



HAL
open science

Évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans les leucémies aiguës myéloïdes : expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille

Noémie Gentil

► **To cite this version:**

Noémie Gentil. Évaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans les leucémies aiguës myéloïdes : expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille. Sciences pharmaceutiques. 2021. dumas-03515129

HAL Id: dumas-03515129

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03515129>

Submitted on 6 Jan 2022

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.



Distributed under a Creative Commons Attribution - NonCommercial - NoDerivatives 4.0 International License

MÉMOIRE
DU DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE

Soutenu le 27 Septembre 2021

Par Mme Noémie GENTIL
Née le 21 Août 1992

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

THÈSE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

----oOo----

TITRE :

Evaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux
dans les leucémies aiguës myéloïdes :
expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille

----oOo----

JURY :

Président : Pr Laurence CAMOIN

Membres : Dr Marie LOOSVELD, Pr Pierre MORANGE,
Dr Vanessa NIVAGGIONI et Dr Geoffroy VENTON

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

ADMINISTRATION :

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

DEPARTEMENT BIO-INGENIERIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Philippe PICCERELLE

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

BIOPHYSIQUE

M. Robert GILLI
Mme Odile RIMET-GASPARINI
Mme Pascale BARBIER
M. François DEVRED
Mme Manon CARRE
M. Gilles BREUZARD
Mme Alessandra PAGANO

GENIE GENETIQUE ET BIOTECHNOLOGIE

M. Eric SEREE-PACHA
Mme Véronique REY-BOURGAREL

PHARMACIE GALENIQUE, PHARMACOTECHNIE INDUSTRIELLE,
BIOPHARMACIE ET COSMETOLOGIE

M. Pascal PRINDERRE
M. Emmanuel CAUTURE
Mme Véronique ANDRIEU
Mme Marie-Pierre SAVELLI

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

M. Jérémy MAGALON
Mme Carole SIANI

ENSEIGNANTS CONTRACTUELS

ANGLAIS

Mme Angélique GOODWIN

DEPARTEMENT BIOLOGIE PHARMACEUTIQUE
Responsable : Professeur Françoise DIGNAT-GEORGE

PROFESSEURS

BIOLOGIE CELLULAIRE

M. Jean-Paul BORG

HEMATOLOGIE ET IMMUNOLOGIE

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

MICROBIOLOGIE

M. Jean-Marc ROLAIN
M. Philippe COLSON

PARASITOLOGIE ET MYCOLOGIE MEDICALE, HYGIENE ET
ZOOLOGIE

Mme Nadine AZAS-KREDER

MAITRES DE CONFERENCES

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

ATER

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

A.H.U.

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

DEPARTEMENT CHIMIE PHARMACEUTIQUE

Responsable : Professeur Patrice VANELLE

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

BOTANIQUE ET CRYPTOGRAMIE, BIOLOGIE CELLULAIRE	Mme Anne FAVEL Mme Joëlle MOULIN-TRAFFORT
CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Catherine DEFOORT M. Alain NICOLAY Mme Estelle WOLFF Mme Elise LOMBARD Mme Camille DESGROUAS M. Charles DESMARCHELIER
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Pierre REBOUILLON
CHIMIE THERAPEUTIQUE	Mme Sandrine ALIBERT Mme Caroline DUCROS M. Marc MONTANA Mme Manon ROCHE Mme Fanny MATHIAS
CHIMIE ORGANIQUE PHARMACEUTIQUE HYDROLOGIE	M. Armand GELLIS M. Christophe CURTI Mme Julie BROGGI M. Nicolas PRIMAS M. Cédric SPITZ M. Sébastien REDON
PHARMACOGNOSIE, ETHNOPHARMACOLOGIE	M. Riad ELIAS Mme Valérie MAHIOU-LEDDET Mme Sok Siya BUN Mme Béatrice BAGHDIKIAN

