée transitoire) est une dermatose para-néoplasique (cancer bronchique).

Tableau 8 Indication du myélogramme et aspect cytologique et phénotypique des moelles osseuses des patients témoins

MO témoins	Âge	Indication du myélogramme	Conclusion cytologique et /ou CMF
1	47	Exploration d'une thrombopénie isolée	Thrombopénie d'origine périphérique
2	78	Exploration d'une thrombopénie isolée	Thrombopénie d'origine périphérique
3	52	Hyperéosinophilie	Excès modéré de la lignée éosinophile
4	78	Suspicion d'atteinte neurologique du nerf sciatique par un lymphome	Absence d'anomalie
5	69	Bilan d'extension d'un lymphome du manteau	Absence d'anomalie notable
6	80	Pic IgM kappa à 8 g/L	26% de lymphocytes dont 60% de B clonaux soit 15,6% des cellules nucléées totales de type LMNH CD5-/CD10-
7	73	Gammapathie monoclonale IgA lambda	0,2% plasmocytes totaux et 0,06% de plasmocytes clonaux
8	44	Suspicion de myélome multiple	Absence d'anomalie notable
9	64	Gammapathie de signification indéterminée depuis 10 ans	1,7% plasmocytes totaux dont 71% plasmocytes clonaux soit 1,2% des cellules nucléées totales
10	66	Suspicion de myélome multiple	Absence d'anomalie notable
11	14	Suspicion de syndrome d'Evans (Thrombopénie et neutropénie modérées)	Absence de dysplasie et d'excès de blastes Probable part d'hémodilution (34% de lymphocytes, 5 mégacaryocytes)
12	28	Exploration d'une neutropénie chronique	Absence d'anomalie notable
13	89	Anémie aiguë d'étiologie inconnue	23% de lymphocytes, dysérythropoïèse marquée (plus de 50% des éléments) mais régénération médullaire probable
14	72	Bilan de bi-cytopénie (thrombopénie et anémie)	Dysmégacaryopoïèse modérée et signes d'activation macrophagique sans hémophagocytose, contexte inflammatoire probable
15	45	MRD n°3 de LAL B-II	Absence d'anomalie notable

L'âge médian des patients retenus pour leurs moelles témoins est de 66 ans (14 – 89 ans).

2. Patients au diagnostic de leucémie aiguë myéloïde

Dans ce travail exploratoire du panel LSC, 8 patients au diagnostic confirmé de LAM ont été techniqués et analysés sur le panel LSC en parallèle du panel LA. Parmi ces patients étaient présentes une LAM secondaire à un SMD, une LAM1, quatre LAM2 (dont une avec dysplasie multi-lignée), une LAM4 avec composante éosinophile, selon l'ancienne classification FAB.

Un patient au diagnostic de SMD-EB-2 ou LAM6 de l'ancienne classification FAB et un patient au diagnostic de leucémie aiguë indifférenciée ont été également inclus au diagnostic pour l'évaluation de l'approche LSC exclusivement.

L'âge médian des patients inclus au diagnostic de LA est de 61,5 ans (18 – 84 ans).

Le [Tableau 9] présente les caractéristiques cytologiques, phénotypiques, caryotypiques, moléculaires et le traitement initial des patients au diagnostic de leucémie aiguë.

Excepté pour le patient n°2 qui présente une moelle osseuse partiellement hémodiluée dans le tube EDTA fourni pour l'analyse phénotypique en CMF, le pourcentage de blastes déterminé en CMF en routine sur le panel LA est concordant avec celui retrouvé lors de l'analyse cytologique des frottis médullaires pour chaque patient.

A noter que pour le patient n°5, très peu de cellules ont été acquises par le cytomètre étant donné la pauvreté de sa moelle osseuse. Cependant, compte-tenu de son infiltration blastique médullaire importante au diagnostic, ce dernier a tout de même été inclus.

Tableau 9 Caractéristiques des LA des patients au diagnostic

Pts	Âge	% blastes CMF *	LA	Phénotype	Cytogénétique	BM	Thérapeutique
1	70	76	LAM secondaire à SMD de type MLD	34+/117+/38+/33+p/HLADR+pf/13+/MPO- Sous clone minoritaire 56+ (6% des cellules blastiques soit 4,5% des cellules nucléées totales)	Caryotype normal	Sur-expression <i>WT1</i> à 1,98% (seuil de positivité à 1%) <i>NPM1/FLT3</i> sauvages	Protocole ALFA 1200
2	59	17 (partiellement hémodilué)	LAM2 avec dysplasie multilignée	34+/117+/38+/33+p/HLADR+/13+/MPO+/TDT+	Tétraploïdie et délétion 7q	<i>NPM1/FLT3</i> sauvages Absence de sur-expression <i>WT1</i>	Protocole BIG-1
3	18	19	LAM4 avec discrète composante éosinophile	34-/117+/38+/33+F/HLADR+/13+/MPO+ Sous-clone minoritaire 34+/38- : 5% des cellules nucléées totales Monocytes: HLADR+/13+/33+/15+/64+/11c+/36+/14+p/MPO+	Caryotype normal	<i>FLT3</i> low et <i>NPM1</i> mutés Sur-expression <i>WT1</i> à 112%	Protocole BIG-1
4	22	77	LAM1 (composante éosinophile)	34+f/HLADR+/117+/33+/38+/15+p/65+p/ 7+F /MPO+ Sous clone minoritaire: 17% des blastes sont 36+	Trisomie 21	<i>FLT3/NMP1</i> sauvages Absence de sur-expression de <i>WT1</i> <i>CEBPA</i> muté mono-allélique	Protocole BIG-1
5	64	45 (prélèvement pauvre contrairement à celui de la cytologie, 10 000 cellules nucléées analysées)	LAM2	34+/HLADR+pf/117+/33+F/13+/38+pf/MPO+/15+p	Caryotype complexe: LAM-MRC	<i>FLT3/NMP1</i> sauvages Sur-expression <i>WT1</i> à 23,4%	VYXEOS®
6	74	74	LA Indifférenciée	34+/HLADR+/38+/TdT+/13+/117-/MPO-	Clone tétraploïde à 92 chromosome	Mutation <i>IDH2</i> , mutation <i>RUNX1</i> Sur-expression <i>WT1</i> à 7,7% <i>FLT3/NMP1</i> sauvages	Induction 3+7
7	70	27	LAM MPO négative avec maturation	34+/HLA-DR+f/117+/13+/33+MPO-/38-	Caryotype normal	<i>FLT3/NMP1</i> sauvages Sur-expression <i>WT1</i> à 1,4% NGS Myéloïde: variant exon 1 <i>SRSF2</i> (VAF 7,7%)	VIDAZA® /VENETOCLAX®
8	84	9	SMD-EB2 (OMS 2016) ou LAM6 avec dysplasie multilignée	34+/HLADR+/117+/33+/38+p/MPO+f(11%)/ 56+p/7+p/5+p (5% proérythroblastes)	Clone hypodiploïde: monosomie 7, délétion 5q, délétion TP53	Non réalisée	Antécédent de 17 cures de VIDAZA®
9	39	48	LAM2	34+/HLADR+pf/117+/33+f/13+/38+/MPO+/15+/TDT+p/19+f Sous-clone correspondant à 25% des blastes : 56+F	Perte du chromosome X et translocation t(8;21)	Sur-expression <i>WT1</i> à 43,9% Transcrit de fusion <i>RUNX1/RUNX1T1</i> <i>NPM1/FLT3</i> sauvages	Induction 3+7
10	21	51	LAM2	34+/HLADR+/117+/33+f/13+/38-/MPO+/15+/65+/19+f/4+f/ 56+F	Translocation t(8;21), monosomie X, délétion bras long du K9	Sur-expression <i>WT1</i> à 84% Transcrit de fusion <i>RUNX1/RUNX1T1</i> <i>NPM1/FLT3</i> sauvages	Induction 3+7

* évalué par le panel LA au diagnostic. Pts : patient ; f : faiblement ; p : partiellement ; F : fortement ; BM : biologie moléculaire ; VAF : *Variant Allele Frequency*. Les LAIP pouvant être sélectionnés pour le suivi de la MRD avec le panel LSC apparaissent en rouge.

3. Patients au suivi de leucémie aiguë myéloïde

Parmi les 8 patients pour lesquels une LAM a été diagnostiquée, 7 ont bénéficié d'au moins un point de suivi. Pour cette étude, les patients n°3 et n°4 ont bénéficié de tous les points de suivi de MRD dans le protocole BIG-1, respectivement jusqu'à la post-consolidation n°3 et au J60 post-allogreffe. Les patients n°1 et n°6 sont décédés

après échec de l'induction. Les patients n°7 et n°8 n'ont pas eu de prélèvements médullaires de suivi pendant la période d'essais.

Le patient n°3 a rechuté après un troisième cycle de consolidation dans le protocole BIG-1.

II. Approche LAIP/DfN :

1. Détermination du seuil pour une MRD positive sur le LAIP CD7/CD56

Le seuil de positivité pour les marqueurs CD7/CD56 est délicat. Nous avons essayé de le déterminer de façon standardisée en séparant les cellules positives et négatives à l'aide des lymphocytes B (population négative de référence pour le CD7/CD56) en utilisant les paramètres d'intensité de fluorescence. Cependant, cet essai n'a pas été concluant compte-tenu, d'une part, de la faible discrimination visuelle entre les lymphocytes T/NK (CD7+/CD56+) et les lymphocytes B (CD7-). D'autre part, les médianes d'intensité de fluorescence (MFI) pour les lymphocytes T pour le CD7/CD56 n'atteignaient pas le double de l'intensité de fluorescence des lymphocytes B. De ce fait, le placement de cette fenêtre s'est effectué principalement à l'aide de l'auto-fluorescence des blastes comme décrit précédemment dans la partie « Matériel et Méthode ».

Pour l'évaluation du tube LSC1 applicable pour l'approche LAIP/DfN, une détermination d'un seuil de positivité pour le CD7/CD56 en tant que LAIP a été réalisée à partir de l'ensemble des moelles témoins. En effet, chez des patients exempts de LAM, il est possible de mettre en évidence une très faible proportion de cellules blastiques exprimant du CD7 ou du CD56 de façon physiologique. Cette étude permet également de nous affranchir du bruit de fond correspondant au marquage éventuellement aspécifique de certaines cellules pour le CD7/CD56. Ce seuil a permis par la suite de déterminer la positivité, si elle existe, des cellules leucémiques des patients atteints de LAM pour ce marqueur LAIP en maladie résiduelle.

Le nombre d'événements pour le CD7/CD56 a été obtenu par la booléenne d'intersection des 10 fenêtres LAIP du masque d'analyse présentée en stratégie de

« gating » dans la partie précédente. Ce nombre d'événements est conditionné sur les BL34+/-117+/- [Tableau 10].

Tableau 10 Détermination du seuil de positivité du CD7/CD56 à partir des moelles osseuses des patients témoins

MO témoins	Nombres de WBC CD45+	Nb événements MRD LAIP CD7/CD56	MRD LAIP T1 (CD45+)
1	331479	339	1,02E-01
2	303827	281	9,25E-02
3	531601	114	2,14E-02
4	373813	421	1,13E-01
5	389023	635	1,63E-01
6	330627	323	9,77E-02
7	498187	27	5,42E-03
8	116642	37	3,17E-02
9	480723	234	4,87E-02
10	165179	57	3,45E-02
11	278681	14	5,02E-03
12	251680	96	3,81E-02
13	329701	129	3,91E-02
14	408004	163	4,00E-02
15	348855	832	2,38E-01
16	296576	29	9,78E-03
MOYENNE			6,75E-02
Ecart-type			6,41E-02
Seuils (moyenne + 2s)			1,96E-01

* WBC = White Blood Cells, Nb = nombres

Par cette approche, nous obtenons un seuil de positivité égal à **1,96.10⁻¹** correspondant à la moyenne additionnée de deux écarts-type du pourcentage de CD7/CD56 parmi l'ensemble des cellules CD45+ après analyse sur Ficoll ®. Ce seuil a été appliqué par la suite pour déterminer la MRD des patients pour le LAIP CD7/CD56 au suivi (méthode Ficoll ®).

2. Approche LAIP/DfN au diagnostic de LAM

a. Détermination des LAIP CD7/CD56

Les LAIP ont été recherchés au diagnostic des patients inclus dans l'étude notamment pour le CD7/CD56. Un patient était considéré comme positif pour un LAIP dès lors que la positivité de cette aberration représentait au minimum 10% des blastes définis par le phénotype CD34+/-CD117+/- . Les sous-clones minoritaires bien

« clusterisés » présentant des aberrations phénotypiques ont été également recherchés.

Grâce à la comparaison avec le phénotype initialement rendu par l'examen de routine effectué pour le diagnostic des LA au CHU de Caen, nous avons pu distinguer les patients positifs CD7 ou CD56 étant donné que ces marqueurs sont indépendants sur le panel LA.

Parmi les 10 patients ayant bénéficié d'un immunophénotypage au diagnostic, 5 patients présentent une positivité pour le LAIP CD7/CD56 mais un patient n'atteint pas le seuil de 10% (patient n°1 : 6% des blastes totaux). Par ailleurs, le patient n°8 (SMD-EB-2) ne présente qu'une positivité partielle du CD7 et du CD56 sans distinction franche de sous-clone ; il n'a donc pas été retenu pour le suivi. Nous détectons pour le patient n°9, un sous-clone CD56+ (25% des blastes totaux) lors de l'examen en routine initial que nous nous attacherons à suivre. Les blastes du patient n°4 sont majoritairement CD7+ (83,2% des blastes totaux) et ceux du patient n°10 sont CD56+ (65% des blastes totaux). Le **[Tableau 11]** présente les résultats de la détermination du LAIP CD7/CD56 au diagnostic sur le panel LSC (tube LSC1).

La positivité du CD19 comme LAIP n'a pas été retenue dans cette étude et sera discutée par la suite dans ce travail.

Tableau 11 Détermination du LAIP CD7/CD56 au diagnostic sur le tube LSC1 du panel LSC

Pts	FAB	Phénotype	WBC45+ T1	Blastes 34+/-/117+/- T1	Evénements LAIP CD7/CD56 T1	LAIP CD7/CD56 (% des WBC 45+)	LAIP CD7/CD56 retenu
1	LAM secondaire à SMD	34+/117+/38+/33+p/HLADR+pf/13+/- MPO- Sous clone minoritaire 56+ (6% des cellules blastiques soit 4,5% des cellules nucléées totales)	199740	146524	5356	2,681	OUI pour un sous-clone bien différencié
2	LAM 2 avec dysplasie multilignée	34+/117+/38+/33+p/HLADR+/13+/- MPO+/TdT+	266121	97150	288	0,108	NON
3	LAM 4 avec discrète composante éosinophile	34-/117+/38+/33+f/HLADR+/13+/MPO+ Monocytes: HLADR+/13+/33+/15+/64+/11c+/36+/ 14+p/MPO+	310573	66451	7844	2,526	NON
4	LAM1 (composante éosinophile)	34+f/HLADR+/117+/33+/38+/ 15+p/65+p/ 7+f /MPO+ Sous clone minoritaire: 17% des blastes sont 36+	514661	408154	330027	64,125	OUI
5	LAM 2	34+/HLADR+pf/117+/33+f/13+/- 38+p/HLADR+/15+p	8042	2951	132	1,641	NON
6	LA Indifférenciée	34+/HLADR+/38+/TdT+/13/117-/MPO-	434858	345622	424	0,098	NON
7	LAM MPO négative avec maturation	34+/HLA-DR+f/117+/13+/33+ MPO-/38-	82928	25387	650	0,784	NON
8	SMD-EB2 ou LAM6 avec dysplasie multilignée	34+/HLADR+/117+/33+/38+p/ MPO+f(11%)/ 56+p/7+p/5+p (5% proérythroblastes)	352667	60496	29329	8,316	NON
9	LAM 2	34+/HLADR+pf/117+/33+f/13+/38+/- MPO+/15+/TdT+pf/19+f Sous-clone correspondant à 25% des blastes : 56+f	406781	126194	31668	7,785	OUI pour un sous-clone bien différencié
10	LAM 2	34+/HLADR+/117+/33+f/13+/38- /MPO+/15+/65+/19+f/4+f/ 56+f	177737	91306	51693	29,084	OUI

Pts : Patients ; f : faiblement ; p : partiellement ; F : fortement ; T1 : Tube LSC1 ; WBC : White Blood Cells

Les LAIP pouvant être sélectionnés pour le suivi de la MRD avec le panel LSC apparaissent en rouge.

b. Illustration d'un patient positif au diagnostic pour le LAIP CD7/CD56

Le patient n°4 présente au diagnostic un LAIP CD7/CD56 évalué à 83,2 % des blastes soit 64,1% des cellules totales nucléées CD45+ par le panel LSC (infiltration blastique estimée à 77% des cellules nucléées totales). Les histogrammes présentés pour cet exemple, sont issus de la moelle de diagnostic par méthode Ficoll®.

Après sélection des différentes populations leucocytaires sur un histogramme SSC/CD45, le fenêtrage des différents marqueurs du tube LSC1 s'est effectué selon la stratégie d'analyse explicitée précédemment [Figure 30].

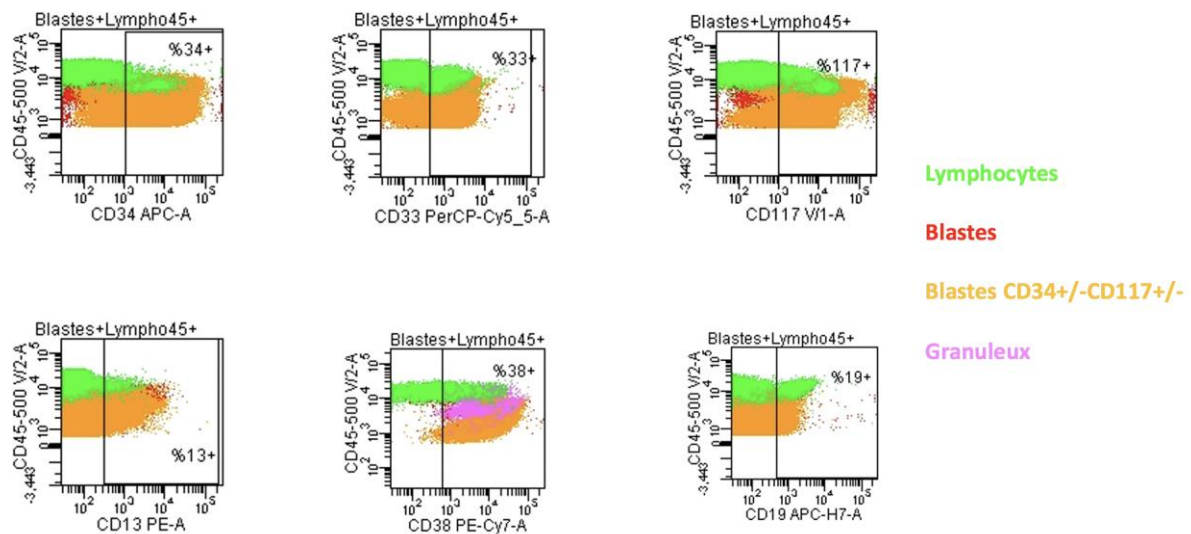


Figure 30 Histogrammes bi-paramétriques conditionnés sur les populations « Blastos » et « Lympho45+ » permettant la détermination des seuils de positivité au diagnostic de LAM pour le patient n°4 au diagnostic.

De gauche à droite et de haut en bas : Expression des marqueurs CD34, CD33, CD117, CD13, CD38 et CD19 par rapport au CD45.

Le fenêtrage du CD7/CD56 effectué à l'aide de la population lymphocytaire CD45+ et ajusté sur le l'auto-fluorescence des blastos est un point critique de la détermination de la population LAIP positive [Figure 31].

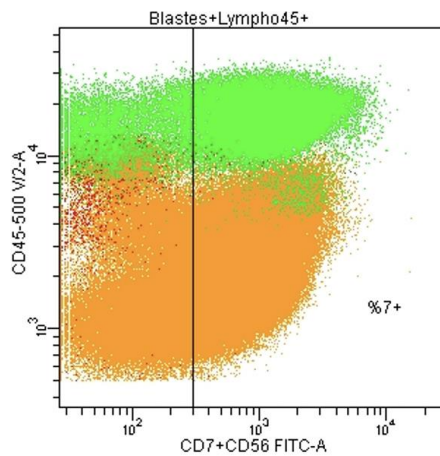


Figure 31 Fenêtrage du CD7/CD56 pour le patient n°4 au diagnostic

La sélection de la population MNC34+ [Figure 32 – A)] permet d’affiner par la suite la sélection de la population blastique BL34+/-117+/- [Figure 32 – B)].

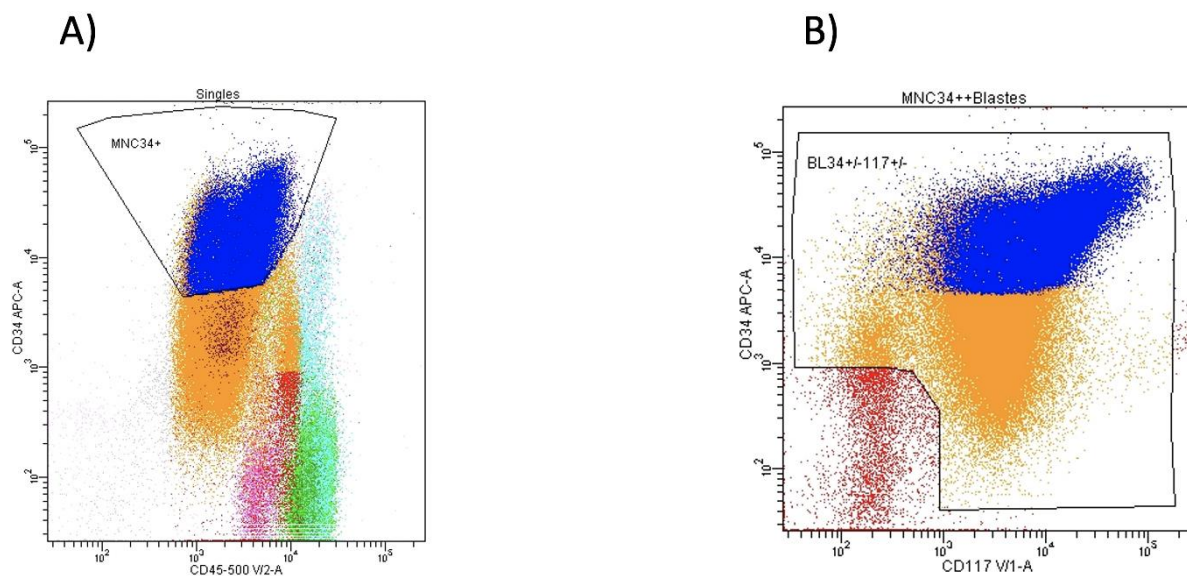


Figure 32 Sélection des populations blastiques (patient n°4)

A) Sélection de la population MNC34+. B) Sélection de la population BL34+/-117+/-.

Le positionnement des fenêtres LAIP 1 à 10 montre visuellement une proportion importante de cellules blastiques positives pour le LAIP CD7/CD56 au diagnostic [Figure 33].

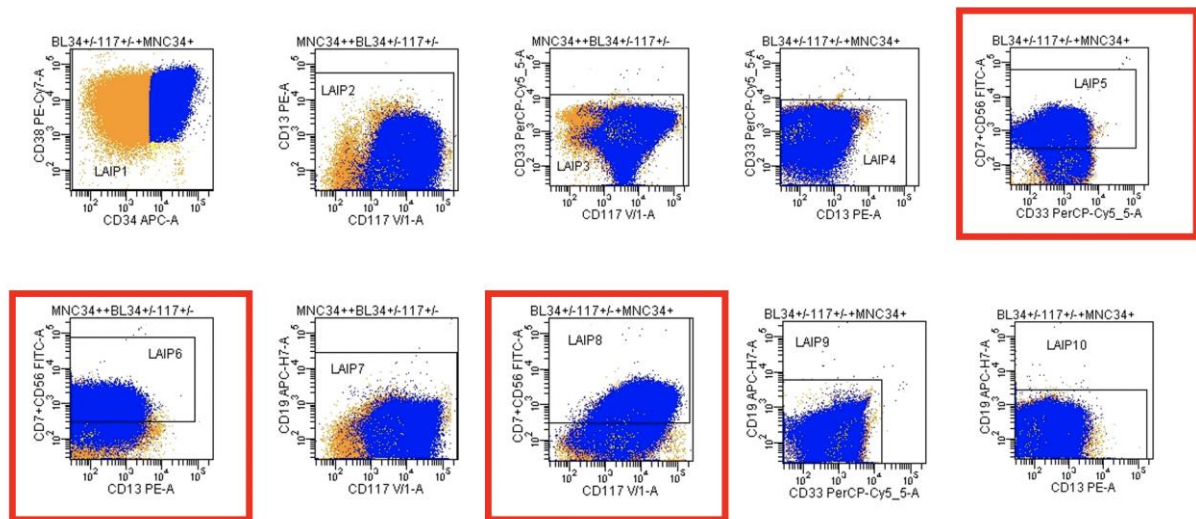


Figure 33 Fenêtrage LAIP 1 à 10 pour le patient n°4 au diagnostic

Les encadrés rouges mettent en avant les histogrammes bi-paramétriques illustrant la sélection de la population blastique positive pour le CD7/CD56.

La « clusterisation » de la population MRD LAIP correspondant au nombre d'événements obtenu par la booléenne d'identification intersectant les 10 fenêtres LAIP est vérifiée [Figure 34 – B]. Le cluster est superposable à l'emplacement de la fenêtre Blastos [Figure 34 – A] définie initialement et valide la spécificité de notre analyse.