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

CHIMIE ANALYTIQUE, QUALITOLOGIE ET NUTRITION	Mme Anne-Marie PENET-LOREC
CHIMIE PHYSIQUE – PREVENTION DES RISQUES ET NUISANCES TECHNOLOGIQUES	M. Cyril PUJOL
DROIT ET ECONOMIE DE LA PHARMACIE	M. Marc LAMBERT
GESTION PHARMACEUTIQUE, PHARMACOECONOMIE ET ETHIQUE PHARMACEUTIQUE OFFICINALE, DROIT ET COMMUNICATION PHARMACEUTIQUES A L'OFFICINE ET GESTION DE LA PHARMAFAC	Mme Félicia FERRERA

A.H.U.

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

ATER

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

DEPARTEMENT MEDICAMENT ET SECURITE SANITAIRE

Responsable : Professeur Benjamin GUILLET

PROFESSEURS

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

MAITRES DE CONFERENCES

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

A.H.U.

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

ATER.

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

CHARGES D'ENSEIGNEMENT A LA FACULTE

Mme Valérie AMIRAT-COMBRALIER, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Pierre BERTAULT-PERES, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Marie-Hélène BERTOCCHIO, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Martine BUES-CHARBIT, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Nicolas COSTE, Pharmacien-Praticien hospitalier

Mme Sophie GENSOLLEN, Pharmacien-Praticien hospitalier

M. Sylvain GONNET, Pharmacien titulaire

Mme Florence LEANDRO, Pharmacien adjoint

M. Stéphane PICHON, Pharmacien titulaire

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

Mme Clémence TABELLE, Pharmacien-Praticien attaché

Mme TONNEAU-PFUG, Pharmacien adjoint

M. Badr Eddine TEHHANI, Pharmacien – Praticien hospitalier

M. Joël VELLOZZI, Expert-Comptable

Mise à jour le 23 janvier 2020

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

Remerciements

Aux membres du jury,

A madame le Pr Laurence Camoin,

Pour avoir accepté de présider ma thèse. Votre implication humaine, universitaire et scientifique suscite mon profond respect.

A madame le Dr Marie Loosveld,

D'avoir encadré ma thèse et m'avoir soutenue tout au long de ce projet. Merci pour ces nombreuses heures passées sur cette thèse et pour ta grande disponibilité. Je te remercie également de m'avoir permis de découvrir le monde de la recherche dans ton équipe. Je suis heureuse de pouvoir continuer à travailler à tes côtés.

A monsieur le Pr Pierre Morange,

Pour avoir accepté de faire partie des membres de ce jury. Je vous remercie également de m'avoir accueillie chaleureusement dans votre service et de m'offrir l'opportunité de poursuivre encore quelques années à vos côtés.

A madame le Dr Vanessa Nivaggioni,

Pour ta grande participation à ce projet et ta disponibilité. Merci pour nos nombreux entretiens, toujours bienveillants, que tu as pris le temps de m'accorder afin de répondre à mes nombreuses interrogations. Je te remercie également pour ton implication dans la formation des internes dont j'ai eu la chance de bénéficier.

A monsieur le Dr Geoffroy Venton,

Pour avoir accepté avec entrain de participer à mon jury de thèse et pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail. Je suis très honorée de votre présence dans ce jury.

Aux personnes qui ont participé à ce projet,

En particulier au secteur de cytométrie en flux, Dr Isabelle Arnoux, Denis, Nathalie, Claudine, Elodie et Stéphanie sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Plus largement aux laboratoires de l'AP-HM où j'ai eu la chance de travailler,

A tous les biologistes des laboratoires d'hématologie de la Timone et de la Conception pour vos enseignements pendant les années passées dans ces laboratoires et pour m'avoir donné l'envie de poursuivre l'apprentissage de l'hématologie.

Au Dr Charlotte Grosdidier, pour ta bonne humeur communicative, pour ta bienveillance et ton partage de connaissance au quotidien.

Aux biologistes du laboratoire d'hématologie de l'IPC qui m'ont initié à la lecture des myélogrammes. Je vous remercie également pour tous ces bons moments passés ensemble à parler travaux, déco, voyage...