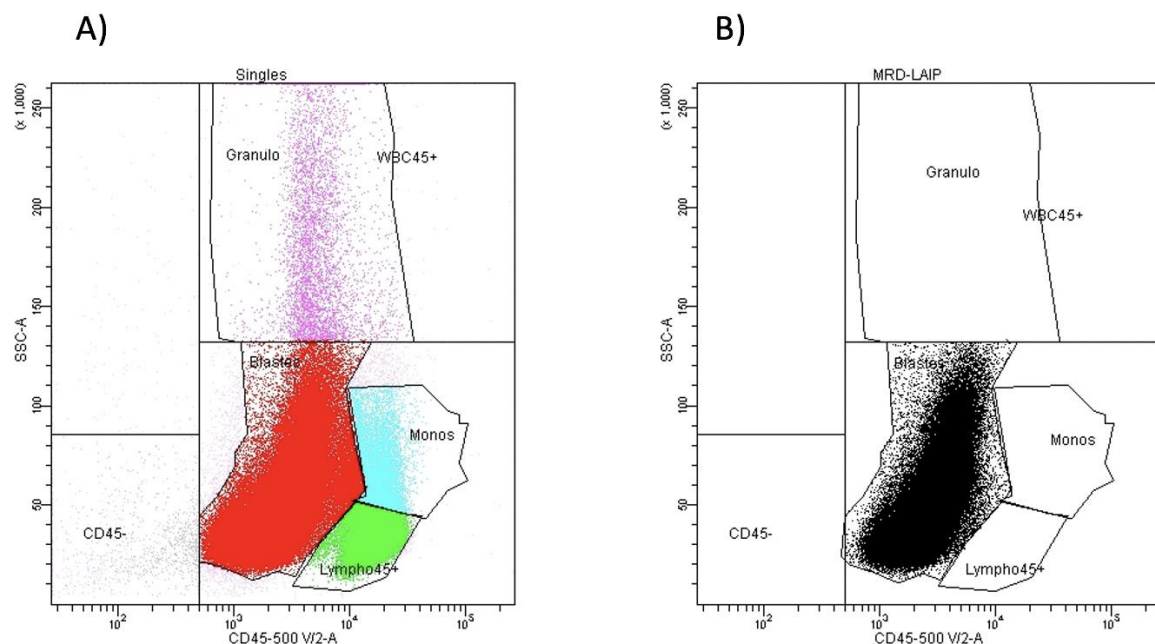


Figure 34 Contrôle de la « clusterisation » de la population MRD LAIP

A) Fenêtrage des différentes populations leucocytaires en SSC/CD45. B) Retro-gating de la population MRD-LAIP obtenue par la booléenne d'intersection des 10 fenêtres LAIP

3. Approche LAIP/DfN au suivi

Les patients pour lesquels un LAIP CD7/CD56 a été mis en évidence au diagnostic ont été étudiés lors des différents points de suivi thérapeutiques.

Le patient n°4, qui ne présente pas de marqueurs de biologie moléculaire exploitable pour le suivi de la MRD, a été suivi en CMF sur son LAIP CD7/CD56 exclusivement [Tableau 12]. Dès le point de suivi post-induction et ce jusqu'au J60 post-allogreffe, le patient n°4 est considéré comme ayant une MRD indétectable. Le pourcentage de MRD LAIP est inférieur au seuil défini sur nos moelles témoins pour le LAIP CD7/CD56 ($< 1,96.10^{-1} \%$).

Tableau 12 Suivi de la MRD du patient n°4 sur le LAIP CD7/CD56 (méthode Ficoll ®)

Points de suivi MRD du patient n°4	Nb WBC CD45+	% MRD LAIP
Diagnostic	514661	64,13
Post-induction (MRD1)	447491	0,08
Post-consolidation n°1 (MRD2)	381376	0,13
Post-consolidation n°2 (MRD3)	378384	0,12
Post-allogreffe (J25, MRD4)	324662	0,04
Post-allogreffe (J60, MRD5)	541561	0,04

Le LAIP CD7/CD56 au diagnostic et en MRD est rendu en pourcentage des cellules nucléées totales CD45+. Nb : nombre ; WBC : White Blood Cells

Seuil de positivité LAIP CD7/CD56 = $1,96.10^{-1}$

Afin d'obtenir le pourcentage final de MRD LAIP pour chacun des patients, des vérifications de clusters nous permettent de valider la spécificité de notre MRD selon notre stratégie d'analyse [Figure 35].

A noter que le pourcentage de blastes présentant un LAIP CD7/CD56 sur l'ensemble des cellules nucléées CD45+ est plus faible post-allogreffe. L'approche DfN réalisée pour ce patient lors des points de suivi sur le panel LSC n'a pas mis en évidence de modulations phénotypiques sur les cellules blastiques résiduelles.

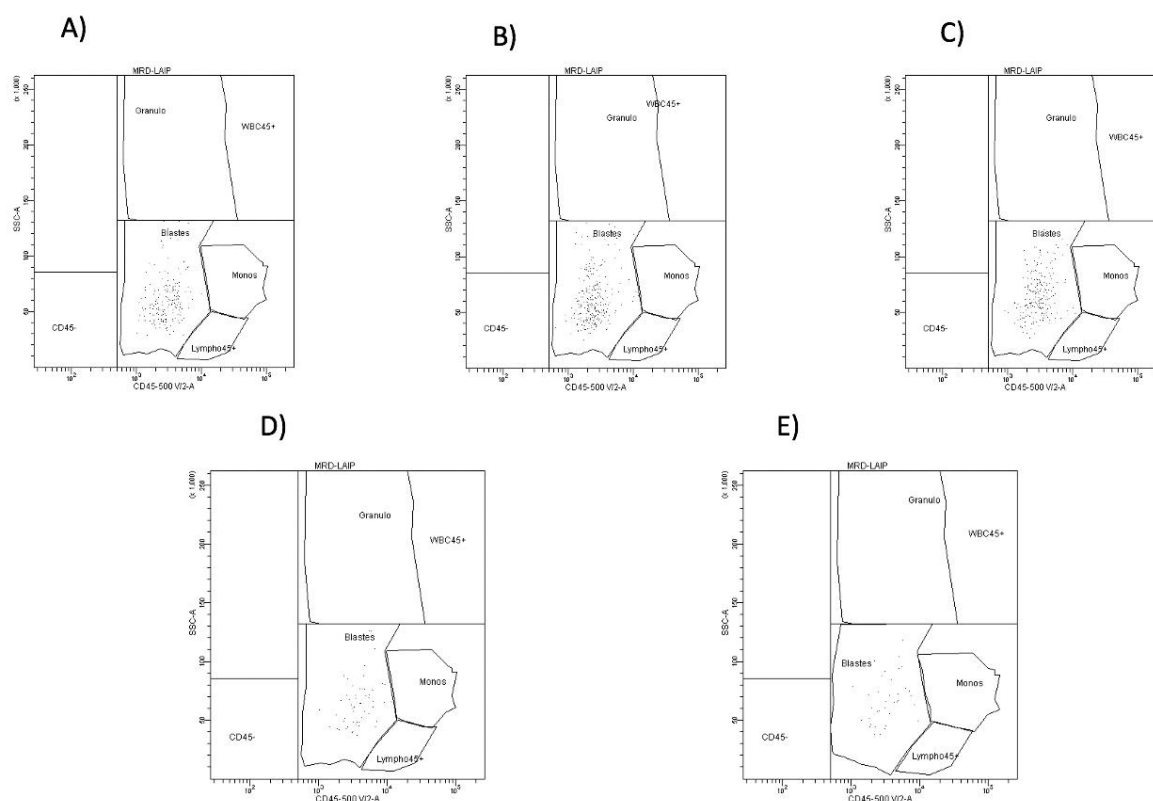


Figure 35 Rétro-gating du nombre d'événements récupérés par la booléenne d'intersection des fenêtres LAIP 1 à 10 sur le LAIP CD7/CD56 pour le patient n°4 lors des différents points de suivi

A) MRD post-induction. B) MRD post-consolidation n°1. C) MRD post-consolidation n°2. D) MRD J25 post-allogreffe. E) MRD J60 post-allogreffe.

Les patients n°9 et n°10 ont également présenté une MRD indétectable dès le premier point de suivi post-induction sur le panel LSC, avec des images similaires [Tableau 13].

Tableau 13 MRD des patients suivis sur le LAIP CD7/CD56 (méthode Ficoll ®)

Pts	Diagnostic	MRD1	MRD2	MRD3	J25 Post-allogreffe	J60 Post-allogreffe
4	64,13 (514661)	0,08 (447491)	0,13 (381376)	0,12 (378384)	0,04 (324652)	0,04 (541561)
9	7,79 (406781)	0,01 (463518)	Non réalisé en panel LSC	/	/	/
10	29,08 (177737)	0,11 (342982)	0,04 (438104)	/	/	/

MRD1 : Post-induction ; MRD2 : Post-consolidation n°1 ; MRD3: Post-consolidation n°2. ; Pts : patients. Le LAIP CD7/CD56 au diagnostic et en MRD sont exprimés en pourcentage des cellules nucléées CD45+. Apparaît entre parenthèse le nombre de cellules nucléées CD45+ pour chaque prélèvement médullaire.

4. Comparaison entre l'approche LAIP/DfN en méthode Ficoll® et l'approche LAIP/DfN en Lyse macrovolume

Compte-tenu de l'absence de détermination d'un seuil de positivité de CD7/CD56 pour une MRD positive sur des moelles témoins préparées en lyse macrovolume, la comparaison entre ces deux techniques (Ficoll® et Lyse macrovolume) est difficile. Cependant, l'ELN recommande un seuil de positivité à 0,1% des cellules nucléées totales CD45+ pour le rendu d'une MRD positive sur un LAIP choisi. Cette décision ayant reposé sur l'analyse des différentes études sur le sujet pour lesquelles les prélèvements médullaires ont été traités en lyse macrovolume, nous avons donc choisi de comparer nos deux techniques en utilisant notre seuil de positivité déterminé sur les MO témoins pour le traitement par Ficoll® et en utilisant le seuil de 0,1% pour ceux techniqués par lyse macrovolume.

Aucune discordance d'interprétation de la MRD pour les 3 patients suivis sur le LAIP CD7/CD56 n'a été mise en évidence entre les prélèvements médullaires techniqués par la méthode Ficoll® et ceux préparés en lyse macrovolume.

5. Approche LAIP/DfN à la rechute

Parmi les patients inclus présentant un LAIP CD7/CD56 et durant la période pendant laquelle ont été effectuées les explorations, il n'a pas été observé de rechute.

6. Approche LAIP panel LA Versus Approche LAIP panel LSC

Aucune discordance n'a été observée entre la stratégie d'analyse mise en place sur le tube LSC1 du panel LSC et la stratégie actuellement utilisée en routine au CHU de Caen sur le panel LA. Pour l'ensemble des points de MRD des 3 patients suivis sur le LAIP CD7/CD56, il n'a pas été détecté de cellules blastiques résiduelles anormales.

A noter que tous les patients concernés par cette approche LAIP étaient en rémission cytologique en post-induction et le sont restés durant la période de l'étude.

III. Approche LSC

1. Identification des HSC chez les patients témoins

Dans le compartiment CD34+/CD38-, des HSC ont pu être mises en évidence grâce au phénotype CD90+/CD45RA-. Cependant, malgré le faible nombre d'événements obtenus pour ces populations et compte-tenu de l'absence de « clusterisation » dans la majorité des cas, il semble aujourd'hui difficile d'affirmer avec certitude la détection spécifique de ces dernières chez nos patients témoins.

Cependant, la moelle témoin n°16 montre un exemple concret de « clusterisation » d'une population HSC ; ce qui laisse entrevoir de bons espoirs quant à la détection de ces populations très minoritaires [Figure 36].

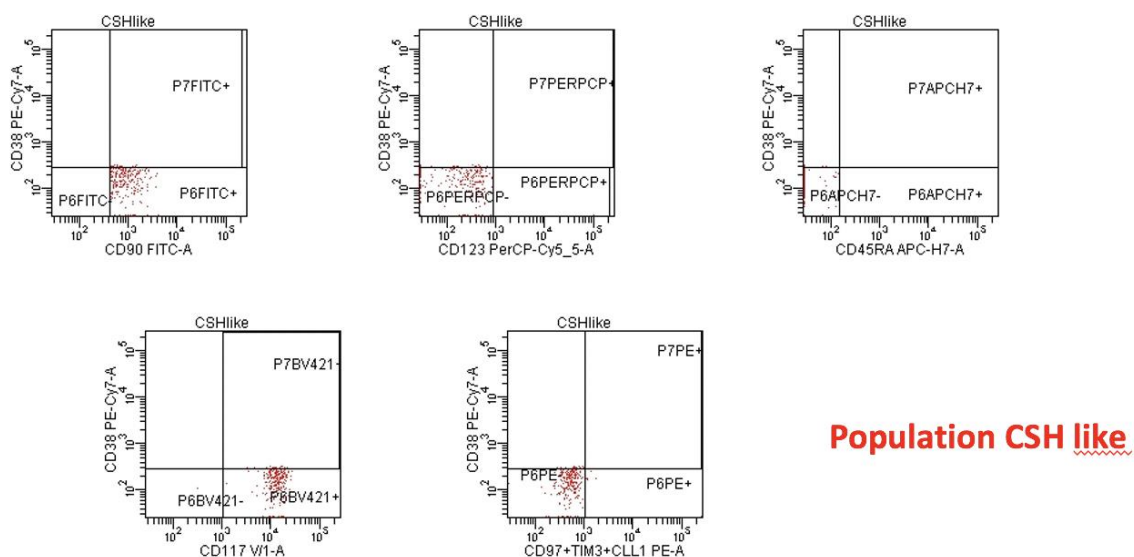


Figure 36 Histogrammes bi-paramétriques permettant la mise en évidence du phénotype CSH like

La population « CSH like » définie initialement dans P6 par le phénotype CD45RA-/CD90+ présente également une positivité pour le CD117 et une négativité pour le CD123 et le MIX (CD97/TIM-3/CLL1) (CQE DoN 2020).

La négativité des marqueurs MIX et du CD123 ainsi que la positivité forte de CD117 sont attendues sur une HSC saine.

2. Détermination du seuil de positivité définissant la présence de LSC chez les patients atteints de LAM au suivi

Nous nous sommes également intéressés à la question suivante : détecte-t-on, suivant la stratégie d'analyse appliquée, des cellules au phénotype LSC chez les patients témoins ?

Cette approche nous a permis de déterminer notre seuil de positivité pour la détection de LSC résiduelles chez les patients LAM au suivi. La détermination de la présence d'un phénotype LSC a été effectuée principalement sur le tube LSC2 compte-tenu de la présence des marqueurs explorant le compartiment CD34+/CD38- de façon plus spécifique par rapport au tube LSC1 [Tableau 14].

La MO témoin n°12 a été exclue pour cette détermination de seuil suite à un problème technique lors de l'acquisition du tube LSC2.

Tableau 14 Détermination du seuil de positivité de LSCT2mix à partir des moelles osseuses des patients témoins

MO témoins	Nombres de WBC CD45+	Nb événements LSCT2mix	LSCT2mix % (CD45+)
1	439669	54	1,23E-02
2	291724	38	1,30E-02
3	463918	2	4,31E-04
4	281023	29	1,03E-02
5	330254	21	6,36E-03
6	513741	42	8,18E-03
7	449670	72	1,60E-02
8	102881	7	6,80E-03
9	623703	12	1,92E-03
10	165179	0	0,00E+00
11	278681	1	3,59E-04
13	231945	12	5,17E-03
14	408004	17	4,17E-03
15	272716	43	1,58E-02
16	298169	15	5,03E-03
MOYENNE			7,06E-03
Ecart-type			5,43E-03
Seuils (moyenne + 2s)			1,79E-02

Les cellules retenues comme phénotype LSC sont exprimées en pourcentage des cellules nucléées totales CD45+.

WBC: White Blood Cells, Nb: Nombre

Par cette approche, nous obtenons un seuil de positivité égal à **1,79.10⁻²** correspondant à la moyenne additionnée de deux écarts-type du pourcentage de cellules au phénotype LSC retenues par la booléenne LSCT2mix parmi l'ensemble des cellules CD45+ après analyse sur Ficoll®.

Par ailleurs, aucune corrélation n'a pu être mise en évidence entre la quantification des LSC sur le tube LSC1 et le tube LSC2. Le nombre d'événements obtenus après application des booléennes étant très faible, nous concluons que le seuil déterminé à l'aide des moelles témoins correspond davantage à un bruit de fond plutôt qu'à une présence certaine de cellules au phénotype LSC. Les cellules retenues dans les booléennes LSCT1 et LSCT2mix ne forment jamais un cluster convaincant lorsque le « retro-gating » en SSC/CD45 est effectué.

3. Approche LSC au diagnostic des patients atteints de LAM

a. Résultats des booléennes d'identification LSCT1 et LSCT2mix au diagnostic

La recherche des LSC a été effectuée sur l'ensemble des patients au diagnostic de LAM selon l'approche LSCT1 et LSCT2mix [Tableau 15].

Tableau 15 Détermination de la présence de LSC au diagnostic de LAM selon l'approche LSCT1 et LSCT2mix

Pts	Classification LAM	LSCT1 % WBC45+	LSCT1 % Blastés*	LSCT2mix % WBC45+	LSCT2mix % Blastés*	LSC +
1	LAM secondaire à SMD	0,009	0,012	0,039	0,054	NON
2	LAM2 avec dysplasie multilignée	0,005	0,012	0,024	0,068	NON
3	LAM4 avec discrète composante éosinophile	1,398	6,533	1,075	5,102	OUI
4	LAM1 (composante éosinophile)	0,016	0,02	0,019	0,024	NON
5	LAM2	3,830	10,437	2,766	8,418	OUI
6	LA Indifférenciée	0,006	0,007	0,129	0,161	OUI
7	LAM MPO négative avec maturation	1,283	4,191	0,484	1,606	OUI
8	SMD-EB2 ou LAM6 avec dysplasie multilignée	1,686	9,829	1,046	5,608	OUI
9	LAM2	0,042	0,136	0,101	0,322	OUI
10	LAM2	12,028	23,414	15,627	30,911	OUI

LSCT1 % Blastés*: pourcentage de LSCT1 parmi les « BL34+/-117+/- » ; LSCT2mix % Blastés* : pourcentage de LSCT2mix parmi les « BL34+/-117+/- » ; Pts : Patients ; WBC45+ : White Blood Cells CD45+

Grâce au tube LSC2, nous détectons des LSC au diagnostic chez tous les patients LAM de notre étude. Cependant, le pourcentage de LSC sur l'ensemble des blastes CD34+/- CD117+/- (« BL34+/-117+/- ») semble varier considérablement d'un patient à l'autre (min : 0,024% ; max : 30,911%). Même si nous parvenons à détecter des LSC chez l'ensemble des patients au diagnostic, nous avons fait le choix de considérer un patient éligible au suivi par l'approche LSC (patient LSC+) si, et seulement si, les deux critères suivants sont respectés :

- **Pourcentage de LSCT2mix rendu sur l'ensemble des « BL34+/-117+/- » supérieur à 0,1% au diagnostic**
- **Population LSC obtenue formant un cluster en histogramme bi-paramétrique FSC/SSC**

b. Approche LSCT1 Versus Approche LSCT2

Pour un même patient au diagnostic, il est intéressant d'évaluer le degré de corrélation entre la quantification par la booléenne LSCT1 et celle par la booléenne LSCT2mix.

Comme le montre la [Figure 37], le pourcentage de LSC rendu sur les cellules nucléées CD45+ est corrélé entre les approches sur les tubes LSC1 et LSC2 ($R^2 = 0,9735$).

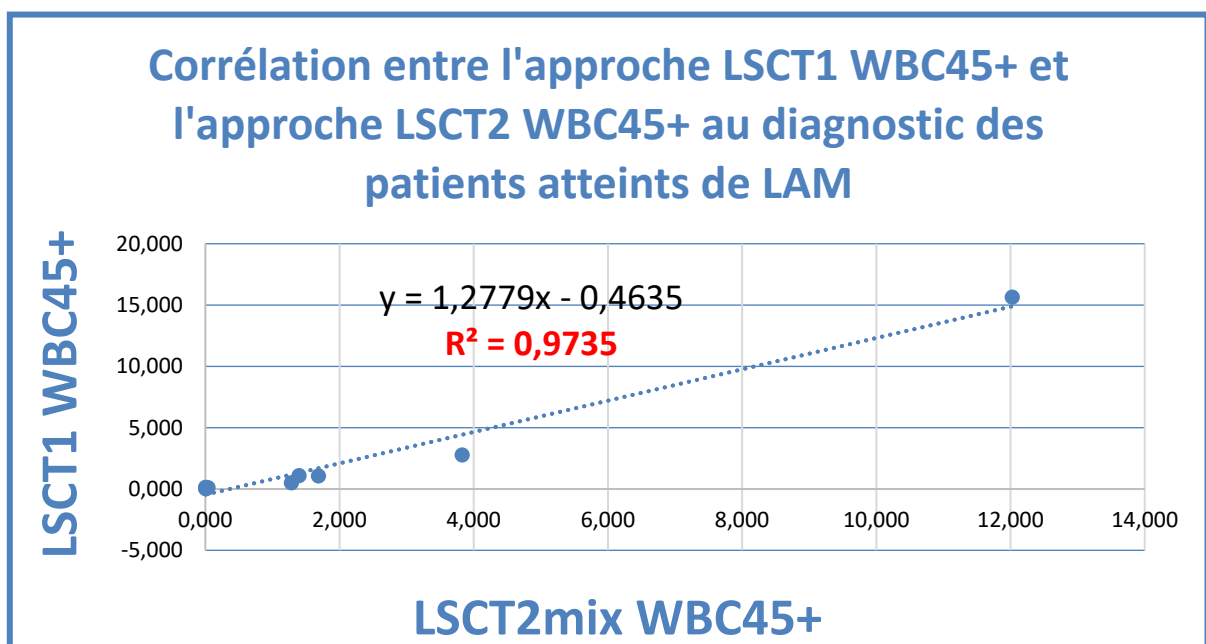


Figure 37 Corrélation entre l'approche LSCT1 WBC45+ et l'approche LSCT2 WBC45+ au diagnostic des patients atteints de LAM

c. Phénotypes LSC des patients LAM au diagnostic

Le tube LSC2 permet une visualisation des phénotypes de ces LSC retenues par la booléenne d'identification LSCT2mix [Tableau 16].

Tableau 16 Phénotypes au diagnostic des LSC déterminés par la booléenne LSCT2mix

Pts	Classification LAM	LSCT2mix % WBC45+	LSCT2mix % Blastés*	CD90	MIX*	CD123	CD45RA	LSC +
1	LAM secondaire à SMD	0,039	0,054	négatif	positif	négatif	positif	NON
2	LAM2 avec dysplasie multilignée	0,024	0,068	positif	positif	négatif	positif	NON
3	LAM4 avec discrète composante éosinophile	1,075	5,102	négatif	positif	positif	positif	OUI
4	LAM1 (composante éosinophile)	0,019	0,024	négatif	négatif	positif	positif	NON
5	LAM2	2,766	8,418	négatif	positif	positif	négatif	OUI
6	LA Indifférenciée	0,129	0,161	négatif	positif	positif	positif	OUI
7	LAM MPO négative avec maturation	0,484	1,606	négatif	positif	négatif	positif	OUI
8	SMD-EB2 ou LAM6 avec dysplasie multilignée	1,046	5,608	négatif	positif	négatif	positif	OUI
9	LAM2	0,101	0,322	négatif	négatif	négatif	positif	OUI
10	LAM2	15,627	30,911	négatif	positif	négatif	positif	OUI

La négativité du CD90 et la positivité des marqueurs MIX, CD123 et CD45RA sont attendues pour un phénotype LSC typique (en vert). Les discordances apparaissent en rouge. La positivité des marqueurs est retenue si au moins 20% des cellules issues de la booléenne LSCT2mix formant un cluster l'expriment. LSCT1 % Blastés* : pourcentage de LSCT1 parmi les « BL34+/-117+/- » ; LSCT2mix % Blastés* : pourcentage de LSCT2mix parmi les « BL34+/-117+/- » ; MIX* : CLL-1, TIM-3, CD97 ; Pts : Patients ; WBC45+ : White Blood Cells CD45+

A noter que d'un point de vue phénotypique, le marqueur CD123 pourtant décrit comme étant un marqueur robuste et fréquemment présent sur les LSC, semble moins exprimé que les autres marqueurs présents dans le tube LSCT2. Seuls les patients n°3 et n°6 présentent un phénotype purement LSC comme défini dans la littérature. A l'inverse, le CD90 n'est jamais exprimé sur les LSC comme cela était attendu à la différence des HSC saines. Il ne fait cependant pas partie de la booléenne

d'identification des LSC choisie. Ces disparités au sein même des différentes LSC retrouvées sur cet échantillon de patients reflètent l'hétérogénéité dont font preuve ces cellules régénératrices de leucémies.

d. Exemples de patients LSC+ au diagnostic de LAM

Le patient n°3, dont la majorité des myéloblastes n'expriment pas le CD34 ou très faiblement [Figure 38], affiche un sous-clone minoritaire CD34+/CD38- qui s'est avéré être composé en partie de LSC.

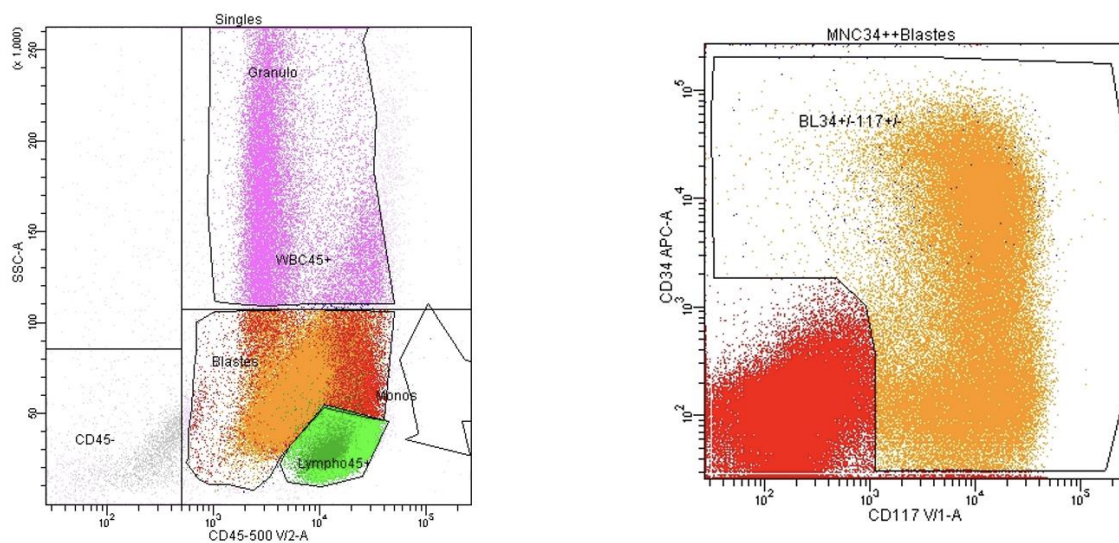


Figure 38 Histogrammes bi-paramétriques représentant la sélection des différentes populations leucocytaires à gauche et la sélection de la population BL34+/-117+/- à droite (patient n°3)

Lors de la sélection des populations P8, P7 et P6 selon l'intensité du CD38, nous avons remarqué la présence d'un arc de maturation visible pour l'ensemble des patients au diagnostic pour lesquels la majorité des blastes au diagnostic sont CD34+/CD38+. L'intensité du CD34 est plus forte pour P6 puis diminue progressivement quand l'intensité du CD38 augmente, illustrant le processus dynamique de maturation des cellules immatures [Figure 39].