A Amin, pour avoir rendu mon stage au laboratoire de biochimie intéressant, utile et agréable.

A tous les techniciens, en particulier ceux du laboratoire d'hématologie de la Timone, pour votre implication dans le travail et le souci du patient dont vous faites part. Merci pour ces nombreux petit-dej et goûters partagés ensemble.

A l'équipe de recherche « Instabilité génomique et hémopathies humaines »,

En particulier le groupe différenciation thymique et LAL-T qui m'a chaleureusement accueillie et encadrée pendant mon master 2, à Domie pour ta bienveillance et ta rigueur, à Delphine pour avoir tenté de m'expliquer la bioinfo, à Clémence pour ta joie de vivre et ton perfectionnisme (mais aussi tes conseils diététiques et sportifs), à Mathis aujourd'hui devenu mon ami, merci pour ces trajets partagés en voiture à parler de tout, peinture, musique, restaurant, cuisine, randonnées...

A tous mes co-internes,

A Emma (première co-interne et aujourd'hui ma chef !), Gregory, Audrey et Béatrice (pour nos escapades à la montagne), Quentin (pour nos parties de pétanques), Léa L, Célia, Medhi (pour nos discussions cuisine), Léa F (pour toutes ces heures à parler déco et mariage), Astrid, Benjamin (pour Mojito qui est si mignon), Aude, Vincent (pour tes conseils travaux), Sarah (pour nos fous rires en stage), Paul (pour tes études de marché sur les casseroles), Yassine (pour ton côté philosophe), Sara, Antoine, Sylvia, Charlotte et Clara (pour avoir essayé de me rendre meilleure en hémostase) et enfin Sophie, Alexis, Marc-Antoine, Laetitia, Marie, Maria, Thomas et Antoine de m'avoir supporté pendant ce travail de thèse.

Aux autres internes avec qui je n'ai pas travaillé mais que j'ai eu la chance de rencontrer au décours d'un petit verre et bien d'autres s'en sont suivis, Céline, Paul, Estelle, Simon, Amandine, Tracy, Julie...

A ma famille,

A mes parents, pour avoir fait preuve d'un soutien sans faille tout au long de ma vie. Merci maman pour ta patience, souvent mise à rude épreuve, pour ton côté artistique que tu as partagé avec moi, et bien sûr pour ton amour inconditionnel. Merci papa de m'avoir transmis ton côté scientifique qui me permet d'être ici aujourd'hui, merci d'avoir été protecteur avec moi et surtout, merci pour toutes ces heures passées devant Anastasia et Titanic. Merci de partager tous les moments importants de ma vie, de m'avoir transmis vos valeurs et ainsi contribuer à la personne que je suis aujourd'hui.

A mes grands-parents, mamie, papi, mémé, pour tous ces beaux moments passés dans mon enfance, pour toutes ces petites bêtises que vous avez su garder secrètes et pour tout l'amour que vous m'avez donné.

A Jean-Pierre (mon parrain), Régine (pour tes bons civets de sanglier) et Claire (ma presque sœur), merci pour tous ces bons repas de famille partagés depuis mon enfance, merci à Claire d'avoir grandi à mes côtés, partagé ces bêtises, ces fous rires, ces engueulades.

A ma nouvelle famille,

Caroline et Michel, de m'avoir si bien accueillie dans la région centre (enfin pour moi c'est le nord !) et surtout de m'avoir confié votre fils. A Jeanne-Marie, pour toutes ces soirées partagées à Montpellier et aujourd'hui en Lozère et pour m'avoir prêté ton frère, non sans difficulté. A Simon, Romain, Soso, Jean-Fran, Léna, Lori, Annelise, Pauline et Nico pour tous ces beaux repas de famille bien animés. Je suis heureuse de faire partie de votre famille aujourd'hui.