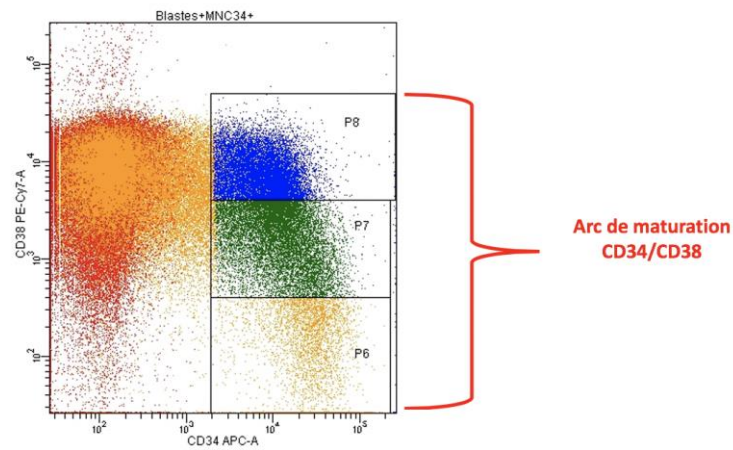


Figure 39 Sélection des populations P8, P7 et P6 (patient n°3)

A la différence des cellules HSC saines, l'intensité du CD33 des cellules CD34+/CD38- (P6) est forte. En revanche, nous notons une expression d'intensité moyenne pour le CD117, une expression partielle du CD13 et une négativité pour les marqueurs CD7/CD56 et CD19 [Figure 40]. Ces intensités d'expression sont concordantes à la description faite dans la littérature concernant les LSC.

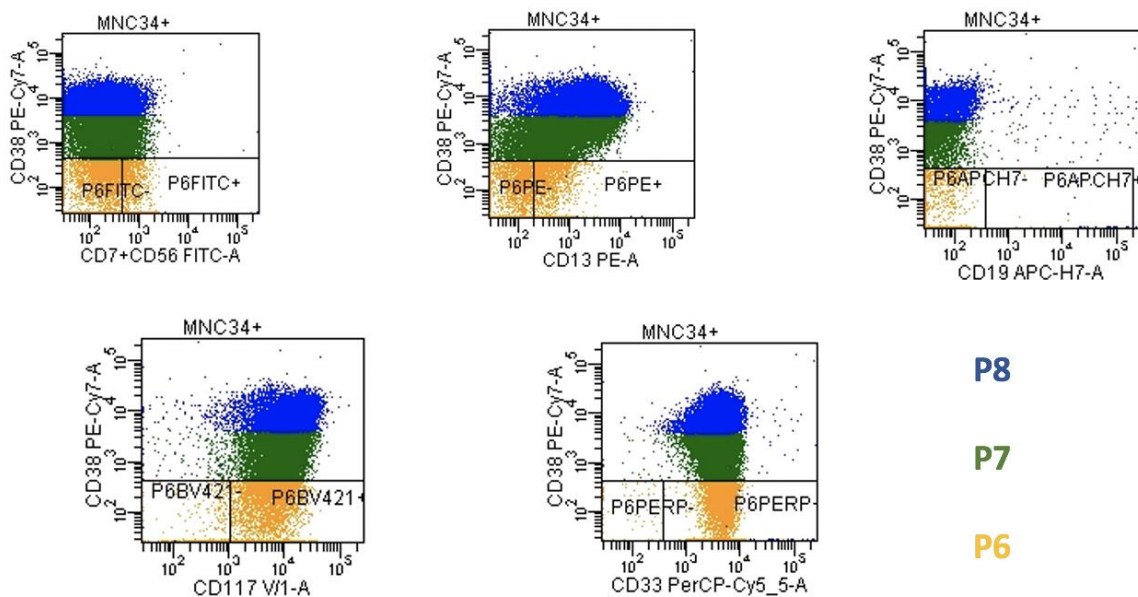


Figure 40 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC1 dans les populations P8, P7 et P6 du patient n°3

La vérification de « clusterisation » de notre population LSC suite à l'application de la booléenne LSCT1 nous donne des images convaincantes [Figure 41].

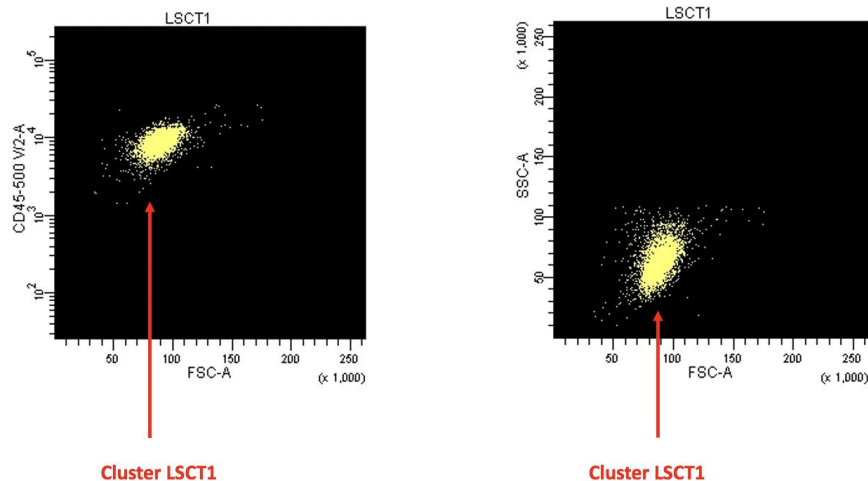


Figure 41 Vérification de "clusterisation" pour la population LSCT1 obtenue par la booléenne LSCT1 (patient n°3)

Le « retro-gating » systématiquement réalisé indique le positionnement du cluster LSC sur un dot plot SSC/CD45 [Figure 42].

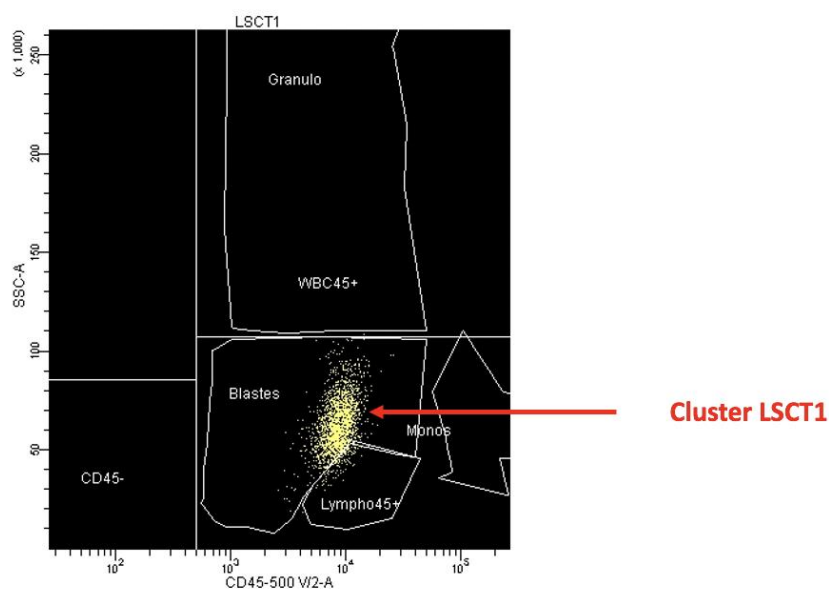


Figure 42 « Retro-gating » sur le dot plot sélectionnant les différentes populations leucocytaires en SSC/CD45

La population LSC se place dans la partie supérieure de l'ensemble des blastes en ce qui concerne l'intensité du CD45 et de la structure.

Parallèlement au tube LSC1, la [Figure 43] représente la visualisation des marqueurs explorant le compartiment souche P6 dans le tube LSC2. Des arcs de maturation se dessinent concernant les marqueurs CD117, CD123 et CD45RA.

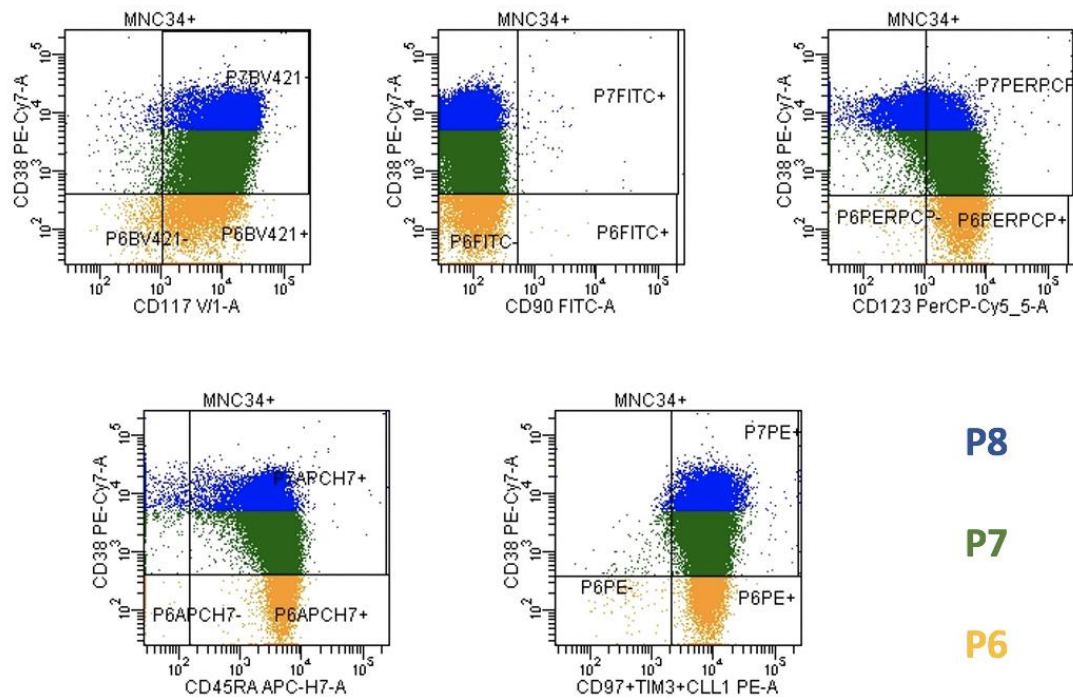


Figure 43 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC2 dans les populations P8, P7 et P6 du patient n°3

Par ailleurs, les MFI pour l'intensité du CD45RA semblent montrer une tendance à l'augmentation d'expression de ce marqueur lorsque l'intensité du CD38 décroît [Figure 44]. Le même constat a été observé pour le marqueur CD123 chez l'ensemble des patients présentant des LSC exprimant ce marqueur.

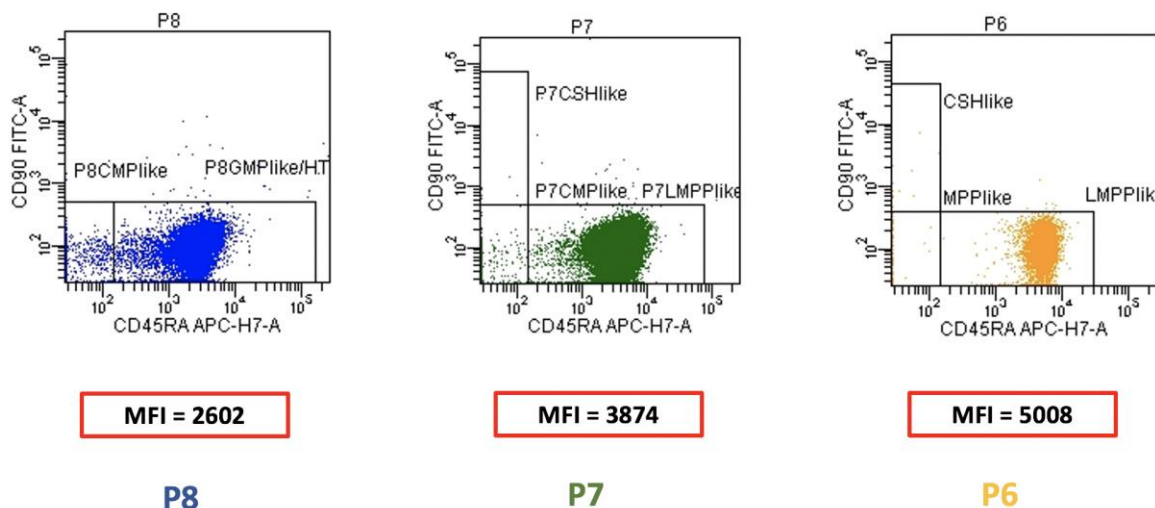


Figure 44 Visualisation des différentes populations dans P8, P7 et P6 et leurs expressions respectives du CD90 et CD45RA (patient n°3)

La MFI correspond à celle du CD45RA pour les populations P8, P7 et P6. Les différentes fenêtres exposent les différents phénotypes « like » en lien avec la hiérarchie de l'hématopoïèse. Par exemple, les cellules blastiques retrouvées dans P8 (CD34+/CD38+) et exprimant le CD45RA mais pas le CD90

ont un phénotype similaire au GMP retrouvé dans une hématopoïèse saine (*GMP like*). Pour le patient n°3, les LSC, quant à elles, exposent un phénotype *LMMP like*.

De façon équivalente au tube LSC1, une vérification de « clusterisation » de la population LSCT2mix a été effectuée et les images sont superposables à celles obtenues avec le tube LSC1 [Figure 45].

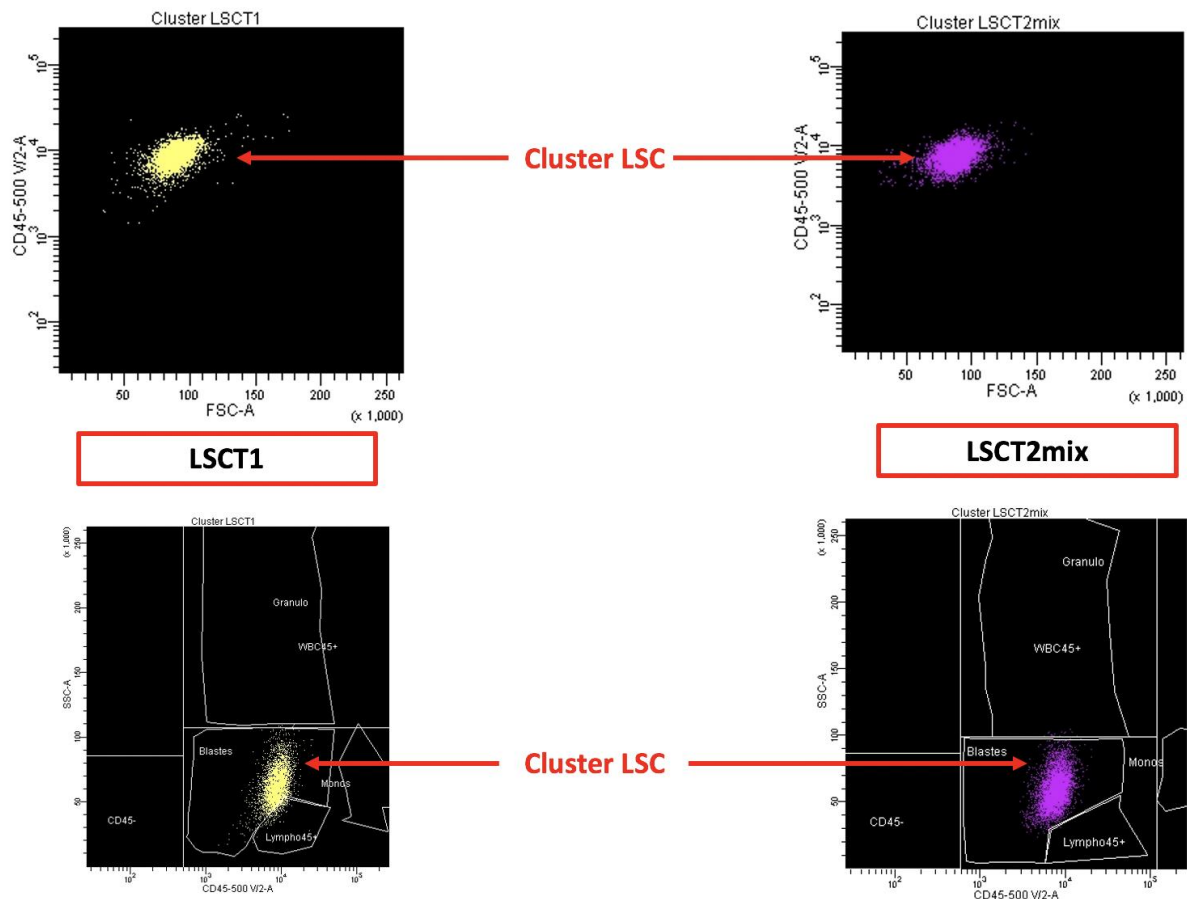


Figure 45 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des populations leucocytaires en bas (patient n°3)

Par ailleurs, les clusters obtenus pour le patient n°10 qui arbore également un pool de LSC important sont différents du patient n°3 ; ce qui reflète une fois de plus l'hétérogénéité de cette hémopathie au cœur même de la cellule régénératrice de leucémie aiguë. L'aspect et le positionnement du cluster LSC en SSC/FSC ou CD45/FSC peuvent varier d'un patient à l'autre mais semblent concordants entre le tube LSC1 et le tube LSC2 [Figure 46].

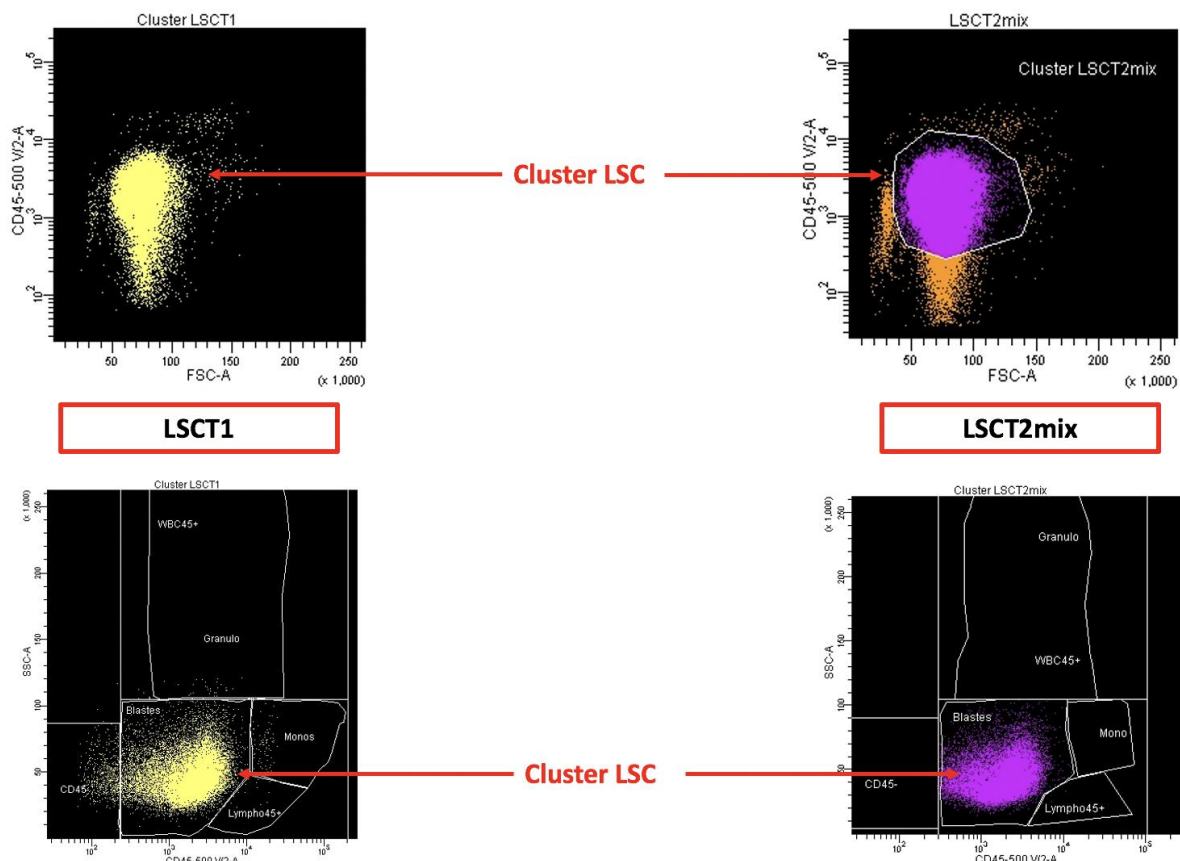


Figure 46 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des populations leucocytaires en bas (patient n°10)

La LAM du patient n°10 est considérée comme une LAM CD38 négative sur notre panel LA de routine. Ainsi, l'arc de maturation CD34/CD38 sur le panel LSC n'est pas visible contrairement au patient n°3 **[Figure 47]**.

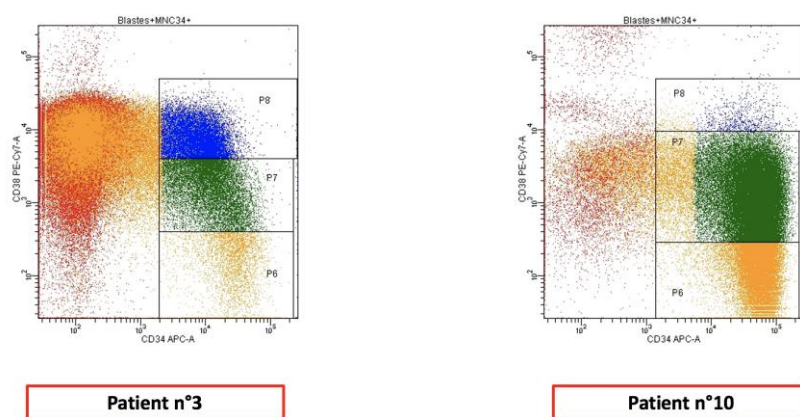


Figure 47 Comparaison des images P8, P7 et P6 entre le patient n°3 (à gauche) et le patient n°10 (à droite)

Même si la population P6 du patient n°10 est positive pour le CD45RA, son intensité d'expression est bien plus faible que celle du patient n°3 **[Figure 48]**.

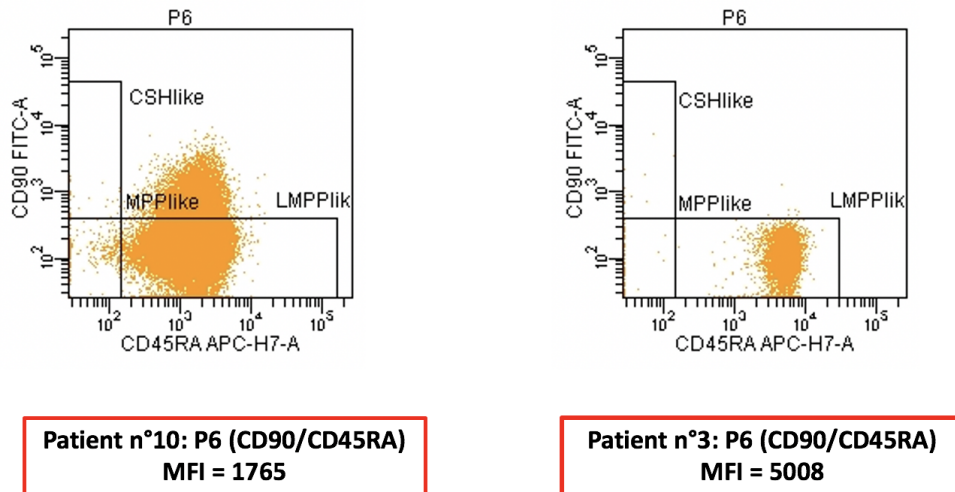


Figure 48 Comparaison de l'expression du CD90 et du CD45RA pour les populations P6 des patients n°10 et n°3

La MFI correspond à celle du CD45RA pour les populations P6 des patients n°10 et n°3.

Pour le patient n°10, 15,4% des cellules en P6 expriment le CD90 ; ce qui est une caractéristique phénotypique des HSC contrairement au LSC. Cependant, ces cellules dès lors qu'elles expriment le CD45RA, sont classées en LSC par la booléenne d'identification LSCT2mix.

4. Approche LSC au suivi des patients atteints de LAM

Bien qu'il ait été détecté des LSC chez l'ensemble des patients au diagnostic, certains cas semblent plus propices au suivi de la maladie résiduelle via l'approche LSC que d'autres. Ainsi, les patients suivis par notre approche LSC sont le patient n°3 du fait d'un sous-clone CD34+/CD38- composé de LSC, le patient n°5 présentant un fort pourcentage de LSC, le patient n°10 pour lequel l'ensemble des blastes est exclusivement CD34+/CD38- avec une forte proportion de LSC et le patient n°9 dont le pourcentage de LSC parmi les blastes est supérieur à 0,1%. Les patients n°6, n°7 et n°8 n'ont pas eu de prélèvements de moelles osseuses de suivi pendant la période de l'étude. Les patients n°1, n°2 et n°4 n'ont pas été retenus pour cette exploration compte-tenu de leur faible présence de LSC (< 0,1% des BL34+/117+/-).

Dans notre étude, et à l'instar de l'approche LAIP, un patient est considéré positif en MRD selon l'approche LSC si le pourcentage de LSCT2mix parmi l'ensemble des WBC45+ est supérieur au seuil déterminé sur notre pool de moelle témoins (**$1,79.10^{-2}$**) [Tableau 17].