A mes amis,

Laura, merci pour ce tout qu'on a partagé ensemble depuis le lycée : les cours, les TP, le bac, les tempêtes de vent, les matches de rugby, les goûters interminables chez mes parents puis à Montpellier où nous avons habité ensemble, merci pour ton soutien pendant la PACES, puis d'avoir été témoin des débuts de mon histoire avec Matthieu (même s'il a dû faire ses preuves !) et enfin d'avoir été mon témoin lors de notre mariage. Tu feras toujours partie de ma vie.

A mes amis de lycée, JB, Victor, Quentin, Elo et Marion pour avoir fait de ces années des moments inoubliables et surtout de m'accompagner encore aujourd'hui dans les moments importants de ma vie. Merci particulièrement à Marion de m'avoir présentée « un pote de promo » à une soirée médecine qui a changé ma vie et à Quentin d'avoir été le témoin de notre union.

A mes amis de Fac, pour avoir partagé tous ces cours ensemble avec de nombreux fous rires, pour tous ces si bons repas au RU, pour les intégrations et les désintégrations, pour le WE ski pharma où j'ai laissé une partie de mon front et pour tous les moments inoubliables qui se sont enchaînés depuis, en particulier le voyage à Bali. Merci Anyssa (mon binôme), pour tous ces TP rendus dans les temps, Arnaud pour ces heures passés en voiture (à l'arrêt) où on a refait le monde, à Marianne pour ces exposés, sushis et dessins partagés ensemble, à Tata Juju (super

maman) pour ta bonne humeur constante et ces parties de tennis, à Jordan pour ces belles randos et d'avoir fait une petite Maé aussi mignonne, à Clara (alias la dormeuse) que j'ai la joie de retrouver sur Marseille.

A mes amis marseillais,

A Camille et Vincent, pour tous ces bons moments, les soirées autour des jeux de société, à l'escalade, les nombreux repas partagés ensemble ou simplement autour d'un verre, les préparatifs du mariage, le baby-sitting de Paco... L'importance d'une amitié ne se mesure pas aux nombres d'années. Merci d'avoir été les témoins de notre mariage.

A Marie et Mahé, pour toutes ces soirées remplies de rires et de bonne humeur et de nous accueillir aujourd'hui à Briançon. Merci Marie pour toutes ces séances de sport en visio pendant le confinement ! Merci Mahé pour tes talents d'imitateurs (en particulier animalier) et pour toutes ces belles balades afin de nous faire découvrir ta montagne.

A Estelle, pour toutes ces soirées arrosées mais aussi tous ces moments importants où tu étais là. Merci pour ce cours de danse orientale inoubliable !

A Matthieu,

Merci pour ces 9 belles années passées à tes côtés et les prochaines. Merci pour ta patience et ton soutien, que j'ai eu l'occasion de tester à de nombreuses reprises (les examens de pharmacie, le concours de l'internat, les travaux de l'appartement, les préparatifs du mariage...) Merci d'enseigner mon quotidien.