Tableau 17 MRD des patients suivis sur le pourcentage de LSC (méthode Ficoll ®)

Pts	Diagnostic	MRD1	MRD2	MRD3	MRD4
3	1,077 (463795)	0,000 (512151)	0,001 (453275)	0,001 (359105)	0,000 (318836)
5	2,766 (6581)	0,410 * (473703)	0,139** (27405)	/	/
9	0,101 (528145)	0,001 (419294)	Non réalisé sur le panel LSC	/	/
10	15,627 (402551)	0,002 (344628)	0,000 (56077)	/	/

MRD1 : Post-induction (excepté patient n°5) ; MRD2 : Post-consolidation n°1 (excepté patient n°5) ; MRD3: Post-consolidation n°2 ; Pts : Patients. Les LSC au diagnostic et en MRD sont exprimées en pourcentage des cellules nucléées CD45+. Apparaît entre parenthèse le nombre de cellules nucléées CD45+ pour chaque prélèvement médullaire dans le tube LSC2, en vert les MRD indétectables, en rouge les MRD détectables. *J52 post-VYXEOS ® ; ** 3^{ème} cycle de VIDAZA ®

Selon notre approche LSC, le patient n°3 présente une MRD indétectable dès le post-induction. Dès le post-induction, nous ne détectons pas de LSC résiduelles en quantité supérieure au bruit de fond déterminé sur notre pool de moelles témoins ($1,79.10^{-2}$) [Figure 49].

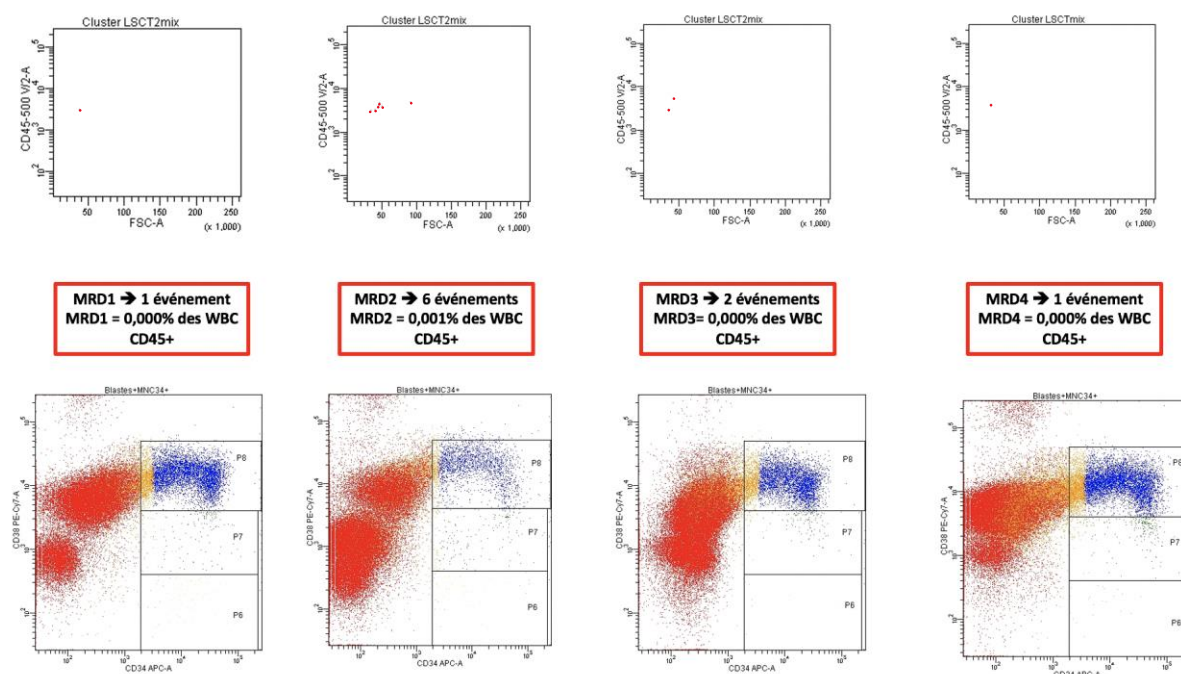


Figure 49 MRD selon l'approche LSC pour le patient n°3

Par ailleurs, le patient n°5 présente au diagnostic des LSC et n'a jamais été en rémission au moment de l'écriture de ce manuscrit. La maladie résiduelle selon

l'approche LSC est détectable lors des deux points de suivi analysés. A J52 post-VYXEOS® et après un 3^{ème} cycle de VIDAZA®, nous détectons un pool de LSC résiduel dont le pourcentage sur les WBC CD45+ est supérieur à celui déterminé sur les MO témoins [Figure 50]. Ce pool de LSC diminue cependant avec le traitement. Aucune modulation phénotypique n'a été mise en évidence sur les cellules blastiques et les LSC résiduelles.

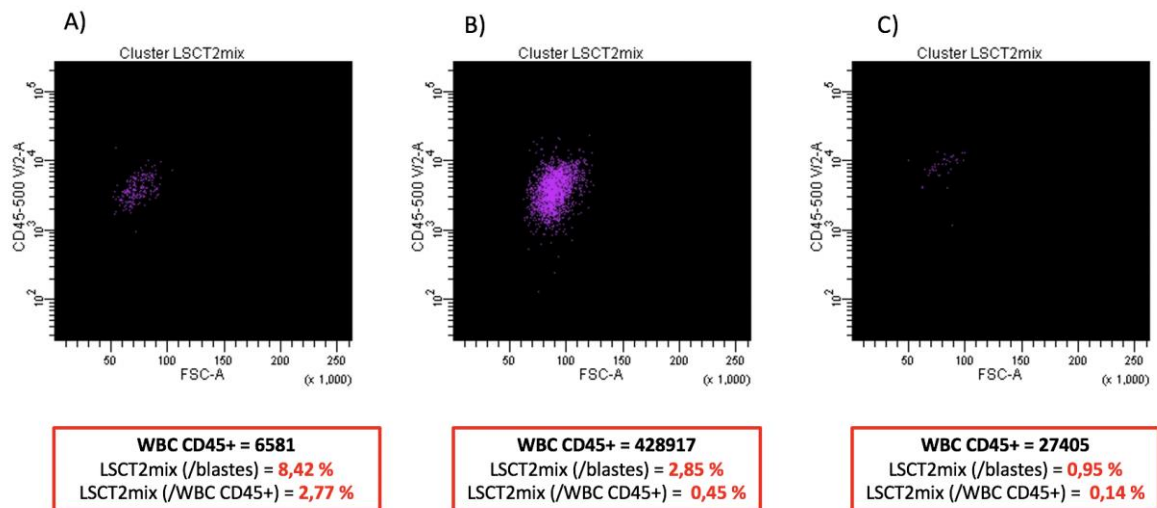


Figure 50 Suivi de la MRD selon l'approche LSC pour le patient n°5

A) Cluster LSCT2mix au diagnostic (infiltration blastique à 45% des cellules nucléées totales) B) Cluster LSCT2mix à J52 post-VYXEOS® (infiltration blastique résiduelle à 18% des cellules nucléées totales) C) Cluster LSCT2mix 3^{ème} cycle de VIDAZA® (infiltration blastique résiduelle à 19% des cellules nucléées totales).

5. Approche LSC à la rechute d'un patient atteint de LAM

Le patient n°3, qui arborait de nombreuses LSC au diagnostic (5,1% des blastes totaux), présente une rechute précoce de sa LAM après le troisième cycle de consolidation dans le protocole BIG-1. A la rechute, la moelle osseuse est envahie par 91% de cellules blastiques d'aspect cytologique très indifférencié contrairement au diagnostic et aucune composante monocytaire anormale n'est présente. De plus, le panel LA met en évidence la présence de 78% de cellules blastiques exprimant les marqueurs CD34, CD117 faiblement, CD33 fortement, HLA-DR faiblement, CD7/CD13/CD38 partiellement, la MPO et la TdT. Aucune composante monocytaire anormale n'a été détectée en CMF. De façon très intéressante, le phénotype des blastes de la rechute (CD34+) ne correspond en rien au phénotype initial décrit au

diagnostic (CD34- et composante monocyttaire anormale associée). Ces myéloblastes présentent à la rechute un phénotype très immature se rapprochant de celui mentionné pour les LSC dans la littérature, avec notamment, l'expression faible du CD117, l'expression forte du CD33 mais également la présence de CD7 et de TdT.

Plus pertinent encore, les mêmes images de LSC qui n'apparaissaient plus cependant dès le post-induction initial, sont réapparues de façon identique au diagnostic sur notre panel LSC [Figure 51].

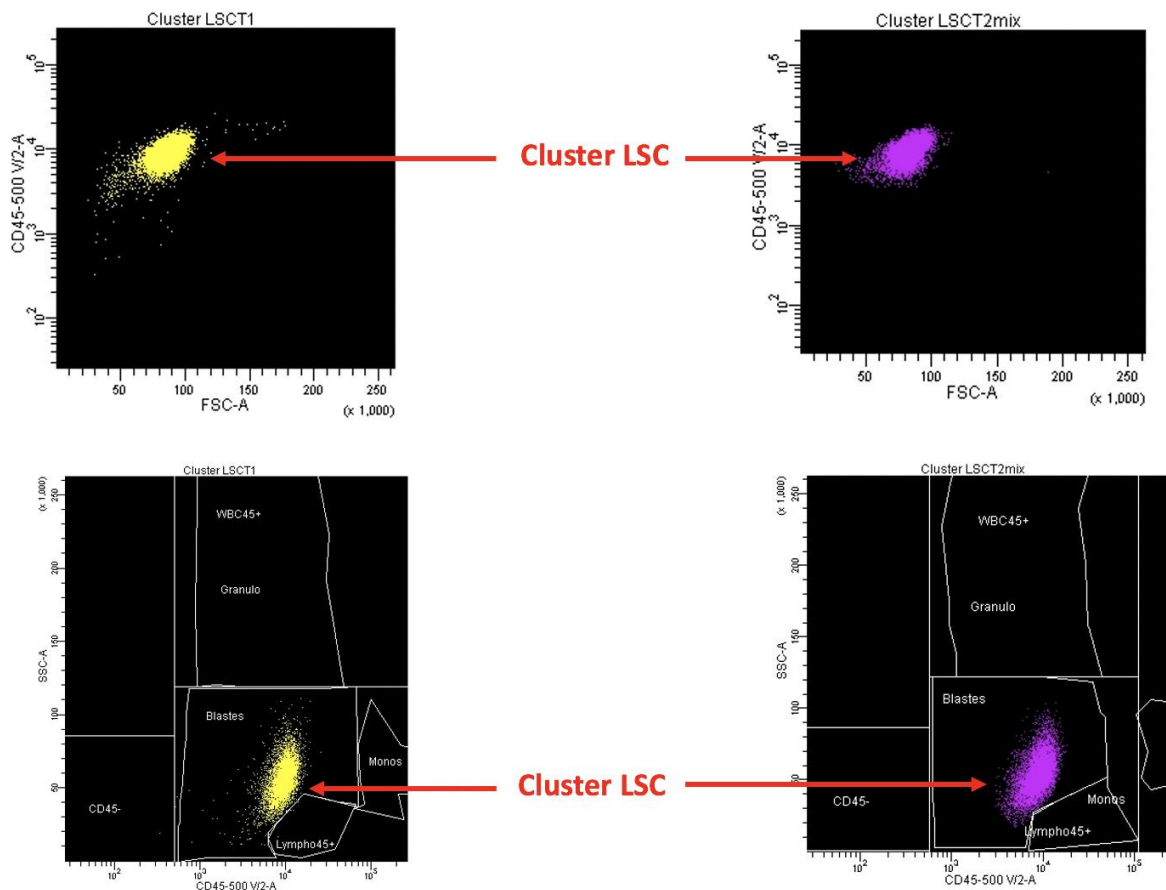


Figure 51 Comparaison entre les clusters LSCT1 et LSCT2mix visualisables sur des histogrammes bi-paramétriques CD45/FSC en haut et SSC/CD45 pour la sélection des population leucocytaires en bas, à la rechute de LAM du patient n°3

Sur le panel LSC, le phénotype de l'ensemble des blastes à la rechute correspond au phénotype du sous-clone minoritaire CD34+/CD38- mentionné au diagnostic sur le panel LA. La perte de l'arc de maturation CD34/CD38 visible au diagnostic sur le panel LSC est un argument fort suggérant que le patient n°3 rechute suite à la maturation incomplète des LSC retrouvées en P6 au diagnostic. A la rechute, l'intensité du CD34 (forte) est fixe [Figure 52]. L'intensité de l'expression du CD38, en revanche, est hétérogène sur l'ensemble de la population blastique.

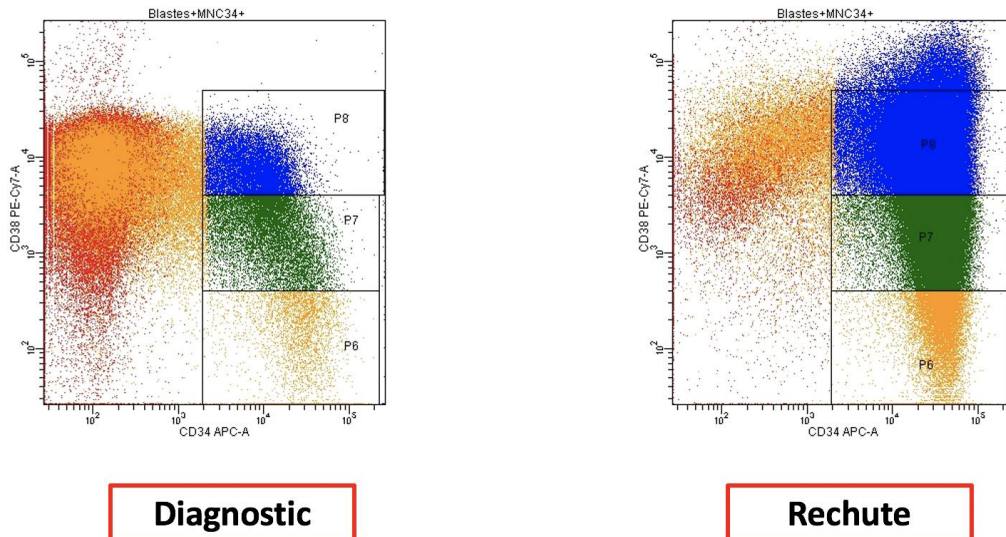


Figure 52 Comparaison des intensités du CD34 et du CD38 des populations P8 (bleu foncé), P7 (vert) et P6 (jaune) entre le diagnostic et la rechute

Sur le tube LSC1, l'expression des marqueurs sur les populations P8, P7 et P6 est presque identique à celle objectivée sur le sous-clone CD34+/CD38- du diagnostic [Figure 53]. Il est cependant intéressant de constater une expression plus faible du CD117 à la rechute par rapport au diagnostic. L'intensité du CD38 augmente avec l'intensité du CD34 traduisant probablement une maturation de la LSC.

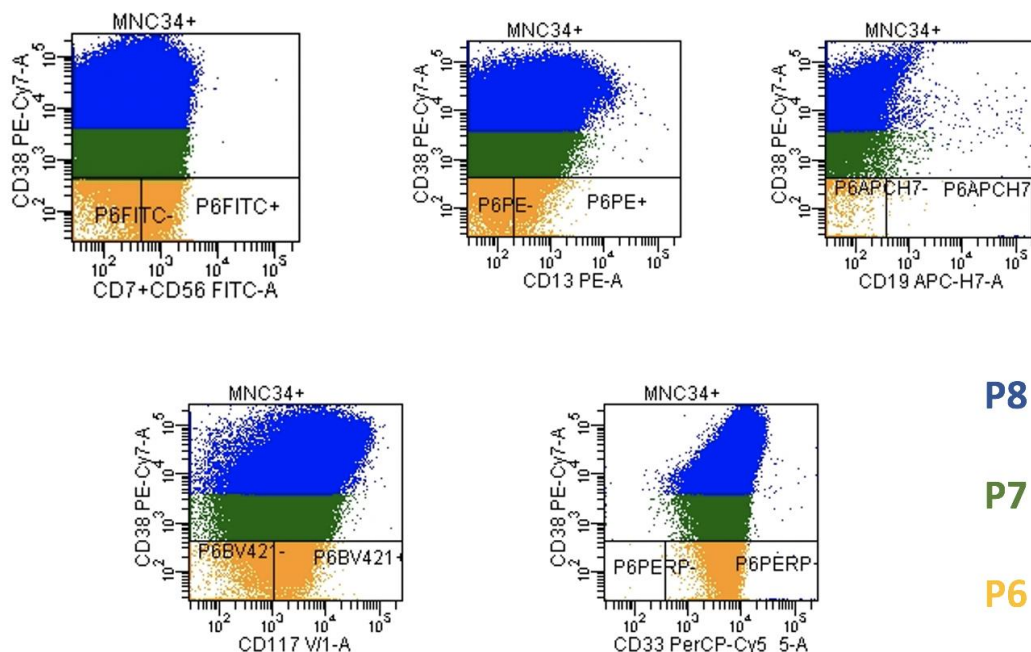


Figure 53 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC1 dans les populations P8, P7 et P6 à la rechute du patient LAM

De façon similaire au tube LSC1, le phénotype de l'ensemble des blastes à la rechute sur le tube LSC2 correspond au phénotype du sous-clone minoritaire CD34+/CD38- du diagnostic [Figure 54].

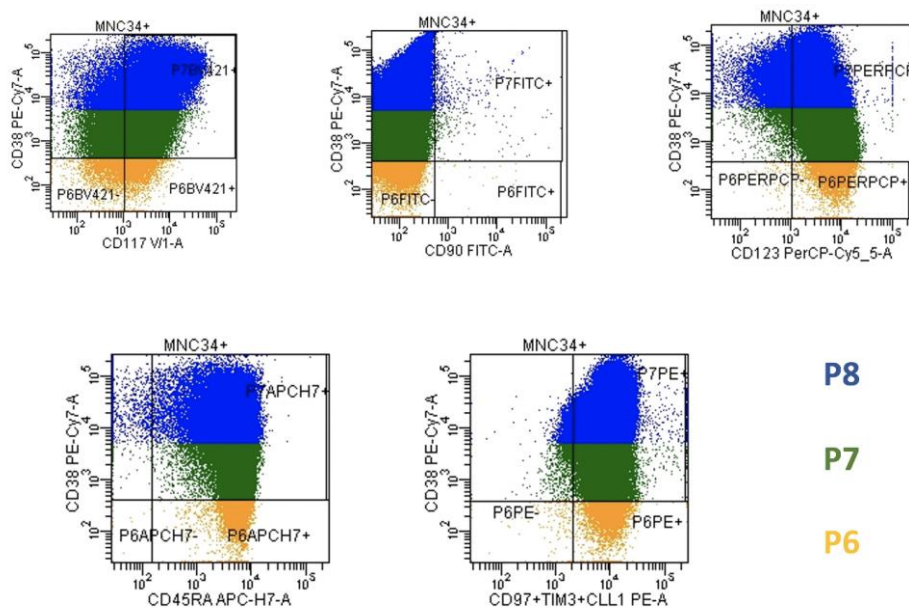


Figure 54 Visualisation de l'expression des marqueurs du tube LSC2 dans la population P6 à la rechute du patient n°3

A la rechute, le pourcentage de LSC2mix représente 2,1% des BL34+/-117+/- (contrairement au diagnostic où ces dernières représentaient 5,1% des BL34+/-CD117+/-).

La cytologie, le phénotype et l'agressivité de la LAM de ce jeune patient n°3 sont des arguments concordants nous amenant à poser l'hypothèse d'une rechute avec un sous-clone CD34+/CD38- composé d'un pool de LSC qui a proliféré et très peu mûré.

IV. Suivi de la MRD en biologie moléculaire des patients de l'étude

Certains patients inclus sont suivis par biologie moléculaire pour la MRD grâce à la présence de marqueurs de suivi robustes (n=3) [Tableau 18]. Le patient n°3 est suivi en biologie moléculaire sur son marqueur leucémique *NPM1* muté de type B. Inclus dans le protocole BIG-1, la décroissance de *NPM1* en MRD 2 sur le sang > 4log est l'objectif pour ne pas orienter le patient vers l'allogreffe d'emblée. Cet objectif étant atteint, le patient n°3 n'était pas éligible en première intention à l'allogreffe. Pour les

patients n°9 et n°10, une diminution significative >3 log en post-induction dans la MO a été obtenue traduisant l'efficacité de la phase d'induction. Pour ces derniers, la MRD selon l'approche LAIP et l'approche LSC est indétectable ; ce qui est concordant avec le résultat de la biologie moléculaire.

Tableau 18 Suivi de la MRD en biologie moléculaire des patients de l'étude

Pts	Marqueur de suivi moléculaire	Diagnostic	MRD 1	MRD 2	MRD 3	MRD 4	Rechute
3	<i>NPM1</i> type B* (MO)	2196	14,25	0,33	0,14	0,055	1165,5
3	<i>NPM1</i> type B* (sang)	Non réalisé	0,09	0,012	0,02	0,006	1541,7
9	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> *	397	0,321	0,45 (J90)	/	/	/
10	<i>RUNX1-RUNX1T1</i> *	478	Indétectable	Indétectable	/	/	/

* Seuil de détection = 0,004% ; Pts : Patients. Les résultats sont exprimés en ratio (%) du gène ou transcrit de fusion/ABL (gène de ménage). MRD1 : Post-induction ; MRD2 : Post-consolidation n°1 ; MRD3 : Post-consolidation n°2 ; MRD4 : Post-consolidation n°3

V. Distinction fragile entre HSC et LSC, difficulté conceptuelle ?

Après application de la booléenne d'identification LSCT2mix, le patient n°7 présente deux clusters cellulaires bien distincts **P1** et **P2** [Figure 55- A)]. Les deux clusters distincts P1 et P2 n'ont pas pu être mis en évidence sur le tube LSC1. L'utilisation de l'intensité du CD33 comme marqueur différenciant ces deux populations anormales ne donne aucun résultat interprétable.

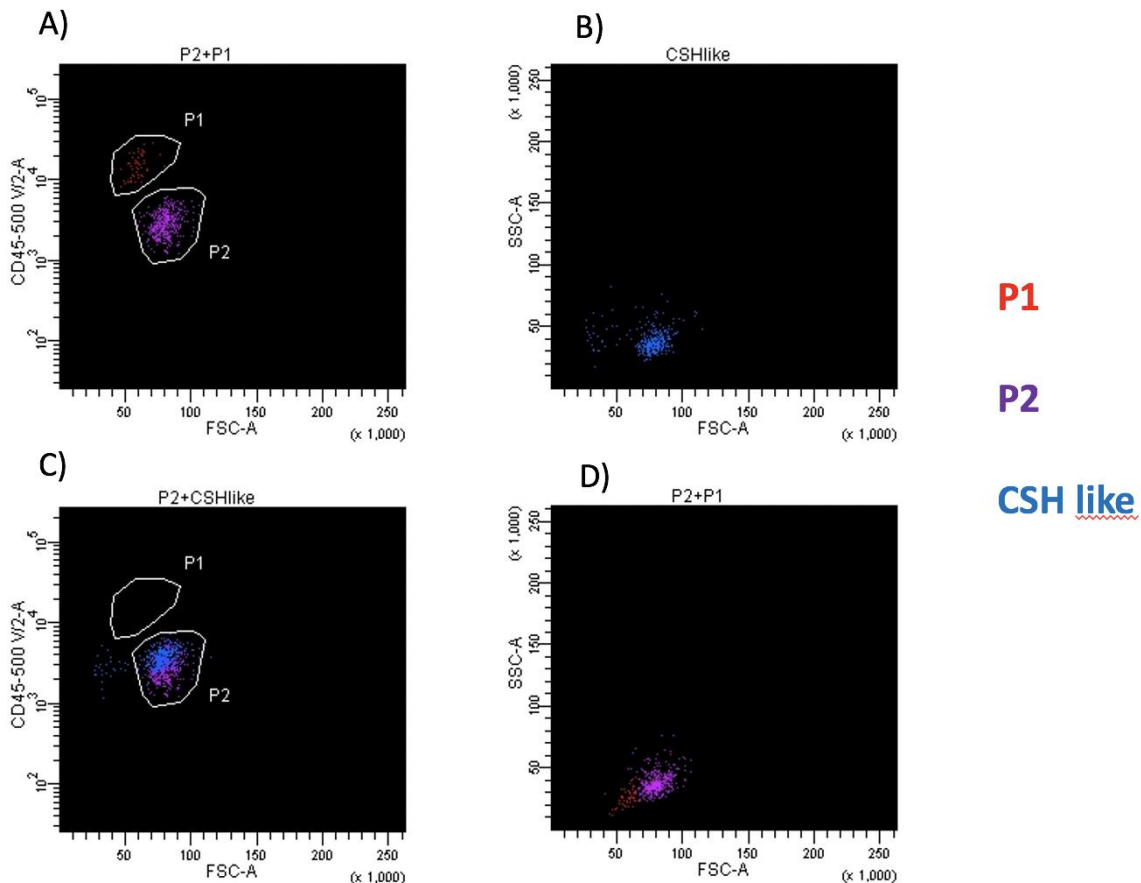


Figure 55 Clusters cellulaires dans le compartiment souche P6 du tube LSC2 pour le patient n°7

A) Visualisation des deux clusters distincts P1 (en rouge) et P2 (en violet) sur un dot plot CD45/FSC. B) Cluster « CSH like » présent dans P6 et défini sur le phénotype CD90+/CD45RA-. C) Superposition en CD45/FSC des population P2 (en violet) et « CSH like » (en bleu). D) Visualisation en taille et structure des populations P1 (en rouge) et P2 (en violet).

Bien que la booléenne LSCT2mix traque l'ensemble des cellules anormales du compartiment P6 (LSC), nous nous sommes interrogés sur la signification de ces deux clusters. La population **P1** arbore un phénotype plutôt LSC (expressions attendues pour une LSC en vert) : **CD34+** / **CD38-** / **CD117+faible** / **CD90-** / **CD45RA+fort** / **MIX+** (partiellement) / **CD123+** (partiellement). La population **P2** présente quant à elle, un phénotype plutôt intermédiaire entre les phénotypes types HSC et LSC: **CD34+** / **CD38-** / **CD117+fort** / **CD90-** / **CD45RA+faible** / **MIX+** partiellement / **CD123-** (les différences avec la population **P1** apparaissent en rouge). Bien que la population **P2** soit considérée comme LSC par la booléenne LSCT2mix, nous mettons en évidence des différences phénotypiques avec la population **P1**, rapprochant **P2** du phénotype HSC: expression plus forte du CD117, expression atténuée du CD45RA et CD123 négatif. Dans le panel LSC, les cellules HSC sont définies dans le compartiment P6 par l'expression du CD90 et la non-expression du CD45RA. Nous avons voulu comparer le phénotype des cellules HSC définie seulement sur le phénotype

CD90+/CD45RA- dans P6 et la population **P2**. Pour ce patient n°7, les HSC (population **CSH like**) représentent 330 événements formant un cluster, soit 0,45% des cellules nucléées totales CD45+ [Figure 55- B)]. Ces cellules HSC ont un phénotype **CD34+/CD38-/CD117+fort/CD90+/CD45RA-/MIX-/CD123-** correspondant au phénotype typique qui caractérise dans la littérature les cellules souches hématopoïétiques saines [Figure 56].

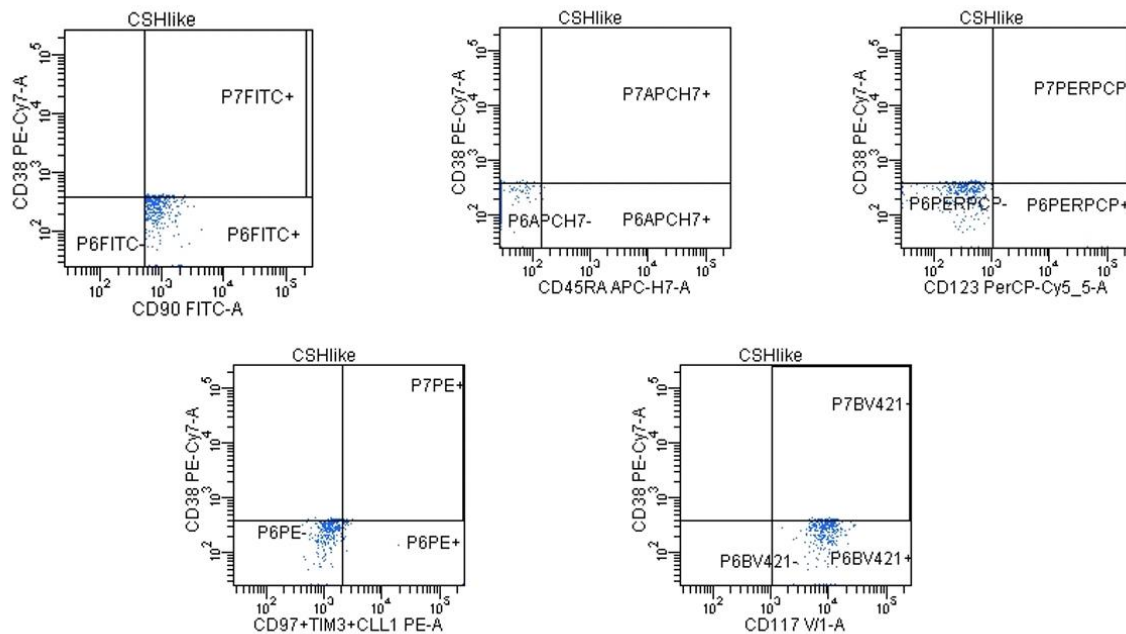


Figure 56 Phénotype des CSH like (en bleu) du patient n°7 sur le tube LSC2

De façon intéressante, si les populations **CSH like** et **P2** sont affichées ensemble sur un dot plot SSC/FSC ou un dot plot CD45/FSC, elles se retrouvent confondues au même emplacement [Figure 55 - C)]. De façon paradoxale, la population **P1** se rapprochant plutôt d'un phénotype typique de LSC semble de taille inférieure aux populations **P2** et **CSH like** [Figure 55- D)]. Ainsi, même si les LSC sont stipulées présenter une taille plus importante que les HSC, ce postulat n'est pas vérifié ici pour ce patient.

En résumé, l'exemple du patient n°7 démontre qu'il n'est pas toujours aisé de distinguer les populations LSC et HSC en pratique selon notre stratégie d'analyse mise en place dans ce travail. Des chevauchements d'expression de marqueurs entre ces deux entités sont probablement à l'origine de ce phénomène.

DISCUSSION

L'objectif majeur de ce travail de thèse réside dans l'évaluation de l'applicabilité du panel LSC en CMF au CHU de Caen pour le suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes. Au CHU de Caen, le suivi de la MRD en CMF n'étant pas standardisé, ce travail préliminaire est le premier s'intéressant au sujet. Actuellement, aucune standardisation n'a été effectuée à l'échelle mondiale ou nationale dans le domaine de la MRD des LAM en CMF. Ainsi, il apparaît primordial d'effectuer le test de différents panels afin de pouvoir espérer un jour standardiser de façon efficace cette approche. Cette discussion permettra de mettre l'accent sur les points forts et les limites inhérentes à l'utilisation du panel LSC en routine, en regard de l'approche utilisée actuellement au CHU de Caen avec le panel LA.

Malgré le faible échantillonnage dans ce travail, de nombreux constats ont pu être faits nous rappelant combien la mise en place d'un panel d'anticorps de cytométrie en flux est difficile. Ceci est d'autant plus vrai dans l'évaluation de la MRD qui nécessite une rigueur analytique particulière quand il s'agit de détecter sensiblement et spécifiquement d'infimes populations cellulaires. De plus, les difficultés conceptuelles émergentes concernant la détection des LSC peuvent être un frein non négligeable à la mise en place de panels appropriés. Au-delà de ce travail de thèse, l'ensemble des moelles de suivi des patients initialement typés au diagnostic est encore analysé de façon prospective. De plus, nous continuons d'inclure des patients afin de continuer nos explorations tant sur le plan technique que théorique.

Afin d'évaluer de façon la plus sensible et spécifique possible la MRD dans les LAM en CMF, il est important de noter qu'à tous les stades analytiques au laboratoire, des points critiques dont certains sont déjà décrits dans la littérature, ont pu être mis en évidence lors du test du panel LSC.

I. Pré-analytique

La qualité du prélèvement médullaire a un réel impact sur la sensibilité de l'analyse (77). Dans l'hypothèse où le prélèvement ne s'effectue pas convenablement au cœur de la moelle osseuse, l'hémodilution du prélèvement peut avoir un impact majeur sur la détermination de la MRD. En effet, la présence de nombreux éléments

matures provenant du sang du patient réduit considérablement le nombre de précurseurs relatifs et particulièrement le nombre de cellules blastiques relatives. Ainsi, le nombre de cellules nucléées totales à acquérir par CMF devra être plus important afin d'obtenir une sensibilité minimale de 10^{-5} . En guise d'exemple : si nous considérons une population significative de 30 événements formant un cluster, le nombre d'événements acquis devra être égal à 3 000 000 ; ce qui, en pratique, semble à l'heure actuelle presque impossible.

La méthode utilisée et la qualité du traitement de l'échantillon dès lors qu'il est acheminé au laboratoire représente également un point critique. Après Ficoll® et cycles de lavages, une perte de cellules nucléées est systématique. Les bonnes pratiques du laboratoire, les fiches protocolaires mises en place, et la formation continue des techniciens, nous permettent de limiter ces pertes. Dans ce travail, la pureté médullaire a été vérifiée pour chaque point de suivi de nos patients malades afin de s'assurer d'une quantité suffisante de cellules blastiques dans les moelles osseuses permettant la détermination convenable de la MRD. De plus, grâce à l'expérience au laboratoire du CHU de CAEN et à la cytologie médullaire associée à l'étude des proportions des différentes populations leucocytaires en CMF, nous avons pu vérifier que chacun de nos prélèvements pour le suivi de la MRD ne présentait pas de caractère d'hémodilution majeure interférant pour l'évaluation de cette MRD.

II. Analytique

1. Standardisation et réglage du cytomètre

Le panel LSC a été acquis dans notre étude sur le cytomètre BD FACS Lyric®, dernier cytomètre de routine du fournisseur BD. D'un point de vue analytique, l'utilisation du BD FACS Lyric® permet de s'assurer d'une très bonne harmonisation des réglages des PMT d'un échantillon à l'autre, et ce sur de longues périodes de temps. En effet, les PMT et les matrices de compensation sont réglés automatiquement pour obtenir à chaque fois les mêmes valeurs cibles que déterminées lors des réglages initiaux. Ceci apparaît être un point déterminant pour envisager l'utilisation du panel LSC dans un laboratoire de routine. En revanche, le logiciel fourni par BD, FACSuite®, représente à l'heure actuelle un frein de par sa complexité d'utilisation et son manque de fluidité lors de l'analyse complexe du panel

LSC. C'est d'ailleurs ce qui nous a poussé à préférer le logiciel d'analyse FACS DiVa[®] au cours de ce projet, plus facile d'utilisation. En revanche, une incompatibilité de transmission entre le cytomètre BD FACS Lyric[®] et le logiciel FACS DiVa[®] non résolue, ne nous a pas permis d'obtenir des histogrammes bi-paramétriques selon un axe bi-exponentiel. N'ayant pas d'impact sur le rendu final de notre analyse, les histogrammes obtenus ne sont malheureusement pas aussi lisibles que sur notre panel LA pour lequel l'affichage bi-exponentiel fonctionne. Ce dernier point rappelle l'importance des outils d'analyse en cytométrie en flux, en particulier dans des approches complexes telles que le suivi de maladie résiduelle.

2. Robustesse du panel LSC

Les approches d'évaluation de la MRD sur le panel LSC ont pu démontrer leur grande robustesse et leur comparabilité lors de différents échanges inter-laboratoires d'échantillons médullaires. Les résultats obtenus au sein du groupe MRD CMF LAM LSC sont très prometteurs et permettent d'envisager un suivi de la maladie résiduelle dans chaque centre du groupe ALFA.

3. Sensibilité et spécificité analytiques

La sensibilité et la spécificité font partie des paramètres que les cytométristes cherchent de façon permanente à améliorer. Cela est d'autant plus vrai dans l'étude de la MRD dans les LAM dès lors que nous travaillons sur de petites voire infimes populations résiduelles. Améliorer la sensibilité de notre technique passe indéniablement par l'augmentation du nombre d'événements acquis. Durant ce travail, bien que nous nous soyons rendus compte rapidement du nombre de cellules acquises par le cytomètre à notre sens insuffisant, nous n'avons pas augmenté le nombre de cellules marquées. Les raisons de cette décision réfléchie sont les suivantes. D'une part, le partage des cellules entre le panel LA de routine et le panel LSC réduisait le nombre de cellules à acquérir. Le panel prioritaire étant le panel LA de la routine, il est arrivé que trop peu de cellules restent disponibles pour le panel LSC et que la suspension cellulaire à 10^6 cellules/mL ne puisse être obtenue. D'autre part, même si la suspension à 10^6 cellules/mL était atteinte, il était difficile d'atteindre un minimum de 500 000 cellules nucléées acquises et donc encore moins 500 000 cellules nucléées CD45+. Nous n'avons pas souhaité augmenter le nombre de cellules

marquées dans les lyotubes du panel LSC car le fournisseur indique que ces derniers sont titrés pour permettre le marquage d'un million de cellules. Il serait cependant intéressant par la suite, d'effectuer des essais sur 2 millions de cellules marquées afin d'amplifier notre nombre d'événements acquis.

Par ailleurs, afin d'augmenter la spécificité de notre détection de LAIP en MRD ou de LSC, le passage à 10 ou 12 couleurs (10 ou 12 fluorochromes différents en simultané dans un tube) serait souhaitable et permettrait d'étudier de plus nombreuses associations phénotypiques.

La sensibilité et la spécificité étant des paramètres directement dépendants du paramétrage de l'automate, du choix des fluorochromes et de la constitution des panels, il est important de souligner que les expressions physiologiques des marqueurs LAIP décrites dans la littérature **(78) (79)** pour déterminer les seuils utilisés dans le suivi des LAM ne sont applicables que si et seulement si une standardisation généralisée entre les centres utilisant les mêmes cytomètres existe. En cas d'absence, comme c'est le cas actuellement pour l'évaluation de la MRD en CMF dans les LAM, des seuils de positivité devraient être établis pour chaque marqueur en utilisant un pool de moelles témoins afin que chaque centre puisse évaluer sa propre sensibilité et spécificité.

III. Post-analytique

Les points forts et les limites de l'étape post-analytique découlent principalement de la constitution des tubes et de la stratégie d'analyse que nous avons appliquée sur le panel LSC concernant les approches LAIP et LSC.

1. Approche LAIP

a. Détermination du placement de la fenêtre de positivité CD7/CD56

Le placement de la fenêtre caractérisant les cellules positives pour le CD7/CD56 fait appel à l'utilisation des différentes populations lymphocytaires (B et T/NK). En effet, les lymphocytes T exprimant le CD7 contrairement aux lymphocytes B de même que les lymphocytes NK exprimant le CD56 contrairement aux

lymphocytes B, il est en théorie possible de placer la borne inférieure de la fenêtre de positivité à la séparation de ces populations lymphocytaires quand celle-ci est visible. En pratique, et dans l'état actuel du réglage du cytomètre et du logiciel d'analyse, il semble visuellement compliqué de faire la distinction entre ces différentes populations. De plus, nous nous sommes rendus également compte que même si la distinction était visible, le placement du seuil effectué rendait positive une partie des cellules blastiques qui ne pouvait se différencier de l'auto-fluorescence des blastes. Ainsi, le placement de cette fenêtre s'est essentiellement reposé sur l'auto-fluorescence qui généralement nous faisait augmenter le seuil de positivité pour le marqueur CD7/CD56 par rapport à la détermination visuelle de la fenêtre de positivité.

b. Sensibilité et spécificité, paramètres dépendant de la stratégie d'analyse LAIP

Trouver un bon équilibre entre la sensibilité et la spécificité pour l'évaluation de la MRD via l'approche LAIP est source de beaucoup de débats en CMF. Dans notre travail, la détermination des seuils d'expression du LAIP CD7/CD56 sur l'ensemble de la population blastique « BL34+/-117+/- » a soulevé plusieurs problématiques. En effet, étant donné l'hétérogénéité d'expression de ces deux marqueurs dans les LAM, il est important à notre sens, d'établir un seuil d'expression physiologique correspondant à chaque possibilité d'intensité d'expression des blastes leucémiques pour ces marqueurs d'immaturité CD34 et CD117. Le risque de quantifier le nombre d'événements sur cette population « BL34+/-117+/- » est de récupérer des événements aspécifiques et donc d'augmenter faussement la positivité de la MRD. En revanche, restreindre seulement le compte d'événement LAIP sur le phénotype initial CD34+/CD117+ nous fait perdre en sensibilité mais la spécificité n'en est que meilleure. La perte de sensibilité s'explique ici, par le fait que des modulations phénotypiques peuvent survenir durant les traitements et au cours de l'évolution de la LAM et des sous-expressions des marqueurs CD34 et CD117 peuvent émerger. Le risque est donc de perdre certains blastes LAIP CD7/CD56 qui auraient sous-exprimé par la suite le CD117 et/ou le CD34. Cependant, se restreindre au suivi sur l'expression du CD34 et du CD117 de la population blastique au diagnostic nous permet d'augmenter la spécificité de notre quantification de MRD, d'autant plus que la détermination du seuil de positivité s'est effectuée sur la population entière « BL34+/-117+/- ». Les précurseurs granuleux tels que les promyélocytes qui ont un phénotype CD34-/CD117+ **(18)** peuvent interférer dans la quantification de la MRD. Nos essais

ont montré que quantifier la MRD sur l'ensemble des « BL34+/-117+/- » n'était, à notre sens, que trop peu spécifique. En effet, les tests de « clusterisation » montraient une dispersion des points proche des populations granulocytaires plus matures et des monocytes. Quantifier la MRD sur les réels blastes CD34+/CD117+ dès lors que ce phénotype est présent au diagnostic nous apporte de belles images de « clusterisation » et nous amène à penser qu'il vaut mieux être spécifique que plus sensible. Le risque de rendre des faux négatifs par l'augmentation de la spécificité nous semble plus faible que de rendre de faux positifs par l'augmentation de la sensibilité. Afin d'élargir cette sensibilité et cette spécificité, une des solutions serait de calculer des seuils de positivité pour chaque patient, selon les intensités des marqueurs caractérisant leurs cellules blastiques. En pratique, cela est bien entendu irréalisable.

C'est donc pour cela que nous proposons dans ce travail de thèse pour le LAIP CD7/CD56 :

- 1) D'évaluer l'expression physiologique sur des moelles témoins des marqueurs d'intérêt en prenant en compte le nombre d'événements conditionnés sur l'ensemble des « BL34+/-117+/- » ;**
- 2) De rapporter au nombre de cellules nucléées totales CD45+ pour obtenir notre pourcentage au-dessus duquel notre MRD sera rendue positive ;**
- 3) D'affiner la quantification de la MRD en prenant le nombre d'événements LAIP seulement sur les CD34+/CD117+ correspondant au phénotype initial blastique lors des points de suivi.**

c. Points forts de l'approche LAIP réalisée sur le tube LSC1

Un des grands points forts de notre travail est la création d'un pool de moelles considérées comme normales nous ayant permis de déterminer un seuil de positivité pour le LAIP CD7/CD56. Cela permet de valider le rendu de notre MRD sur ce LAIP sur des valeurs chiffrées. En routine, cela ne peut pas se faire avec le panel LA actuellement. Pourtant, nous pouvons être confrontés à des pourcentages faibles de LAIP retrouvés dans les moelles de suivi en routine sur le panel LA. Étant donné que nous n'avons jamais pu évaluer la composante normale des blastes sains exprimant ces marqueurs LAIP dans des moelles témoins pour notre panel LA, notre approche actuelle de la MRD s'appuie sur des données bibliographiques et une pratique

empirique. Cette stratégie serait très intéressante si nous faisons le choix de garder notre panel actuel pour l'évaluation de la MRD et pourrait être reconduite en testant le panel LA sur un pool de moelles témoins.

Par ailleurs, la booléenne de quantification MRD-LAIP (intersection des 10 fenêtres LAIP) a pour avantage de standardiser et d'augmenter la spécificité de la détection des cellules blastiques résiduelles en ciblant le phénotype blastique initial. En revanche, il est à noter que les précurseurs NK ont un phénotype CD7+/CD56+, CD13-, CD33-, CD117+ et CD34- **(80)**. Même s'ils ne sont pas toujours présents ou en quantité très faible, il est important de vérifier les fenêtres LAIP les caractérisant afin de pas les considérer à tort dans le calcul de la MRD sur un LAIP CD7/CD56.

Enfin, l'enregistrement pour chaque patient du masque d'analyse fenêtré au diagnostic permettant son calque lors des points de suivi augmente indéniablement la justesse de nos résultats car les compartiments étudiés sont strictement les mêmes. De plus, le temps d'analyse au suivi est considérablement réduit car le fenêtrage n'est pas à reproduire dans sa globalité. Cette stratégie offre de bons espoirs pour l'évaluation de la maladie résiduelle et est permise par la robustesse du cytomètre Lyric ®. Le calque du masque d'analyse sur les points de suivi demande cependant une réelle interprétation afin de ne pas omettre un éventuel changement phénotypique (approche DfN).

d. Limites de l'approche LAIP sur le tube LSC1

Il existe un réel désavantage au marquage CD7/CD56 sur un même fluorochrome. Lors du suivi, l'émergence de certains sous-clones peut être inaperçue. Par exemple, si un clone majoritaire exprimant le CD7 est présent au diagnostic et un clone exprimant le CD56 émerge, alors aucune discrimination ne sera possible. De plus, une MRD pourra être rendue positive pour le CD7 à tort. Le double marquage avec un même fluorochrome ne semble pas être une bonne alternative pour l'évaluation de la MRD pour l'approche LAIP. L'intérêt de disposer actuellement en parallèle et en routine d'un panel LA de 5 tubes dont la diversité des marqueurs proposés est plus que satisfaisante pour typer nos LA aurait pu permettre de s'affranchir du rajout manuel de l'anticorps CD56 si les blastes initiaux n'en

exprimaient pas. Cette solution est compatible avec l'approche LAIP mais met à défaut l'approche DfN.

De plus, le tube LSC1 ne permet également pas le suivi des LAM avec composante monocyttaire car aucun marqueur explorant cette lignée n'est présent dans ce tube. D'autres tubes et notamment un tube « monocytes » construits sur le même modèle de masque d'analyse sont en cours d'évaluation dans d'autres centres ; ce qui permettrait à terme d'élargir la possibilité de LAIP à suivre et d'inclure les LA à composante monocyttaire souvent CD34-.

Par ailleurs, certains marqueurs manquent cruellement dans ce panel LSC pour l'approche LAIP. En pratique, c'est le cas du HLA-DR qui, quand il est perdu, est un très bon LAIP. De plus, l'asynchronisme de maturation ne peut être évalué sur ce tube LSC1 car les marqueurs de maturité myéloïde sont absents (CD15, CD65...). Du fait du faible échantillon de patients et du manque d'expérience sur ce panel, l'utilisation de la sous-expression ou sur-expression de certains marqueurs comme le CD33 n'a pu être évaluée et semble à l'heure actuelle trop subjective sans directives validées et approuvées pour ce type de LAIP. Le tube LSC1 seul, en 8 couleurs, n'est absolument pas suffisant pour évaluer la maladie résiduelle selon l'approche LAIP.

L'utilisation de CD19 comme LAIP sur le tube LSC1 est difficile à l'heure actuelle. En effet, l'intensité de positivité du CD19 semble trop faible pour les lymphocytes B. Le choix du fluorochrome ne semble pas compatible avec les réglages du cytomètre Lyric ® établis en vue d'une utilisation en routine au CHU de Caen. En revanche, une des pistes d'amélioration serait de modifier pour le tube LSC1, les réglages des PMT afin d'augmenter l'intensité du signal pour les populations positives pour le marqueur CD19 dans le but de discriminer visuellement les populations négatives et positives.

En conclusion, le panel LA, de par la présence de 5 tubes, permet une meilleure sélection des LAIP. Le tube LSC1 est insuffisant pour effectuer le suivi en maladie résiduelle selon les approches combinées LAIP/DfN. Cependant, nous retiendrons la stratégie d'analyse mise en place sur le tube LSC1 qui peut augmenter pleinement la spécificité du rendu de la MRD. Une optimisation majeure au CHU de Caen dans le but d'évaluer de façon la plus sensible et spécifique possible la MRD en CMF selon

l'approche LAIP/DfN serait d'appliquer notre stratégie d'analyse aux 5 tubes présents dans le panel LA. Plus pertinent encore, créer un tube de MRD pour chaque patient en fonction de leur LAIP serait une solution idéale mais semble à l'heure actuelle impossible car toutes les associations de marqueurs et fluorochromes ne sont pas maîtrisées. Cette solution « ultra-personnalisée » n'est également pas compatible avec les ressources humaines et matérielles dont nous disposons au CHU de Caen.

2. Approche LSC

a. Fenêtrage de la population P6, une étape critique

Une des difficultés majeures dans cette stratégie est le placement de la fenêtre de positivité du CD38 permettant la discrimination entre les populations P7 et P6. Il n'existe aucune population de référence CD38 positive très discriminante et retrouvée chez l'ensemble des patients. Bien qu'il ait été décidé de placer le seuil de positivité à l'aide de la population granuleuse mature CD45+ intermédiaire, sa justesse reste discutable. Les données concernant les modulations phénotypiques de l'expression du CD38 dans les granulocytes matures sont, à notre connaissance, inexistantes dans la littérature. Selon les études publiées s'intéressant au compartiment souche, les stratégies de « gating » pour placer le seuil du CD38 sont variables. Par exemple, Zeijlemaker et *al.* proposent un protocole dans lequel la détermination du compartiment CD34+/CD38- est basée sur l'utilisation de l'expression des cellules de la lignée érythroïde restantes (CD38-) **(81)**. Une autre étude sur le compartiment souche dans les syndromes myélodysplasiques propose l'utilisation de l'intensité du CD38 des monocytes comme référence de seuil **(82)**. D'un patient à l'autre, patient témoin ou patient malade, la reproductibilité du placement du seuil de CD38 en utilisant les granuleux matures CD45+ intermédiaire dans notre travail était visuellement acceptable et aucune incohérence phénotypique par la suite n'a été mise en évidence. Il n'a pas été possible de placer la fenêtre de positivité à l'aide des lymphocytes B CD38+ car la distinction entre la positivité du CD38 des hématogones et les lymphocytes B CD38+ devenaient trop faibles. Une des possibilités dans la continuité de ce travail serait d'utiliser une approche *Fluorescence Minus One* (FMO) afin de déterminer le seuil discriminant les populations blastiques CD38 positive et CD38 négative. Cette approche est recommandée en cas de marquage multiple et est à l'étude dans plusieurs centres du groupe ALFA participant au projet MRD CMF LAM

LSC. Lorsque la compensation est réglée et quand plus d'une fluorescence est présente, la valeur négative du marquage peut être plus grande que dans un tube non marqué. Le FMO a l'avantage d'évaluer à la fois l'auto-fluorescence des cellules blastiques et le comportement des cellules vis-à-vis de la présence de tous les autres marquages présents dans le tube excepté celui d'intérêt (le CD38). Cependant, cette approche n'a pas été retenue lors de l'évaluation du panel LSC au CHU de Caen.

Le fenêtrage du CD38 est primordial pour l'étude du compartiment souche (P6) au diagnostic car sous-estimer ou sur-exprimer ce compartiment aura la même conséquence sur la quantification des LSC. En ce qui concerne le suivi en MRD via l'approche LSC, l'impact est moindre à partir du moment où le compartiment souche déterminé au diagnostic est strictement le même lors des points de suivi. La diminution ou l'augmentation des LSC au suivi sera toujours évaluée relativement à la quantification du diagnostic, validant ainsi la pertinence de nos résultats.

b. Approche LSC sur le tube LSC1

La booléenne d'identification LSCT1 utilisée est discutable. Même s'il semble admis qu'une LSC exprime du CD33 contrairement à une HSC, Taussig *et al.* montrent une expression possible de CD33 pour une HSC, remettant en question le rationnel de la construction de cette booléenne qui classe une cellule exprimant le CD33 dans P6 en LSC **(58)**. Cependant, la corrélation au diagnostic de nos LAM entre l'approche LSC1 et l'approche LSC2 valide en partie la pertinence scientifique de cette booléenne dès lors que des clusters significatifs sont présents.

De plus, bien qu'il soit décrit dans la littérature que les HSC expriment plus fortement le CD117 que les LSC **(83)**, nos LSC retrouvées au diagnostic chez nos patients testés expriment souvent plus fortement le CD117 que nos HSC sélectionnées sur nos moelles témoins. Cette modulation phénotypique observée traduit probablement l'engagement de notre LSC sur le versant myéloïde (CD117 fort, CD13+/-).