Liste des abréviations

AC : Anticorps

BM : Biologie moléculaire

CIQ : Contrôle interne de qualité

CIVD : Coagulation intravasculaire
disséminée

CMF : Cytométrie en flux

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

CSL : Cellules souches leucémiques

DfN : différent de la normale

ELN : European LeukemiaNet

FAB : Franco-Américano-Britannique

FISH : Hybridation de fluorescence in situ

FMO : Fluorescence minus one

FS ou FSC : Forward scatter

LA : Leucémie aiguë

LAIP : Immunophénotype associé aux
leucémies

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

MGG : May Grumwald Giemsa

MNC : Cellules mononuclées

MO : Moelle osseuse

MRD : Maladie résiduelle minimale
/mesurable

NGS : Séquençage de nouvelle génération

NOS : Sans autre spécificité

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase chain reaction

PMT : Photomultiplicateur

PNN : Polynucléaires neutrophiles

RC : Rémission complète

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératif

SS ou SSC : Side scatter

Table des matières

I. Introduction	14
A. Généralités des LAM	14
1. Définitions des leucémies aiguës (LA)	14
2. Facteurs de risque	14
3. Epidémiologie	14
4. Aspects cliniques	15
5. Aspects biologiques	15
a. Hémogramme	15
b. Myélogramme	16
6. Classification	18
a. Classification diagnostique	18
b. Classification pronostique	19
7. Traitement	19
a. Chimiothérapie intensive	19
b. Chimiothérapie non intensive	20
c. Thérapies innovantes	20
B. Evaluation de la MRD dans les LAM	21
1. Généralités	21
a. Définition	21
b. Applications cliniques	21
2. Les techniques d'évaluation de la MRD	24
a. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux	25
b. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire	33
II. Objectifs	36
III. Matériels et méthodes	36
A. Patients	36
B. Matériel et méthode	36
1. Prélèvements	36
2. Cytométrie en flux	36
a. Traitement des échantillons	36
b. Evaluation de la pureté de la MO	37
c. Macrolyse ou lyse en macrovolume	37
d. Marquage des échantillons et panel utilisé	37

e.	Standardisation	39
f.	Contrôles de qualité	39
g.	Moelles osseuses normales.....	40
h.	Stratégie de fenêtrage	41
3.	Cytogénétique.....	44
4.	Biologie moléculaire	44
5.	Statistiques	45
IV.	Résultats	46
A.	Description de la cohorte.....	46
B.	Description de l'analyse immunophénotypique	50
1.	Stratégie LAIP au diagnostic.....	50
2.	Stratégie CSL au diagnostic	52
3.	Etude des LAIP à la rechute	53
4.	Impact des CSL sur la rechute.....	57
C.	Description des résultats de biologie moléculaire	59
D.	CMF versus biologie moléculaire	60
V.	Discussion	66
A.	Apport de l'analyse des LAIP	67
B.	Apport de l'analyse des CSL.....	68
C.	CMF versus biologie moléculaire	69
VI.	Conclusion et perspectives.....	72
	Références bibliographiques	72
	Serment de galien	79
	Résumé	80

I. Introduction

A. Généralités des LAM

1. Définitions des leucémies aiguës (LA)

Les leucémies aiguës représentent 10 à 15% des hémopathies malignes. Ce sont des proliférations clonales de cellules progénitrices hématopoïétiques aboutissant à leur accumulation dans la moelle, le sang et parfois d'autres organes. Ces progéniteurs, anormalement arrêtés à différent stade de différenciation, peuvent être d'origine myéloïde ou plus rarement lymphoïde et donner respectivement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) ou des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Les LAM constituent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes tant sur le plan clinique que sur le plan biologique. En effet, de nombreux sous-types cytologiques et des caractéristiques immuno-phénotypiques, cytogénétiques et moléculaires très différentes selon les patients sont observées. Actuellement, les mutations fréquemment rencontrées dans les LAM ont été divisées en huit catégories fonctionnelles principales responsables du processus de leucémogénèse. (1–3).