En conclusion, le tube LSC1 manque de spécificité pour l'approche LSC contrairement au tube LSC2 qui, lui, a vocation principalement d'étudier le compartiment souche de façon plus spécifique.

c. Approche LSC sur le tube LSC2

Grâce à l'inclusion de patients au diagnostic de LAM et pour la première fois au CHU de CAEN, nous avons pu détecter ces populations LSC principalement grâce au tube LSC2. La booléenne proposée par les créateurs du panel dans l'approche LSCT2 autorise une certaine souplesse quant au classement d'une cellule immature en LSC. L'expression exclusive d'un des trois marqueurs aberrants différenciant de façon robuste les HSC des LSC (MIX, CD45RA ou CD123) est suffisante pour classer une cellule en LSC. Les LAM étant des maladies très hétérogènes, elles le sont également d'un point de vue des LSC comme en témoigne également nos résultats avec les différents phénotypes des LSC mis en évidence d'un patient à un autre.

Il est à noter que le CD90 ne fait pas partie de cette booléenne bien qu'il dispose d'un fort potentiel de distinction entre HSC et LSC comme vu précédemment. En CMF, il est préférable de prendre en considération une expression plus spécifique de marqueur plutôt qu'une absence d'expression. Cependant, au vu de nos résultats, tous nos patients déterminés comme LSC positif n'expriment pas de CD90, rajoutant un argument supplémentaire en faveur de la spécificité de notre cluster de cellules LSC obtenues à posteriori.

Fait intéressant, le CD90 ne ressort quasiment jamais négatif sur les cellules LSC obtenues dans nos moelles témoins (tube LSC2) ; ce qui nous conforte dans le fait que notre seuil établi pour la significativité de notre MRD selon l'approche LSC2 correspond davantage à un bruit de fond.

Une des difficultés principales de l'étude du compartiment souche dans le tube LSC2 est incontestablement le manque d'expérience sur ce sujet plutôt récent. Les difficultés conceptuelles sur les notions phénotypiques caractérisant les HSC et les LSC sont réelles. L'exemple du patient n°7 nous montre l'hétérogénéité importante qui semble dominer dans ce compartiment P6 et donc toute la difficulté d'effectuer facilement une distinction certaine entre des populations phénotypiquement définies dans la littérature comme étant LSC ou HSC certaines. Il existe vraisemblablement des zones de chevauchement d'expression de ces marqueurs souches illustrant une

fois de plus le processus dynamique à la fois dans l'hématopoïèse saine et l'hématopoïèse leucémique.

Par ailleurs, l'utilisation des érythroblastes pour placer les fenêtres de positivité des marqueurs souches est discutable dans la mesure où l'absence actuelle de recul sur le sujet ne nous donne pas de directives quant aux seuils à utiliser pour ces marqueurs très peu utilisés en routine diagnostique aujourd'hui. Une solution à tester serait l'utilisation de l'approche FMO pour déterminer les seuils de positivité des marqueurs CD45RA, CD90, MIX et CD123 et d'évaluer leurs pouvoirs de discrimination entre les populations HSC et LSC. A notre connaissance, il n'existe aucune population positive de référence pour chacun des marqueurs explorant le compartiment souche. Ainsi, le placement de la fenêtre de positivité sur la fin de la négativité des érythroblastes (population négative pour l'ensemble de ces marqueurs) était à notre sens la meilleure solution mais n'est surement pas optimale.

De plus, il est difficile de démontrer qu'une cellule est réellement positive pour le marqueur donné dès lors qu'on dépasse la population érythroblastique. L'exemple du patient n°7 pour lequel nous retrouvons deux clusters classé LSC distincts ont chacun une intensité différente d'expression du CD45RA. Ce constat soulève la validité de la stratégie employée pour ce marqueur. Notre seuil de positivité en intensité n'est peut-être pas assez strict car les patients présentant des LSC au phénotype type (comme le patient n°3) présentent un CD45RA très fort, contrairement à d'autres patients qui ont été retenus LSC+ sur une intensité très faible de CD45RA (population **P2** du patient n°7). La reprise de l'étude des HSC sur les moelles témoins serait un axe d'amélioration de ce travail afin d'acquérir une expérience solide sur l'intensité des différents marqueurs souches du tube LSC2 en lien avec nos propres paramétrages du cytomètre Lyric®.

L'amélioration de la spécificité dans la sélection des populations LSC est permise en cytométrie en flux actuellement par l'ajout de nouveaux marqueurs. Le passage en 10 ou 12 couleurs de notre cytomètre Lyric® permettrait l'ajout de marqueurs LSC supplémentaires décrits dans la littérature comme par exemple l'IL1RAP, le CD96, le CD47, le CD44, le CD11b ou encore le CD25 **(84)**.

Augmenter le nombre d'événements à acquérir augmenterait également notre sensibilité et notre certitude à affirmer la présence de ces populations minoritaires de

par la présence de plus gros clusters visibles, arguments forts pour affirmer la présence d'une population cellulaire bien distincte des autres. Cela augmenterait les chances également de ne pas méconnaître la présence de ces populations immatures.

En conclusion, bien que des arguments forts en lien avec la littérature aient pu être mis en évidence dans notre étude quant à notre capacité à affirmer la présence de ces LSC, ces résultats peuvent être discutés. Dans cette étude, nous n'avons pas effectué de tri cellulaire phénotypique sur ces populations afin d'évaluer leur potentiel de régénération leucémique selon les méthodes de LTC-IC, seul argument permettant de valider de façon certaine le caractère LSC des populations retenues. Cependant, ces méthodes ne sont absolument pas réalisables en routine hospitalière de façon personnalisée pour chaque patient.

d. La MRD selon l'approche LSC, une option clinico-biologique intéressante

Certains patients peuvent ne présenter aucun LAIP et aucun marqueur moléculaire pertinent à suivre en MRD (patient n°6 par exemple). Le suivi du pool de de LSC dès lors qu'une sensibilité satisfaisante est atteinte peut être une véritable alternative.

Notre étude, malgré le faible échantillonnage de patients suivis, laisse entrevoir de bons espoirs quant à la mise en place de la recherche de LSC au diagnostic et au suivi de la maladie résiduelle au CHU de Caen selon cette approche. La détection des LSC est rendue possible grâce au panel LSC et a pu être vérifiée au CHU de Caen. Même si l'objectif de notre étude n'était pas de d'évaluer l'impact pronostique de la présence de LSC chez les patients atteints de LAM, nos observations semblent apporter des arguments positifs supplémentaires quant à la mise en place de la détection de ces cellules régénératrices de leucémies dont le pronostic péjoratif a été démontré. Même si actuellement aucune recommandation existe concernant une conduite thérapeutique particulière à suivre en fonction de la détection de LSC au diagnostic ou au suivi, l'exemple du patient n°3 semble percutant.

Ce jeune patient de 18 ans, qui selon la classification de l'ELN actuelle est classé de bon pronostic au diagnostic, rechute précocement sa LAM sur son sous-clone CD34+/CD38- composé de nombreuses LSC alors que son marqueur de suivi

moléculaire (*NPM1*) en MRD2 avait décroît de plus de 4 log sur le sang et quasiment dans la moelle osseuse. Ce patient toujours considéré comme de bon pronostic dans le protocole BIG-1 après l'évaluation en MRD2, n'était pas éligible en premier lieu à l'allogreffe. Lors des points du suivi en CMF selon l'approche LSC nous n'avons pas détecté de LSC résiduelles lors des points de suivi précédant la rechute. Ces LSC sont pourtant probablement responsables de la rechute compte-tenu du phénotype blastique très immature mis en évidence. Plusieurs hypothèses peuvent être émises à ce sujet. En effet, notre sensibilité ne semble pas optimale afin de détecter systématiquement les LSC résiduelles. Si nous avions la possibilité d'augmenter par la suite le nombre d'événements à acquérir pour atteindre 1 million de cellules acquises, peut-être aurions-nous détecté la persistance d'un pool de LSC pouvant être responsable de sa rechute précoce. De plus, ces cellules réputées pour être maintenues quiescentes dans les niches hématopoïétiques parallèlement aux HSC pourraient ne pas systématiquement être présentes dans le prélèvement médullaire. Enfin, la booléenne LSCT2mix pourrait manquer également de sensibilité.

Par ailleurs, le patient n°5 pour lequel une rémission complète n'a jamais été obtenue conserve une maladie résiduelle positive selon l'approche LSC testée dans ce projet. Ces observations nous confortent sur ce qui a été récemment décrit dans la littérature sur le pronostic sombre que peut laisser entrevoir la présence de LSC à fort taux au diagnostic et au suivi.

Dans notre étude, l'approche LSC pour le suivi de la MRD ne rattrape pas tous les patients n'ayant ni LAIP ni marqueurs moléculaires. En effet, aucune des techniques actuellement envisagées ne permet de suivre convenablement le patient n°2.

Malgré toutes ces observations, notre étude manque de puissance du fait de notre faible échantillonnage et n'a pas vocation à tirer des conclusions clinico-biologiques. Compte-tenu de la courte durée de ce travail, des études de survie n'ont pas pu être menées. En revanche, l'inclusion de nouveaux patients perdure et les patients présentés dans ce travail continuent à être suivis.

Ce travail préliminaire au CHU de Caen offre de nombreuses perspectives. D'une part, la comparaison entre les approches LAIP, LSC et la biologie moléculaire

est indispensable afin d'évaluer leurs éventuelles corrélations. De plus, l'objectivation du processus dynamique de maturation du compartiment CD34+/CD38- nous interroge. L'étude de l'expression des différents marqueurs « souches » dans les compartiments plus matures (P8 et P7) semblent également intéressantes lorsque l'on sait qu'une proportion de cellules régénératrices de leucémies peuvent être présentes dans le compartiment CD34+/CD38+ **(62)**. Par ailleurs, les LAM CD34 négatives, non incluses dans ce travail, peuvent représenter jusqu'à 30% des LAM. Dans ce sous-type, les LSC se positionneraient dans le compartiment CD34-/CD38- **(85)**. Ainsi, la perte du CD34 sur des LSC pourrait être une modulation phénotypique à part entière et n'ôterait pas leur potentiel régénératif de leucémie. Il serait donc intéressant d'étudier de manière spécifique les compartiments CD34-/CD38- des LAM correspondantes. Cependant, aucun impact pronostic péjoratif de la présence de LSC dans ce compartiment CD34-/CD38- n'a été démontré à notre connaissance. Ce travail préliminaire nous rappelle combien l'hétérogénéité des LAM complexifie leurs caractérisations de par l'existence d'un processus dynamique de maturation continu.

Un des intérêts clinico-biologiques majeurs de la détection de LSC au diagnostic et au suivi des patients leucémiques est son impact pronostique qui émane de plus en plus dans la littérature **(56)**. D'un point de vue pratique, fournir au clinicien une indication supplémentaire sur la présence de ces populations particulières pourrait à terme permettre d'orienter éventuellement la prise en charge thérapeutique. De plus, de nouveaux scores pronostiques intégrant la présence de ces LSC voient le jour et semblent prometteurs. C'est le cas par exemple du score pronostic LSC17 généré suite à l'étude de gènes en lien avec les cellules souches d'expression différente entre les populations LSC+ et LSC- des patients présentant une LAM. Ainsi, 17 gènes issus des analyses de régression ont montré un impact pronostic péjoratif significatif. Les patients ayant un haut score LSC17 ont un pronostic bien moins bon (échec des thérapies actuelles incluant l'allogreffe) que ceux ayant un score LSC17 plus faible **(86)**.

Actuellement, de nombreux patients de bon ou de pronostic intermédiaire rechutent leur LAM. Ainsi, l'amélioration de la définition des groupes pronostics semblent aujourd'hui nécessaire. L'intégration d'un versant « LSC » dans ces classifications reconnues pourraient peut-être apporter une solution dans la compréhension de ces rechutes chez des patients initialement de bon pronostic.

Malgré la forte valeur pronostique d'une MRD négative, de nombreux patients avec une MRD négative rechutent leur hémopathie, renforçant l'hypothèse de l'existence de ces populations minoritaires régénératrices de leucémies non mises en évidence lors de l'évaluation de la MRD actuellement.

L'évaluation de l'expression des différents marqueurs mis en évidence sur les LSC des patients au diagnostic pourrait dans les prochaines années être primordiale au diagnostic afin de connaître l'éligibilité des patients à des potentielles thérapies ciblant les LSC dont certaines sont déjà en cours d'étude dans des essais cliniques. C'est le cas par exemple, pour l'IMGN632, un anti-CD123 en essai de phase I **(87)**. Les différents essais cliniques en cours sur des thérapies ciblées anti-LSC sont porteurs d'espoir concernant la prise en charge de ces maladies pour lesquelles l'arsenal thérapeutique reste aujourd'hui encore limité.

IV. Applicabilité des approches de la MRD dans les LAM au CHU de Caen

1. Difficultés organisationnelles

La réalisation d'une lyse macrovolume en méthode pré-analytique de préparation de l'échantillon impose un certain remodelage de l'organisation de la paillasse de CMF au CHU de Caen. Compte-tenu du fait que tous les échantillons au laboratoire sont techniqués via la méthode Ficoll®, la réalisation en parallèle d'une lyse macrovolume nous permettant de suivre la pratique de la majorité des centres de CMF nous a imposé une séparation de l'échantillon médullaire dès sa réception au laboratoire. Ainsi, la capacité cellulaire maximale à analyser est d'emblée divisée par deux. Actuellement, les techniciens du laboratoire de CMF ne maîtrisent pas la technique de lyse macrovolume qui s'avère être bien plus chronophage que le Ficoll®. L'intégration de techniques ayant pour vocation d'entraîner un changement dans les protocoles pré-analytiques actuels engendre une augmentation du temps technicien.

Par ailleurs, l'analyse du panel LSC demande des connaissances robustes en oncogénèse et impose la maîtrise de la complexité phénotypique des phénomènes de maturation au sein de toute l'hématopoïèse saine et clonale. Telle qu'elle a été expérimentée et définie dans ce travail de thèse, l'analyse d'un patient au diagnostic d'une LAM par le panel LSC est très chronophage, conséquence des nombreux points de vigilance mis en évidence dans ce travail : fenêtrage initial, report des seuils de positivité sur les différents histogrammes, vérification de « clusterisation » et cohérence clinico-biologique de l'interprétation.

2. Proposition de panel au CHU de CAEN

Grâce à cette étude, une stratégie d'analyse robuste et reproductible pour l'évaluation de la MRD en CMF dans les LAM a pu être établie grâce au panel LSC.

Les tubes 1 à 5 du panel LA actuellement utilisé en routine au CHU de Caen nous semble utilisables pour une approche LAIP solide dès lors que des seuils de positivité sont déterminés sur des MO témoins comme cela a été réalisé dans ce travail pour le LAIP CD7/CD56 sur le tube LSC1. Compte-tenu de l'intérêt pronostic de la présence de LSC, il serait intéressant de rajouter un tube pouvant explorer le compartiment souche à notre panel LA afin de donner une information supplémentaire aux cliniciens. L'ajout de ce tube explorant le compartiment souche dans le panel LA nous semble être actuellement la meilleure option. Cependant, des tests complémentaires sur davantage d'échantillons médullaires sont requis afin d'envisager ultérieurement une mise en place robuste. De plus, les efforts de standardisation motivés par l'existence du groupe MRD CMF LAM LSC devraient offrir de belles perspectives à terme quant à l'harmonisation des pratiques d'évaluation de la MRD dans les différents centres français. Une des forces du panel LSC réside dans son essai à grande échelle permettant l'échange et le partage des données collectées. Les premières conclusions concernant sa robustesse et sa reproductibilité sont prometteuses.

CONCLUSION

Les leucémies aiguës myéloïdes sont des maladies hétérogènes complexes dont le pronostic reste sombre à l'heure actuelle. Ainsi, l'enjeu de l'évaluation de la MRD est double : le suivi de la maladie et son impact pronostique. Grâce à cette période d'essai d'un panel validé et testé en multi-centrique, nos objectifs ont pu être atteints. Tout d'abord, la mise en place d'une stratégie d'analyse détaillée pour l'évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux selon l'approche LAIP/DfN d'une part et l'approche LSC d'autre part permettra une reproductibilité inter-opérateur au CHU de Caen et est permise par la robustesse de notre analyse. Malgré un masque d'analyse robuste permettant une stratégie d'analyse spécifique, le tube LSC1 ne permet pas à lui seul l'application de l'approche LAIP/DfN de par son manque de marqueurs principalement. Le tube LSC2, quant à lui, nous a permis la détection de LSC de façon convaincante lors des diagnostics de LAM. En revanche, les difficultés conceptuelles inhérentes à cette notion de cellule souche leucémique posent dans certains cas la question de la spécificité quand la distinction phénotypique entre les HSC et LSC est parfois discordante dans la littérature mais aussi difficile en pratique, notamment lors des points de suivi de nos patients. Cependant, nos essais offrent des perspectives intéressantes quant à la mise en place en routine des approches combinées LAIP/DfN et LSC. La validité de nos résultats lors de la détermination des LAIP et des LSC au diagnostic et au suivi est d'ailleurs permise par la création de notre pool de moelles témoins, force de notre étude. Ce travail montre également une fois de plus que la maîtrise des conditions pré-analytiques et analytiques est fastidieuse et essentielle pour l'évaluation de la MRD dans les LAM.

De plus en plus d'études visent à évaluer l'intégration de ces nouvelles données de MRD issues de la CMF dans la prise en charge future des patients atteints de LAM et pourraient certainement en apporter une amélioration dans l'avenir. L'essai clinique BIG-1 en fait partie.

Compte-tenu de l'impact pronostic avéré de la MRD et de la présence de LSC au diagnostic et au suivi des LAM, cette première étude sur le sujet au CHU de Caen s'inscrit directement dans les perspectives d'amélioration de notre laboratoire dans la prise en charge des patients atteints de LAM.

BIBLIOGRAPHIE

1. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology. *Cell*. 22 févr 2008;132(4):631-44.
2. Simons BD, Clevers H. Strategies for Homeostatic Stem Cell Self-Renewal in Adult Tissues. *Cell*. 10 juin 2011;145(6):851-62.
3. Sutherland HJ, Eaves CJ, Eaves AC, Dragowska W, Lansdorp PM. Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood*. oct 1989;74(5):1563-70.
4. Cashman JD, Lapidot T, Wang JC, Doedens M, Shultz LD, Lansdorp P, et al. Kinetic evidence of the regeneration of multilineage hematopoiesis from primitive cells in normal human bone marrow transplanted into immunodeficient mice. *Blood*. 15 juin 1997;89(12):4307-16.
5. Adolfsson J, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, et al. Identification of Flt3⁺ Lympho-Myeloid Stem Cells Lacking Erythro-Megakaryocytic Potential: A Revised Road Map for Adult Blood Lineage Commitment. *Cell*. 22 avr 2005;121(2):295-306.
6. Görgens A, Radtke S, Möllmann M, Cross M, Dürig J, Horn PA, et al. Revision of the Human Hematopoietic Tree: Granulocyte Subtypes Derive from Distinct Hematopoietic Lineages. *Cell Rep*. 30 mai 2013;3(5):1539-52.
7. Doulatov S, Notta F, Eppert K, Nguyen LT, Ohashi PS, Dick JE. Revised map of the human progenitor hierarchy shows the origin of macrophages and dendritic cells in early lymphoid development. *Nat Immunol*. juill 2010;11(7):585-93.
8. Schofield R. The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells*. 1978;4(1-2):7-25.
9. Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 23 oct 2003;425(6960):841-6.
10. Fujisaki J, Wu J, Carlson AL, Silberstein L, Putheti P, Larocca R, et al. In vivo imaging of Tregs providing immune privilege to the hematopoietic stem cell niche. *Nature*. 8 juin 2011;474(7350):216-9.
11. Gao X, Xu C, Asada N, Frenette PS. The hematopoietic stem cell niche: from embryo to adult. *Dev Camb Engl*. 22 2018;145(2).
12. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 18 2018;392(10147):593-606.
13. Zuckerman T, Ganzel C, Tallman MS, Rowe JM. How I treat hematologic emergencies in adults with acute leukemia. *Blood*. 6 sept 2012;120(10):1993-2002.
14. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev*. 2019;36:70-87.
15. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006;107(9):2099-107.

16. Defossez G, Le Guyader-Peyrou S, Uhry Z, Grosclaude P, Remonte L, Colonna M. 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. Résultats préliminaires. 2019.
17. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. août 1976;33(4):451-8.
18. Loken MR, van de Loosdrecht A, Ogata K, Orfao A, Wells DA. Flow cytometry in myelodysplastic syndromes: report from a working conference. *Leuk Res*. janv 2008;32(1):5-1.
19. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 2017;129(4):424-47.
20. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
21. Fialkow PJ, Singer JW, Adamson JW, Vaidya K, Dow LW, Ochs J, et al. Acute nonlymphocytic leukemia: heterogeneity of stem cell origin. *Blood*. juin 1981;57(6):1068-73.
22. McCulloch EA. Stem cells in normal and leukemic hemopoiesis (Henry Stratton Lecture, 1982). *Blood*. juill 1983;62(1):1-13.
23. Ding L, Ley TJ, Larson DE, Miller CA, Koboldt DC, Welch JS, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature*. janv 2012;481(7382):506-10.
24. Webster JA, Pratz KW. Acute myeloid leukemia in the elderly: therapeutic options and choice. *Leuk Lymphoma*. févr 2018;59(2):274-87.
25. Stein EM, Tallman MS. Emerging therapeutic drugs for AML. *Blood*. 7 janv 2016;127(1):71-8.
26. Genovese G, Kähler AK, Handsaker RE, Lindberg J, Rose SA, Bakhoum SF, et al. Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N Engl J Med*. 25 déc 2014;371(26):2477-87.
27. Jan M, Snyder TM, Corces-Zimmerman MR, Vyas P, Weissman IL, Quake SR, et al. Clonal evolution of preleukemic hematopoietic stem cells precedes human acute myeloid leukemia. *Sci Transl Med*. 29 août 2012;4(149):149ra118.
28. Young AL, Challen GA, Birmann BM, Druley TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun [Internet]*. 22 août 2016 [cité 12 déc 2019];7. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4996934/>
29. Hartmann L, Metzeler KH. Clonal hematopoiesis and preleukemia-Genetics, biology, and clinical implications. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58(12):828-38.
30. Kreso A, Dick JE. Evolution of the Cancer Stem Cell Model. *Cell Stem Cell*. 6 mars 2014;14(3):275-91.

31. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. févr 1994;367(6464):645-8.
32. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*. juill 1997;3(7):730-7.
33. Thomas D, Majeti R. Biology and relevance of human acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 23 mars 2017;129(12):1577-85.
34. Ho T-C, LaMere M, Stevens BM, Ashton JM, Myers JR, O'Dwyer KM, et al. Evolution of acute myelogenous leukemia stem cell properties after treatment and progression. *Blood*. 29 sept 2016;128(13):1671-8.
35. Farge T, Saland E, Toni F de, Aroua N, Hosseini M, Perry R, et al. Chemotherapy-Resistant Human Acute Myeloid Leukemia Cells Are Not Enriched for Leukemic Stem Cells but Require Oxidative Metabolism. *Cancer Discov*. 1 juill 2017;7(7):716-35.
36. Guan Y, Gerhard B, Hogge DE. Detection, isolation, and stimulation of quiescent primitive leukemic progenitor cells from patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 15 avr 2003;101(8):3142-9.
37. Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. *Nat Immunol*. juill 2004;5(7):738-43.
38. Lagadinou ED, Sach A, Callahan K, Rossi RM, Neering SJ, Minhajuddin M, et al. BCL-2 Inhibition Targets Oxidative Phosphorylation and Selectively Eradicates Quiescent Human Leukemia Stem Cells. *Cell Stem Cell*. 7 mars 2013;12(3):329-41.
39. Rümke CL, Bezemer PD, Kuik DJ. Normal values and least significant differences for differential leukocyte counts. *J Chronic Dis*. déc 1975;28(11-12):661-8.
40. Rafei H, Kantarjian HM, Jabbour EJ. Recent advances in the treatment of acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2019;60(11):2606-21.
41. Preudhomme C. Role of minimal residual disease in the management of acute myeloid leukaemias. *Hématologie*. 1 juin 2019;25(2):3-16.
42. Hourigan CS, Gale RP, Gormley NJ, Ossenkoppele GJ, Walter RB. Measurable residual disease testing in acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. 2017;31(7):1482-90.
43. Buccisano F, Hourigan CS, Walter RB. The Prognostic Significance of Measurable (« Minimal ») Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Hematol Malig Rep*. 2017;12(6):547-56.
44. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 22 mars 2018;131(12):1275-91.
45. Della Starza I, Chiaretti S, De Propriis MS, Elia L, Cavalli M, De Novi LA, et al. Minimal Residual Disease in Acute Lymphoblastic Leukemia: Technical and Clinical Advances. *Front Oncol* [Internet]. 7 août 2019 [cité 18 oct 2020];9. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6692455/>

46. Bewersdorf JP, Shallis RM, Boddu PC, Wood B, Radich J, Halene S, et al. The minimal that kills: Why defining and targeting measurable residual disease is the « Sine Qua Non » for further progress in management of acute myeloid leukemia. *Blood Rev.* 20 déc 2019;100650.
47. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, Baran Y, Nalbant A. Flow cytometry: basic principles and applications. *Crit Rev Biotechnol.* mars 2017;37(2):163-76.
48. Kern W, Danhauser-Riedl S, Ratei R, Schnittger S, Schoch C, Kolb H-J, et al. Detection of minimal residual disease in unselected patients with acute myeloid leukemia using multiparameter flow cytometry for definition of leukemia-associated immunophenotypes and determination of their frequencies in normal bone marrow. *Haematologica.* juin 2003;88(6):646-53.
49. Kern W, Bacher U, Haferlach C, Schnittger S, Haferlach T. The role of multiparameter flow cytometry for disease monitoring in AML. *Best Pract Res Clin Haematol.* sept 2010;23(3):379-90.
50. Baer MR, Stewart CC, Dodge RK, Leget G, Sulé N, Mrózek K, et al. High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood.* 1 juin 2001;97(11):3574-80.
51. Fuda F, Chen W. Minimal/Measurable Residual Disease Detection in Acute Leukemias by Multiparameter Flow Cytometry. *Curr Hematol Malig Rep.* 2018;13(6):455-66.
52. Saxena A, Sheridan DP, Card RT, McPeck AM, Mewdell CC, Skinnider LF. Biologic and clinical significance of CD7 expression in acute myeloid leukemia. *Am J Hematol.* août 1998;58(4):278-84.
53. Kern W, Voskova D, Schoch C, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Determination of relapse risk based on assessment of minimal residual disease during complete remission by multiparameter flow cytometry in unselected patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 15 nov 2004;104(10):3078-85.
54. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 nov 2013;31(31):3889-97.
55. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 2001;62-86.
56. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, et al. Leukemic Stem Cell Frequency: A Strong Biomarker for Clinical Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *PLOS ONE.* 22 sept 2014;9(9):e107587.
57. van Rhenen A, Moshaver B, Kelder A, Feller N, Nieuwint AWM, Zweegman S, et al. Aberrant marker expression patterns on the CD34+CD38- stem cell compartment in acute myeloid leukemia allows to distinguish the malignant from the normal stem cell compartment both at diagnosis and in remission. *Leukemia.* août 2007;21(8):1700-7.
58. Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Rohatiner AZ, Lister TA, Kelly G, et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 15 déc 2005;106(13):4086-92.
59. Baum CM, Weissman IL, Tsukamoto AS, Buckle AM, Peault B. Isolation of a candidate human hematopoietic stem-cell population. *Proc Natl Acad Sci.* 1 avr 1992;89(7):2804-8.

60. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. *Blood*. 1 mai 1997;89(9):3104-12.
61. Kersten B, Valkering M, Wouters R, van Amerongen R, Hanekamp D, Kwidama Z, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. avr 2016;173(2):219-35.
62. Goardon N, Marchi E, Atzberger A, Quek L, Schuh A, Soneji S, et al. Coexistence of LMPP-like and GMP-like leukemia stem cells in acute myeloid leukemia. *Cancer Cell*. 18 janv 2011;19(1):138-52.
63. Al-Mawali A, Pinto AD, Al-Zadjali S. CD34+CD38-CD123+ Cells Are Present in Virtually All Acute Myeloid Leukaemia Blasts: A Promising Single Unique Phenotype for Minimal Residual Disease Detection. *Acta Haematol*. 2017;138(3):175-81.
64. Bras AE, de Haas V, van Stigt A, Jongen-Lavrencic M, Beverloo HB, Te Marvelde JG, et al. CD123 expression levels in 846 acute leukemia patients based on standardized immunophenotyping. *Cytometry B Clin Cytom*. 2019;96(2):134-42.
65. Zhu C, Anderson AC, Schubart A, Xiong H, Imitola J, Khoury SJ, et al. The Tim-3 ligand galectin-9 negatively regulates T helper type 1 immunity. *Nat Immunol*. déc 2005;6(12):1245-52.
66. Granier C, Gey A, Dariane C, Mejean A, Timsit M-O, Blanc C, et al. Tim-3 - Biomarqueur et cible thérapeutique en cancérologie. *médecine/sciences*. 1 mars 2018;34(3):231-7.
67. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. *Cell Stem Cell*. 3 déc 2010;7(6):708-17.
68. Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 mars 2011;108(12):5009-14.
69. Bakker ABH, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, van Meijer M, Bia JA, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. *Cancer Res*. 15 nov 2004;64(22):8443-50.
70. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood*. 1 oct 2007;110(7):2659-66.
71. Hamann J, Aust G, Araç D, Engel FB, Formstone C, Fredriksson R, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCIV. Adhesion G protein-coupled receptors. *Pharmacol Rev*. 2015;67(2):338-67.
72. Jaspars LH, Vos W, Aust G, Van Lier RA, Hamann J. Tissue distribution of the human CD97 EGF-TM7 receptor. *Tissue Antigens*. avr 2001;57(4):325-31.
73. Martin GH, Roy N, Chakraborty S, Desrichard A, Chung SS, Woolthuis CM, et al. CD97 is a critical regulator of acute myeloid leukemia stem cell function. *J Exp Med*. 7 oct 2019;216(10):2362-77.

74. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34 + CD38 – leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. mai 2019;33(5):1102-12.
75. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for « prime time »? *Blood*. 27 nov 2014;124(23):3345-55.
76. Dix C, Lo T-H, Clark G, Abadir E. Measurable Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia Using Flow Cytometry: A Review of Where We Are and Where We Are Going. *J Clin Med* [Internet]. 3 juin 2020 [cité 21 oct 2020];9(6). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7357042/>
77. Béné MC. Maladie résiduelle dans les leucémies aiguës : qu'est-ce que l'on sait, qu'est-ce que l'on attend ? - Minimal residual disease in acute leukemia: what is known? What is expected? *Mise Au Point*. 2006;11.
78. Camburn AE, Petrasich M, Ruskova A, Chan G. Myeloblasts in normal bone marrows expressing leukaemia-associated immunophenotypes. *Pathology (Phila)*. août 2019;51(5):502-6.
79. Hanekamp D, Bachas C, van de Loosdrecht A, Ossenkoppele G, Cloos J. Re: Myeloblasts in normal bone marrows expressing leukaemia-associated immunophenotypes. *Pathology (Phila)*. 2020;52(2):289-91.
80. Hussen KA, Chabaane E, Canque B. Organisation bipartite de la lymphopoïèse humaine. *médecine/sciences*. 1 août 2018;34(8-9):665-70.
81. Zeijlemaker W, Kelder A, Cloos J, Schuurhuis GJ. Immunophenotypic Detection of Measurable Residual (Stem Cell) Disease Using LAIP Approach in Acute Myeloid Leukemia. *Curr Protoc Cytom* [Internet]. déc 2019 [cité 5 déc 2019];91(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6856793/>
82. Joudinaud R. Cytométrie en flux dans les syndromes myélodysplasiques: étude de l'hématopoïèse et apport de nouveaux marqueurs. Poster présenté à: 40ème Congrès annuel de la Société Française d'Hématologie; 2020 sept; Paris.
83. Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: Seek and Destroy [Internet]. *Medscape*. [cité 11 nov 2020]. Disponible sur: <http://www.medscape.com/viewarticle/715710>
84. Pollyea DA, Jordan CT. Therapeutic targeting of acute myeloid leukemia stem cells. *Blood*. 23 2017;129(12):1627-35.
85. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. mai 2017;105(5):549-57.
86. Ng SWK, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature*. déc 2016;540(7633):433-7.
87. Kovtun Y, Jones GE, Adams S, Harvey L, Audette CA, Wilhelm A, et al. A CD123-targeting antibody-drug conjugate, IMG632, designed to eradicate AML while sparing normal bone marrow cells. *Blood Adv*. 24 2018;2(8):848-58.

ANNEXES

Annexe 1 : Amendement au protocole BIG-1 pour l'évaluation de la MRD dans les LAM



Fiche d'information MRD CMF LAM LSC Etude prospective observationnelle

Coordonneurs pour ALFA
Adriana PLESA et Christophe ROUMIER

Ceci concerne tous les patients inclus dans le protocole BIG
par les centres affiliés ALFA et ou FILO

La recherche des LSC (Leukemia Stem Cells) et l'évaluation de la MRD (Maladie Résiduel) en cytométrie multiparamétrique seront réalisés prospectivement au diagnostic et en différents points de suivi, ainsi qu'en pré et post-allogreffe et à la rechute.

Cette analyse est complémentaire et s'ajoute aux paramètres génétiques et moléculaires déjà explorés pour les patients inclus dans cet essai, selon les recommandations de l'ELN (reff Blood 2017 et Blood 2018)

Ceci sera réalisé dans les laboratoires appartenant au groupe d'étude de la MRD cytométrie LAM du BIG (liste des laboratoires en Annexe 1).

Pour cela, **1-2 mL de moelle osseuse sur tube EDTA** seront prélevés dans chaque centre clinique au diagnostic et aux différents points de suivi (MRD1, MRD2, MRD3, MRD4 et rechute éventuelle) et acheminés aux laboratoires associés dans un délai < 24h.

Le protocole utilisé est standardisé et opérationnel dans les 26 laboratoires de cytométrie participants depuis Octobre 2017. La méthodologie permet de déterminer tout à la fois la présence des LSC au diagnostic et en suivi, en se basant sur les marqueurs actuellement proposés dans la littérature (reff Shurhuis), et la MRD par une approche couplant LAIP (Leukemia Abberant ImmunoPhenotype) et DFN (Different of Normal).

Les résultats seront exprimés de façon harmonisé, et inclus dans la base des données biologiques de l'essai du BIG.

Annexe 1 : Liste des laboratoires CMF

Annexe 2 : Protocole technique CMF

Annexe 3 - Fiche de renseignement Cytométrie

Les tubes de Moelle sur EDTA seront à adresser le jour même du prélèvement aux laboratoires CMF avec fiche ad hoc (Annexe 3).

Les envois seront effectués via DHL avec le N° de compte DHL-BIG : **223736377**

	METHODOLOGIE-Protocole technique	
ALFA/FILO	MALADIE RESIDUELLE (CMF) LAM BIG ALFA	V : 01
Groupe myéloïde étude de la MRD LAM cytométrie ALFA		Applicable au : 18/10/2017
		Page 1 sur 4

Prise en charge des prélèvements de MRD CMF dans les LAM du BIG

Cette analyse est complémentaire et s'ajoute aux paramètres génétiques et moléculaires déjà explorés pour les patients inclus dans cet essai, selon les recommandations de l'ELN (reff Blood 2017 et Blood 2018)

Introduction

L'évaluation de la MRD en cytométrie en flux pour l'essai BIG repose sur une triple approche :

- 1- Mise en évidence de **LAIP** (Leukemia Associated ImmunoPhenotype) au diagnostic puis en suivi sur la population blastique
- 2- Mise en évidence de blastes présentant une différenciation myéloïde non physiologique (**DFN approche**)
- 3- Mise en évidence de **LSC (Leukemic Stem Cell)** au diagnostic et en suivi (analyse détaillée du compartiment des blastes CD34+CD38-)

Ce mode d'évaluation de la MRD repose sur les publications suivantes qui ont montré la valeur pronostic des résultats obtenus.

- *LAIP (Kern, Venditti, Wood, Schuurhuis, Freeman ...)*
- *Backbone 34/38 CSH/LSC approach (Dick&Bonnet, Nature 2009)*
- *LMPP-like/GMP-like LSC approach (Goardon, Cancer Cell 2011)*
- *LSC Flow Signature (Schuurhuis, PlosOne2014): quantification at dg and in MRD follow up*

L'obtention de résultats reproductibles pour un suivi oligocentrique repose sur l'harmonisation:

- * de la méthodologie
- * de la stratégie d'analyse
- * du mode d'expression des résultats pour les laboratoires participants
 - *A QA programme for MRD testing demonstrates that systematic education can reduce discordance among experienced interpreters (Keeney et al, cytometry 2017)*

Méthodologie

- **Evaluer la dilution du prélèvement de MO** : calculer le pourcentage d'hémodilution par ex formule de Brooimans
- **Etaler un frottis du tube EDTA** de Moelle et établir la formule médullaire au microscope

	METHODOLOGIE-Protocole technique	
ALFA/FILO	MALADIE RESIDUELLE (CMF) LAM BIG ALFA	V : 01
Groupe myéloïde étude de la MRD LAM cytométrie ALFA		Applicable au : 18/10/2017
		Page 2 sur 4

- **Déterminer les LAIP** présents au diagnostic et vérifier les combinaisons utilisées lors des MRD déjà réalisées (le suivi de la MRD implique que le phénotype sur le prélèvement du diagnostic ait été réalisé dans un laboratoire ayant adopté cette méthodologie commune).
- **Réaliser une lyse macrovolume- (Bulk Lyse)** (NH4CL, BD PharmLyse, Versalyse) et ajuster la suspension cellulaire à 10 millions de cellules/ml
- **Distribuer les anticorps dans les tubes T1 + T2 + T3 (optionnel) comme suit :**

	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8
T 1	CD7/56	CD13	CD33	CD34	CD38	CD117	CD19	CD45
T 2	CD90	MIX : TIM3+CLL1	CD123	CD34	CD38	CD117	CD45RA	CD45
T 3	CD36	CD11b	CD33	CD34	HLADR	CD117	CD4	CD45

**Rajout du CD56 FITC si marqueur présent au diagnostic*

- **Incuber 1 à 1,5 million de cellules/tube** avec les anticorps 15 min à l'abri de la lumière à température ambiante, rincer avec du PBS et centrifuger 5min à 430g, reprendre dans 500µL de PBS
- **Passage au cytomètre : acquérir idéalement au moins 500 000 évènements** pour chaque tube.

Expression des résultats

A) Dilution du prélèvement de la moelle et représentativité médullaire de l'échantillon (ex Nbre de MNC CD34+)

B) Quantification de LSC au diagnostic

- Profil utilisée pour identifier les LSC ex: CD34+CD38-CD90-CD45RA+CLL1+TIM3+CD33+
- Résultats : Valeur observé en % des blastes totaux
(LSC >1% des blastes totaux : valeur pronostic péjoratif).

	METHODOLOGIE-Protocole technique	
ALFA/FILO		V : 01
Groupe myéloïde étude de la MRD LAM cytométrie ALFA	MALADIE RESIDUELLE (CMF) LAM BIG ALFA	Applicable au : 18/10/2017
		Page 3 sur 4

C) MRD approche LAIP/DFN

- Profil LAIP utilisé pour identifier la MRD ex : CD34+CD38+f CD13+/- CD33++CD117+CD7+CD19+
- Sensibilité de l'analyse = valeur la moins sensible entre le seuil technique et la valeur « physiologique » observée pour le profil LAIP étudié sur des Moelles de référence (limite de détection LOD)

- Résultats

Positif ($>10^{-3}$) : Valeur chiffrée en % des leucocytes totaux (CD45+)

Négatif ($<10^{-3}$) :

- Détectable : valeur chiffrée et seuil de sensibilité
- Non détectable ; < au seuil de sensibilité de l'analyse

Avec commentaire si nécessaire sur l'origine de cette non détection ex : plvmt hémodilué, LAIP peu sensible, mauvais seuil technique.

D) MRD approche LSC

- Profil utilisé pour identifier les LSC ex CD34+ CD38- CD90- CD45RA+ CLL1+ TIM3+ CD33+
- Sensibilité de l'analyse=valeur la moins sensible entre le seuil technique et la valeur « physiologique » observée pour le profil LSC suivi sur des Moelles de référence (limite de détection LOD)

- Résultats

Positif ($>10^{-4}$) : Valeur chiffrée en % des leucocytes totaux (CD45+)

Négatif ($<10^{-4}$) :

- Détectable : valeur chiffrée et seuil de sensibilité
- Non détectable : < au seuil de sensibilité de l'analyse

Avec commentaire si nécessaire sur l'origine de cette non détection ex : prélèvement hémodilué, LSC peu sensible, mauvais seuil technique.

	METHODOLOGIE-Protocole technique	
ALFA/FILO	MALADIE RESIDUELLE (CMF) LAM BIG ALFA	V : 01
<i>Groupe myéloïde étude de la MRD LAM cytométrie ALFA</i>		Applicable au : 18/10/2017
		Page 4 sur 4

NB1 : Pour chaque point de suivi l'interprétation des résultats de CMF sera intégrée avec les précédents points (signaler si modulation du profil phénotypique au cours du traitement, dynamique de la MRD CMF : augmentation/stable/diminution).

NB2 : Ces résultats seront transmis à l'investigateur demandeur sous forme de compte rendu biologique par courrier, dans un délai dépendant de votre Laboratoire CMF référent.

Annexe 2 : Protocole Ficoll ®

Principe : Séparation des cellules mono-nucléées des autres composants du sang ou de la moelle par gradient de densité (hématies, plaquettes, plasma)

Technique :

- Verser un tube de 4mL de Ficoll ® dans un tube conique de 10 mL identifié avec le nom du patient et le type de prélèvement (MO)
- Déposer délicatement 4mL de moelle en PBS sans Azide sur le Ficoll ® avec une pipette Pasteur souple
- Centrifuger à 1650 tours/minute pendant 25 minutes sans frein à +20°C
- Après la centrifugation, recueillir l'anneau de leucocytes à l'interface Ficoll ®/plasma avec une pipette Pasteur souple
- Le déposer dans un tube conique de 10 mL identifié avec le nom du patient et le type de prélèvement. Compléter avec du PBS sans Azide/SVF 10%
- Mélanger et centrifuger 5 minutes à 1650 tours/minute
- Eliminer le surnageant dans un récipient dédié aux déchets
- Homogénéiser le culot en grattant le fond du tube conique sur un portoir métallique puis compléter avec du PBS sans Azide/SVF 10%
- Bien mélanger et centrifuger 5 minutes à 1650 tours/minutes
- Eliminer le surnageant comme précédemment et homogénéiser le culot cellulaire.
- Ajouter au minimum 2 mL de Cell Wash ® (PBS Azide/SVF 10%) et homogénéiser de nouveau
- Disposer les cellules dans un tube à hémolyse identifié avec le nom du patient et le type de prélèvement
- Compter les cellules sur un automate de numération et ajuster la suspension à 10^6 cellules par mL
- Effectuer une lyse « Lyse DAKO » sur l'automate BD Lyse Wash Assistant ® (Becton-Dickinson)

Annexe 3 : Protocole Lyse Macrovolume

Principe : Lyse des globules rouges médullaires

Technique :

- Transférer l'équivalent de 10×10^6 cellules nucléées au minimum dans un tube Falcon® de 50mL
- Remplir le tube Falcon® jusqu'à 50 mL avec de la solution de lyse NH_4CL (préparation maison)
- Agiter énergiquement par retournement 20 fois et incuber 15 minutes à température ambiante sur un agitateur par retournement lent
- Centrifuger à 800 g pendant 10 minutes et ôter le surnageant par retournement unique
- Ajouter 2mL de PBS sans Azide/SVF 10%, remettre en suspension le culot cellulaire à l'aide d'une pipette Pasteur et vortexer à vitesse modérée
- Compléter à 50 mL avec du PBS sans Azide/SVF 10% et agiter par retournement 5 fois
- Centrifuger à 800 g pendant 5 minutes et ôter le surnageant par un unique retournement
- Re-suspendre le culot cellulaire avec 2mL de Cell Wash® (PBS Azide/SVF 10%) en vortexant doucement
- Transférer le volume dans un tube conique de 5mL
- Nettoyer le tube Falcon de 50mL avec 2mL de Cell Wash® en insistant sur les parois par retournement et transférer ce volume dans le tube conique de 5mL
- Centrifuger à 540 g pendant 5 minutes et ôter l'excès de surnageant de façon à ce qu'il reste environ 1mL de surnageant
- Re-suspendre le culot cellulaire dans le volume restant
- Compter les cellules sur un automate de numération et ajuster la suspension cellulaire à 10^6 cellules par mL
- Effectuer un cycle de lavage « WASH Only » sur l'automate BD Lyse Wash Assistant® (Becton-Dickinson)

Acquérir dans la mesure du possible 500 000 événements (si possible CD45+)

Tube LSC1 :

- Réglage des compensations avec affichage de tous les dot plot de compensation dans un onglet spécifique
- Sélection des cellules vivantes sur dot plot FSC/SSC avec éliminations des débris et des cellules mortes.
- Création de la fenêtre MNC sans les granuleux
- Elimination des doublets sur fenêtre FSC-W/FSC-H
- Vérification de l'acquisition sur graphique Singles Time (élimination acquisition aspécifique/ vérification absence de « bouchage »)
- Sur graphique SSC/CD45 → identification des populations « Blastes », « Granulocytes », « Lymphocytes », « Monocytes », « CD45 négatif »
- Vérification du contrôle de marquage des lymphocytes B et T/NK sur le plot CD19 VS CD7/CD56
- Sélection des MNC34+ sur plot CD34/CD45
- Sélection de la population CD19+ en SSC/CD19

Identification de 4 populations selon l'intensité du CD38 → Plasmocytes, P8, P7 et P6 :

- Détermination du seuil entre P8 et Plasmocytes par rapport à la positivité majeure du CD38 pour les plasmocytes
- Détermination du seuil P8/P7 par rapport à l'intensité du CD38 des hématogones *(La quantification des hématogones sera affinée sur un plot CD33/CD19 afin de retirer d'éventuels blastes myéloïdes contenus dans la fenêtre de gating des CD19+)*
- Détermination du seuil P7/P6 = seuil de positivité du CD38 déterminé par rapport aux granuleux CD45 intermédiaire (pas les monos) → afficher population rose « granuleux » sur le dot plot CD45/CD38 conditionné sur « Blastes + Lymphos »

Population P6 = population d'intérêt pour rechercher les HSC et les LSC → CD34+/CD38-

MRD LAIP : Recherche du LAIP (dans notre étude : détermination du LAIP CD7/CD56) :

Détermination du seuil de positivité du CD7/CD56 :

Si distinction nette entre la population lymphocytaire B et T/NK → prendre le seuil de positivité à la vallée entre les deux populations → **VERIFICATION** du seuil de positivité sur l'auto-fluorescence des blastes → décaler le seuil si besoin

Détermination du seuil de positivité des marqueurs CD34, CD13, CD33 et CD117:

Prendre sur les lymphocytes CD45 (fin des négatifs)

Détermination du seuil de positivité du CD19 : (attention difficile, fluorochrome faible, intensité faible pour ce marqueur)

Créer si besoin un « density plot » CD45/CD19 en affichant les blastes myéloïdes 34+/117+ les plus forts et les HTG19+/33- → mettre le seuil à la frontière des deux populations

Vérifier systématiquement la cohérence des placements de seuils et des images !

Placement des fenêtres LAIP : Histogrammes conditionnés sur population **BL34+/- et 117+/-**

- Prendre toute la population sur les fenêtres n'étudiant pas le marqueur LAIP d'intérêt.
- Se mettre au seuil et encadrer la population positive pour le LAIP choisi pour les autres fenêtres

MRD LAIP = intersection des 10 fenêtres LAIP → quantification MRD

Vérification « clusterisation »

Sélection et quantification des « LSC probables » sur T1 :

Booléenne LSCT1 = CD33 OR CD7 OR CD19 et CD13 ou CD117

Reporter les seuils déterminés auparavant pour les marqueurs du tube sur les plots étudiant la population « MNC34+ » (CD38/CD13 ; CD38/CD33 ; CD38/CD117 ; CD38/CD34 ; CD38/CD19, CD38/CD7-56))

Vérifier la « **clusterisation** » de la booléenne LSCT1 sur des plots CD45/FSC et CD45/SSC.

Affiner si besoin ou si possible la quantification des LSCT1 en créant une nouvelle population et en s'affranchissant des potentielles HSC ou des points marqués de façon aspécifique.

(En théorie, les LSC ont une taille et une structure plus importante que les HSC, la comparaison de l'intensité du CD45 entre les LSC et les HSC semble délicate.)

Vérifier que le cluster LSC ait un phénotype « LMPPlike » plutôt que « CSHlike »

Tube LSC2 :

- Réglage des compensations avec affichage de tous les dot plot de compensation dans un onglet spécifique
- Sélection des cellules vivantes sur dot plot FSC/SSC avec éliminations des débris et des cellules mortes.
- Création de la fenêtre MNC sans les granuleux
- Élimination des doublets sur fenêtre FSC-W/FSC-H
- Vérification de l'acquisition sur graphique Singles Time (élimination acquisition aspécifique/ vérification absence de « bouchage »)
- Sur histogramme SSC/CD45 → identification des populations « Blastes », « Granulocytes », « Lymphocytes », « Monocytes », « CD45 négatif » (*être le plus reproductible possible avec le même « gating » effectué sur le tube LSC1*)
- Sélection des MNC34+ sur plot CD34/CD45 (*être le plus reproductible possible avec le même « gating » effectué sur le tube LSC1*)

Identification de 3 populations selon l'intensité du CD38 → P8, P7 et P6 :

Report des seuils définis sur le Tube 1 pour la détermination de P8, P7, P6

MRD LAIP MIX : (dans notre étude : détermination du phénotype « LSC » type sur l'ensemble des Blastes CD34+/- CD117+/-)

Détermination des seuils de positivité des marqueurs « souches » :

(Absence de contrôle positif interne fiable pour la détermination des seuils de positivité des marqueurs « souches »)

→ Placement des seuils de positivité du CD90, du MIX, du CD123 et du CD45RA sur les érythroblastes CD45- (fin de la négativité pour ces marqueurs)

(Attention deux populations souvent visibles en marquage MIX pour les érythroblastes

→ se placer après la deuxième)

Sélection et quantification des « LSC » sur le tube LSC2 : (plus spécifique, marqueurs « souches »)

Booléenne LSCT2 = CD123+ OR CD45RA+ OR MIX+

Reporter les seuils déterminés auparavant pour les marqueurs du tube sur les plots étudiant la population « MNC34+ » (CD38/CD90 ; CD38/MIX ; CD38/CD123; CD38/CD45RA)

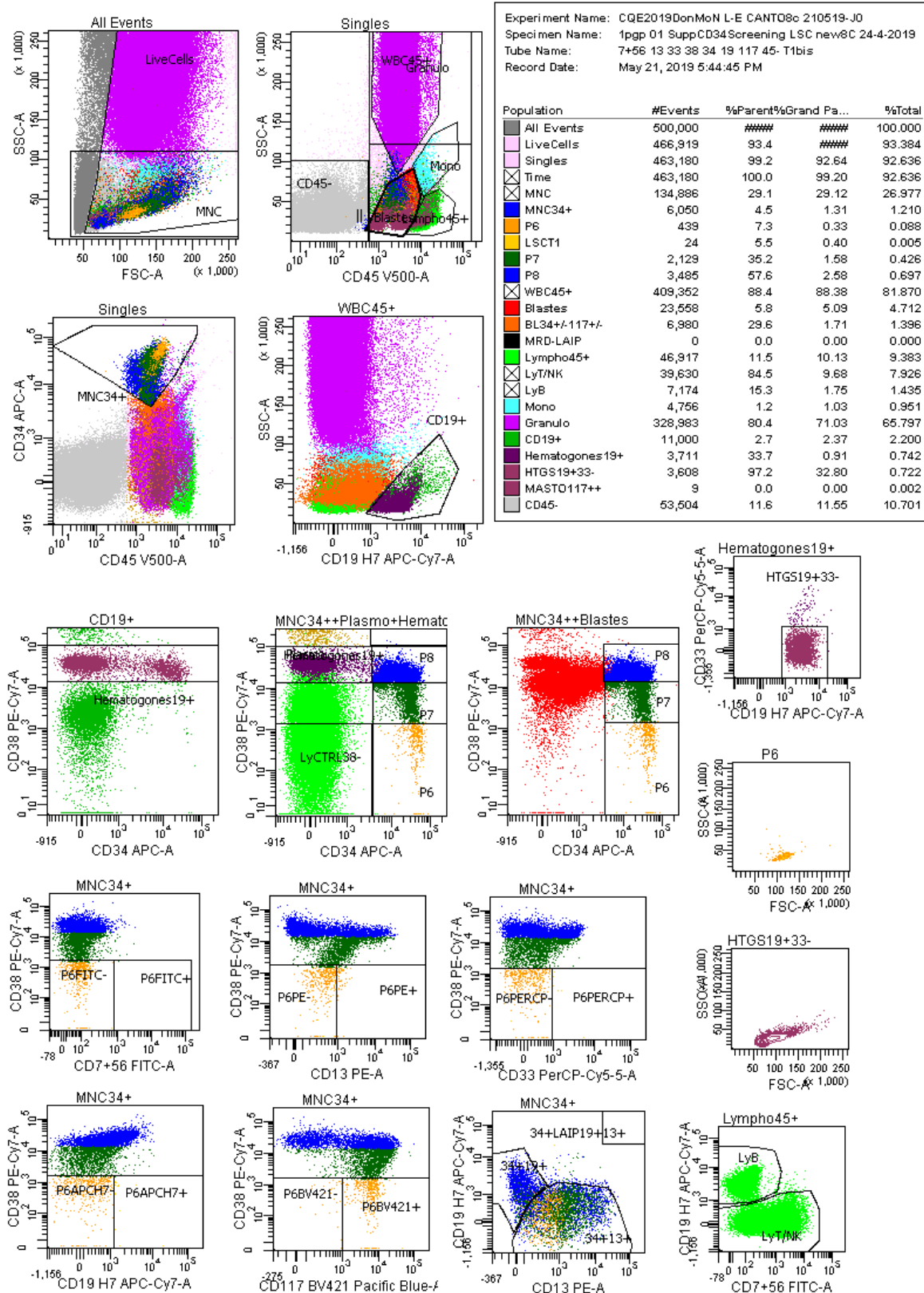
(reprendre le seuil du CD117 déterminé sur le tube LSC1)