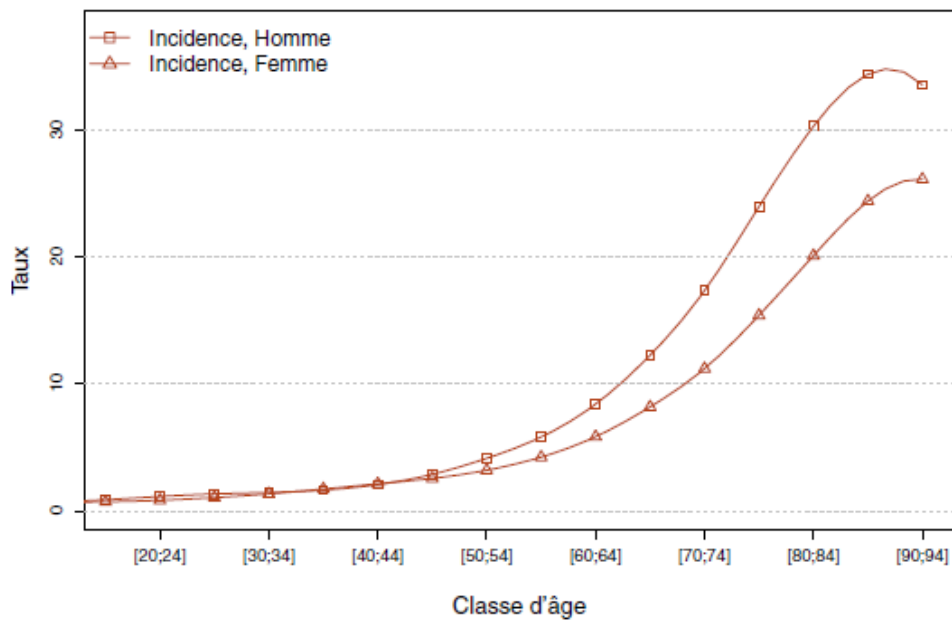
2. Facteurs de risque

Plusieurs facteurs de risque impliqués dans la survenue de cette pathologie ont été identifiés tels que l'âge, l'exposition aux radiations ionisantes, aux produits chimiques comme le benzène, les pesticides ou la cigarette. Les antécédents personnels d'autres pathologies hématologiques comme les syndromes myéloprolifératifs (SMP) ou les syndromes myélodysplasiques (SMD) peuvent engendrer secondairement des LAM tout comme l'administration de chimiothérapies cytotoxiques. Les patients possédant certaines anomalies génétiques constitutionnelles telles que le syndrome de Down (trisomie 21) sont plus à risque de développer des leucémies aiguës (4).

3. Epidémiologie

En France, le nombre de nouveaux cas de LAM en 2018 est estimé à 3428 soit des taux d'incidence standardisés sur la population mondiale de 3,1 pour 100 000 hommes et de 2,3 pour 100 000 femmes. Bien que les LAM puissent survenir à tout âge, elles touchent principalement les personnes âgées avec un âge médian au diagnostic de 70 ans. L'incidence augmente avec l'âge. Par exemple pour les hommes, elle passe de 1,5/100 000 habitants à 30 ans à 17,4/100 000 habitants à 70 ans (5) (**Figure 1**).

Figure 1 : Incidence des LAM selon la classe d'âge en France en 2018 (5)



4. Aspects cliniques

La présentation clinique des LAM est diverse et peu spécifique. Les principaux signes cliniques sont liés aux cytopénies, conséquence de l'insuffisance médullaire induite par l'envahissement blastique. En cas d'atteinte de la lignée érythrocytaire, le patient peut présenter un syndrome anémique caractérisé par une pâleur cutanéomuqueuse, une dyspnée et une asthénie importante du fait de l'installation rapide de l'anémie. L'atteinte de la lignée plaquettaire se manifeste par un syndrome hémorragique cutanéomuqueux et l'atteinte de la lignée leucocytaire, en particulier les granuleux par une susceptibilité accrue aux infections. Moins fréquemment, un syndrome tumoral peut être observé. En effet, l'infiltration extramédullaire blastique peut conduire à diverses manifestations comme une splénomégalie, une hépatomégalie ou des adénopathies. Dans les cas de leucémies aiguës hyperleucocytaires (>50G/L), il existe un risque de leucostase au niveau pulmonaire et cérébral (6).

5. Aspects biologiques

a. Hémogramme

La numération est un examen d'orientation important au diagnostic. On retrouve dans la majorité des cas une anémie d'origine centrale, normochrome normocytaire arégénérative. Une thrombopénie plus ou moins profonde est fréquemment observée, secondaire à un envahissement médullaire blastique et pouvant être associé dans certains cas à une consommation plaquettaire périphérique à cause d'une coagulation intra-vasculaire disséminée

(CIVD). La numération leucocytaire est variable, pouvant aller de la leucopénie franche à une leucocytose majeure (>100G/L) souvent associée à une neutropénie. La présence de blastes dans le sang périphérique est variable en fonction de la LA.

Le frottis sanguin et/ou médullaire coloré au May Grumwald Giemsa (MGG) permet d'apprécier la présence des blastes. Il s'agit de cellules de taille variable, à haut rapport nucléocytoplasmique, noyau souvent nucléolé avec une chromatine fine et un cytoplasme basophile. La présence de granulations ou de corps d'Auer dans le cytoplasme de ces cellules peut être observée et permet d'orienter vers le caractère myéloïde de la leucémie aiguë. L'ELN (European LeukemiaNet) recommande un compte sur au moins 200 cellules (7).

b. Myélogramme

i. Analyse cytologique

Le myélogramme est indispensable au diagnostic même si on retrouve plus de 20% de blastes circulant. La lecture des frottis médullaires permet de confirmer le diagnostic et d'apporter des renseignements sur les autres lignées hématopoïétiques. Il est parfois possible de donner une première orientation de lignée comme par exemple la présence d'une composante monocytaire et ainsi classer cytologiquement la leucémie. L'ELN recommande un compte sur au moins 500 cellules. Une LA est définie par plus de 20% de blastes dans le sang ou dans la moelle osseuse, excepté pour les LA avec t(15 ;17), t(8 ;21) ou inv16 où ce seuil n'est pas obligatoire pour affirmer une LA (7,8).

ii. Analyse immunophénotypique

L'étude immunophénotypique consiste en la caractérisation de différents antigènes présents à la surface des blastes ou en intra-cytoplasmique grâce à l'utilisation d'anticorps monoclonaux couplés à un fluorochrome. Dans un premier temps, son but est d'attribuer les blastes à une lignée afin de distinguer les LA myéloïdes des LA lymphoïdes et également de détecter les LA mixtes, biphénotypiques ou biclonales. Il est aussi important d'affiner ce diagnostic en déterminant le stade de différenciation des blastes ainsi que les différentes composantes de la LAM (monocytaire, mégacaryocytaire, érythroblastique) (**Tableau 1**) (7).

Tableau 1: Principaux marqueurs des précurseurs myéloïdes et des lignées granuleuse, monocyttaire, mégakaryocytaire et érythroïde utilisés en immunophénotypage au diagnostic des LAM, issus des recommandations de l'ELN 2017

Expression of cell-surface and cytoplasmic markers	
Diagnosis of AML*	
Precursors†	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocytic markers‡	CD65, cytoplasmic MPO
Monocytic markers§	CD14, CD36, CD64
Megakaryocytic markers	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa)
Erythroid markers	CD235a (glycophorin A), CD36

Un autre objectif important de l'immunophénotypage au diagnostic est de détecter des expressions aberrantes de certains antigènes à la surface des blastes afin de pouvoir suivre la maladie résiduelle minimale/mesurable (MRD). Cette partie sera détaillée dans le paragraphe « §I.B Evaluation de la MRD dans les LAM ».

iii. Analyse cytogénétique

La réalisation d'un caryotype est indispensable au diagnostic de toutes LA. En effet, depuis la révision de la classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS) en 2016 (8), certaines anomalies génétique récurrentes entrent dans la classification des LAM ainsi que dans la stratification du risque pronostique (§I.A.6 Classification). De plus, les anomalies caryotypiques telles que les t(8 ;21), t(15 ;17) et t(16 ;16) sont exemptées du seuil de 20% de blastes dans la moelle osseuse ou le sang pour affirmer le diagnostic de LAM. En cas d'anomalies cryptiques, des analyses plus ciblées sont effectuées telles que les analyses par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization).

iv. Analyse moléculaire

L'étude des anomalies moléculaires est également primordiale au diagnostic et comprend la recherche de mutations de gènes, la surexpression de gènes et la présence de transcrits de fusion, reflet des translocations chromosomiques. Leur identification participe aux classifications diagnostiques et pronostiques des LAM (§I.A.6 Classification) et certaines sont utiles au suivi de la maladie résiduelle (§I.B Evaluation de la MRD dans les LAM). De plus, de nouvelles thérapeutiques en cours de développement ciblent certaines anomalies moléculaires telles que les inhibiteurs de FLT3 ou d'IDH1 et IDH2.