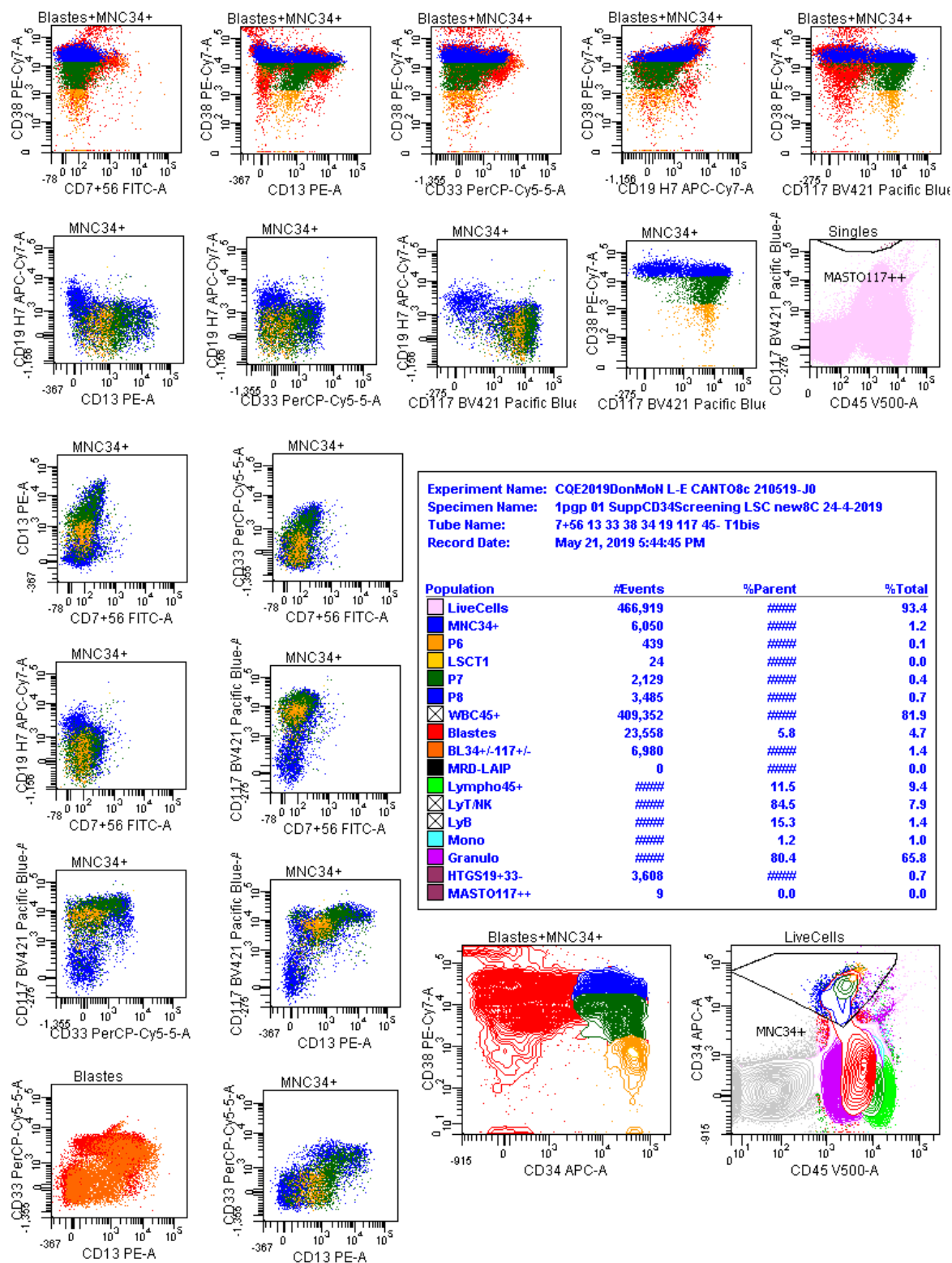
Vérifier la « **clusterisation** » de la booléenne LSCT2 sur des histogrammes CD45/FSC et CD45/SSC.

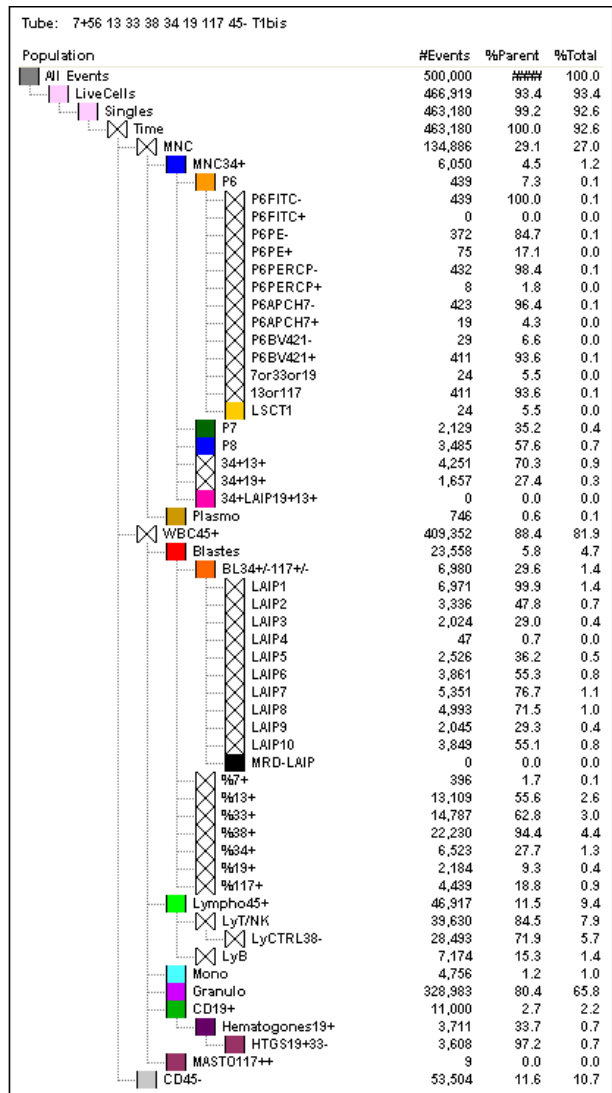
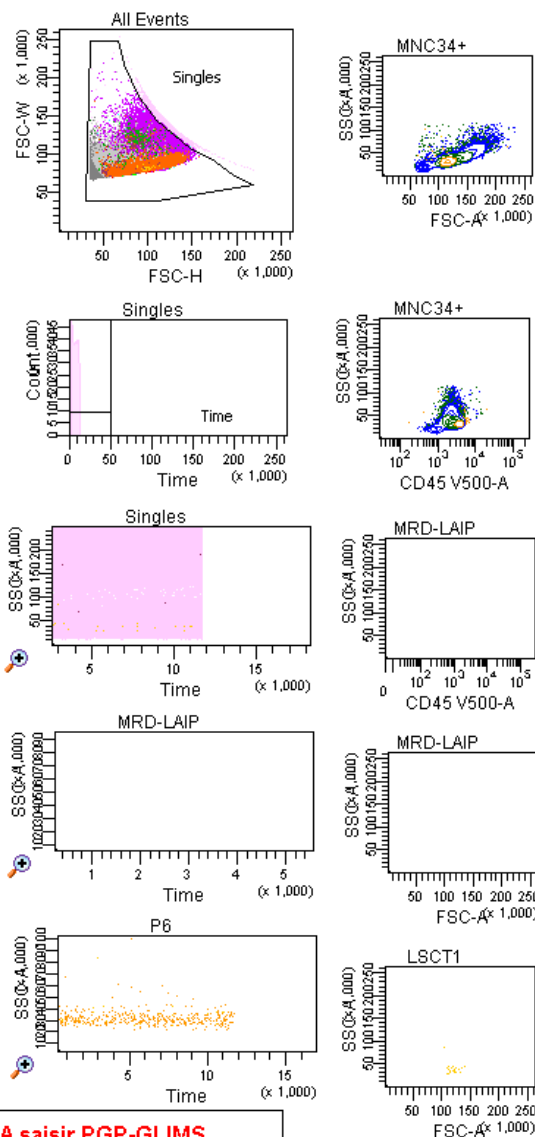
Affiner si besoin ou si possible la quantification des LSCT2 en créant une nouvelle population.

(En théorie, les LSC ont une taille et une structure plus importante que les HSC, la comparaison de l'intensité du CD45 entre les LSC et les HSC semble délicate.)

Annexe 5 : Masque d'analyse du tube LSC1 du panel LSC (CQE2019DonMoN)

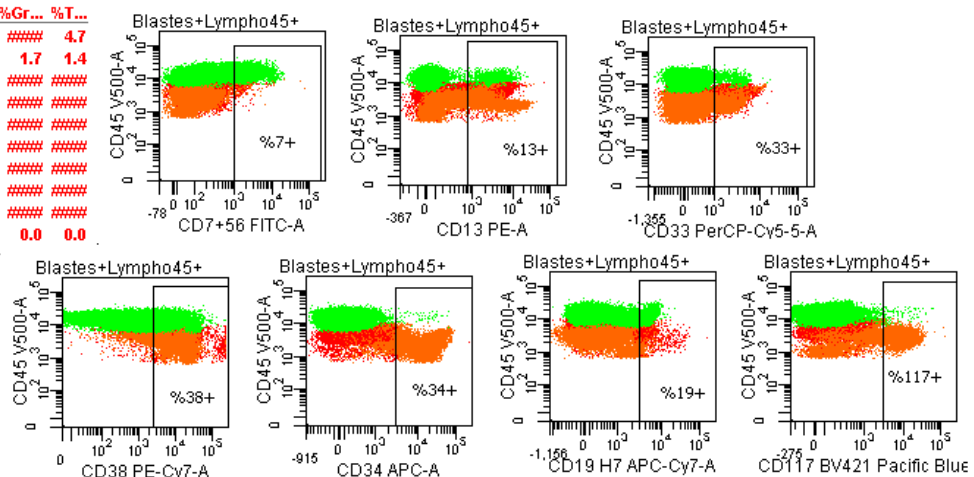


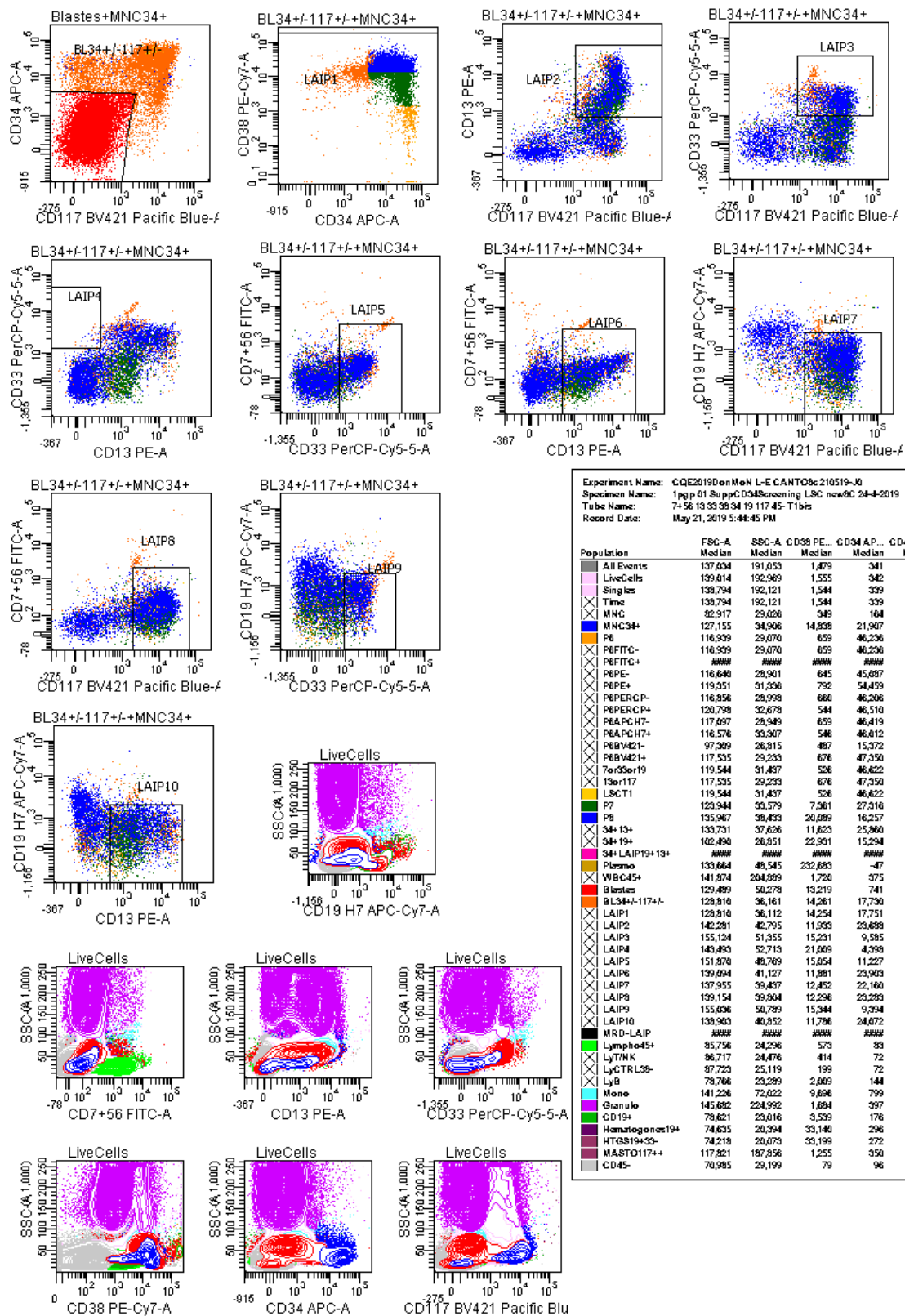




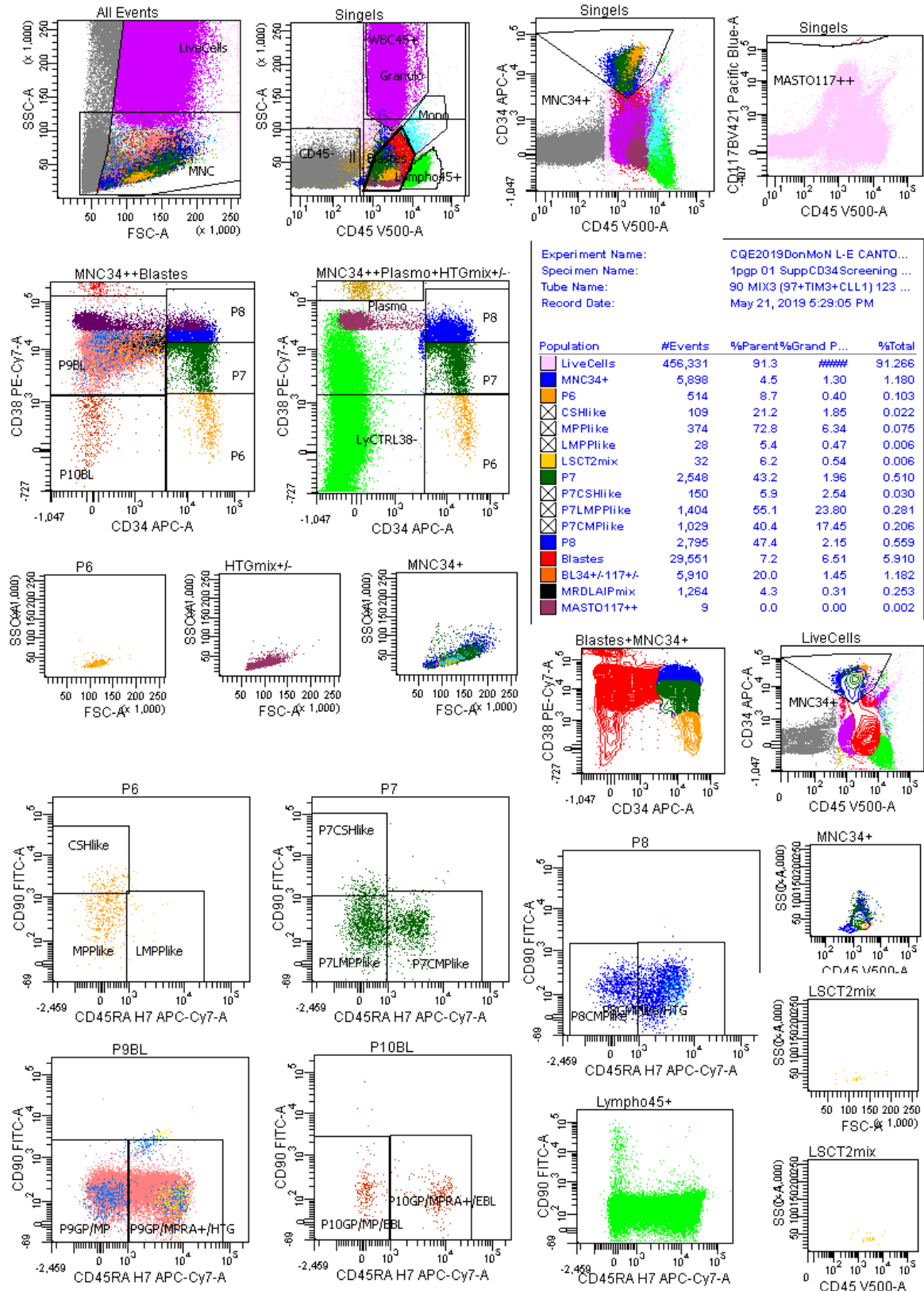
A saisir PGP-GLIMS

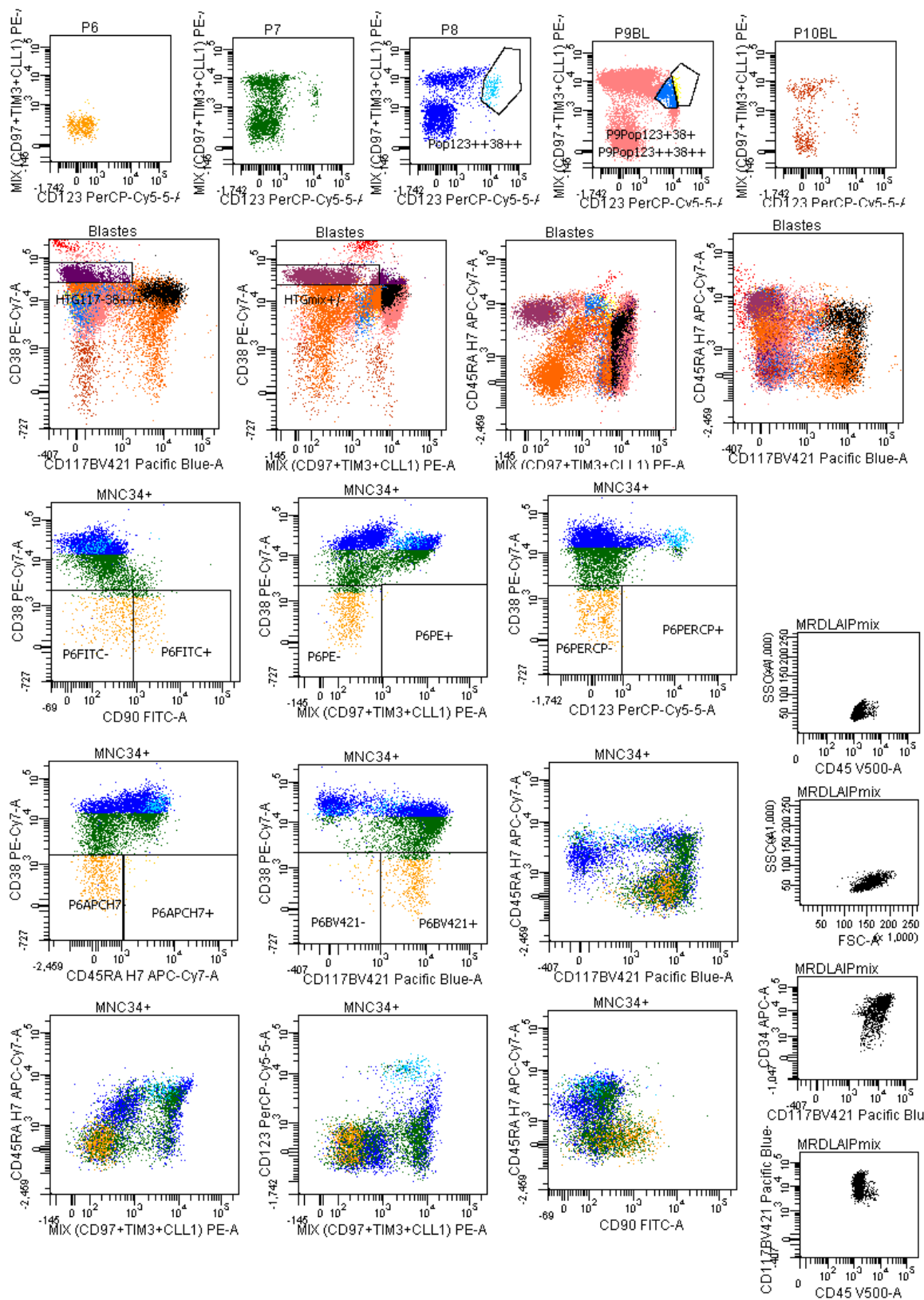
Population	%P...	%Gr...	%T...
Blastes	5.8	####	4.7
BL34+/-117+/-	####	1.7	1.4
%7+	1.7	####	####
%13+	55.6	####	####
%33+	62.8	####	####
%38+	94.4	####	####
%34+	27.7	####	####
%19+	9.3	####	####
%117+	18.8	####	####
MAST0117++	0.0	0.0	0.0





Annexe 6 : Masque d'analyse du tube LSC2 du panel LSC (CQE2019DonMoN)







VU, LE PRESIDENT DU JURY

CAEN, LE

VU, LE DIRECTEUR DE LA FACULTE
DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

CAEN, LE

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

TITRE

EVALUATION DE L'APPROCHE LAIP/LSC (LEUKEMIA ASSOCIATED IMMUNOPHENOTYPE/LEUKEMIC STEM CELLS) DANS LE DIAGNOSTIC ET LE SUIVI DES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES CHEZ L'ADULTE

Résumé

Actuellement, de nombreux patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM) rechutent après traitement. La recherche de la maladie résiduelle minimale (MRD), capitale pour l'évaluation de l'efficacité des thérapeutiques et pour le pronostic, manque de standardisation en cytométrie en flux (CMF). Aujourd'hui, l'approche LAIP/DfN a pour but de traquer les blastes au phénotype aberrant associé à la leucémie (LAIP) tandis que l'approche LSC, plus novatrice, a pour objectif d'évaluer la présence de cellules souches leucémiques (LSC) dans le compartiment de l'immaturité myéloïde CD34+/CD38-. Ces LSC sont stipulées comme étant à l'origine des rechutes. Cette étude prospective de janvier 2020 à septembre 2020, incluant des patients atteints de LAM au CHU de Caen, propose une stratégie d'analyse en CMF robuste et reproductible pour ces deux approches permises par le panel d'anticorps LSC actuellement évalué en multicentrique en France par le groupe MRD CMF LAM LSC. L'illustration par des exemples concrets valide la pertinence de l'évaluation en CMF de la MRD par cette double approche LAIP/LSC dans les LAM, son intérêt pronostique n'étant plus à démontrer. De par le faible effectif de l'étude, cette stratégie nécessite d'être évaluée à plus grande échelle mais offre de belles perspectives pour le suivi et la prise en charge des patients atteints de LAM.

TITLE

EVALUATION OF THE LAIP / LSC (LEUKEMIA ASSOCIATED IMMUNOPHENOTYPE / LEUKEMIC STEM CELLS) APPROACH IN THE DIAGNOSIS AND MONITORING OF ACUTE MYELOID LEUKEMIA IN ADULTS

Summary

Currently, many patients with acute myeloid leukemia (AML) relapse after treatment. Monitoring minimal residual disease (MRD) is essential for the evaluation of the efficacy of therapies and for the prognosis, but lack of standardization in flow cytometry (CMF). Today, the LAIP/DfN approach aims to track blasts with the Leukemia Associated ImmunoPhenotype (LAIP) while the more innovative LSC approach aims to assess the presence of leukemic stem cells (LSC) in the immature myeloid compartment CD34+/CD38-. These LSCs are stated to be the cause of relapses. This prospective study from January 2020 to September 2020 including patients with AML at the CHU of Caen proposes a robust and reproducible CMF analysis strategy for these two approaches allowed by the panel of LSC antibodies currently evaluated in several centres in France by the MRD CMF LAM LSC group. Concrete examples of patients illustrate and validate the relevance of the evaluation by CMF of MRD using this double approach combining LAIP and LSC. Due to the small size of the study, this strategy needs to be evaluated on a larger scale but offers good prospects for the monitoring and management of patients with AML.

Mots-clés

Leucémie aiguë myéloïde, Maladie résiduelle minimale, LAIP, LSC, Cytométrie en flux, Stratégie d'analyse