6. Classification

a. Classification diagnostique

En 1976, un groupe de travail a proposé une classification diagnostique pour les LAM reposant sur les caractéristiques morphologiques et cytochimiques des blastes, la classification FAB (Franco-Américano-Britannique) (9). Avec le développement de nouvelles techniques et notamment la biologie moléculaire, l'OMS a proposé une nouvelle classification en 2008 qui a été révisée en 2016. Elle intègre les caractéristiques cliniques, morphologiques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires afin de définir des entités cliniquement pertinentes (8). Elle comprend six entités principales, les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, les LAM avec modifications liées à la dysplasie, les LAM secondaires aux traitements, les LAM sans critères spécifiés (NOS) reprenant les critères FAB, les sarcomes myéloïdes et les proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down (**Tableau 2**).

Tableau 2: Classification OMS 2016 des LAM et néoplasies associées (8)

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms
AML with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
APL with <i>PML-RARA</i>
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i>
AML with t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKL1</i>
<i>Provisional entity: AML with BCR-ABL1</i>
AML with mutated <i>NPM1</i>
AML with biallelic mutations of <i>CEBPA</i>
<i>Provisional entity: AML with mutated RUNX1</i>
AML with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
AML, NOS
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Pure erythroid leukemia
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome

b. Classification pronostique

L'identification des facteurs pronostiques a pour but de stratifier les patients en fonction de leur résistance au traitement et du risque de mortalité. Un âge avancé est connu pour être un facteur de moins bon pronostic mais la santé générale du patient et ses comorbidités modulent les effets de l'âge sur la tolérance de la chimiothérapie. De plus, les antécédents personnels de SMD, SMP et d'expositions à un traitement cytotoxique augmentent la probabilité de résistance au traitement (4). Des études récentes ont montré que les anomalies génétiques avaient une place majeure dans la survie globale et dans la survie sans rechute des patients atteints de LAM (10,11). L'ELN 2017 a proposé la stratification du risque par les anomalies génétiques en 3 catégories, pronostic favorable, intermédiaire et mauvais pronostic (**Tableau 3**) (7).

Tableau 3: Stratification pronostique par les anomalies génétiques selon l'ELN 2017

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low} † Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high} † Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{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)(q21.3q26.2) 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-ITD</i> ^{high} † Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> ‡

7. Traitement

a. Chimiothérapie intensive

i. Phase d'induction

Le but du traitement est d'obtenir une rémission complète, estimée entre 60 et 80% chez les patients jeunes et entre 40 et 60% chez les patients âgés (12). L'évaluation initiale du patient permet de déterminer s'il est éligible à une chimiothérapie intensive. L'âge n'est pas le seul critère pris en compte dans les choix thérapeutiques. D'autres facteurs pronostiques sont considérés comme les anomalies moléculaires ou les comorbidités (13). Le schéma

thérapeutique de la phase d'induction est le même pour tous les patients avec 3 jours d'anthracycline (agent intercalant) et 7 jours de cytarabine (analogue nucléosidique de la pyrimidine) appelé communément le protocole 3+7 (12,14).

ii. Phase de consolidation

La phase de consolidation comprend 2 types de traitement, la chimiothérapie conventionnelle et la greffe de cellules souches hématopoïétiques. Le choix de la stratégie thérapeutique de consolidation tient compte de l'âge du patient et de la stratification du risque basée sur la génétique. La chimiothérapie conventionnelle repose sur une monothérapie de cytarabine à dose intermédiaire entre 2 et 4 cycles. Cette option est recommandée pour les patients avec un risque favorable selon l'ELN et pour les patients jeunes avec risque intermédiaire. L'allogreffe quant à elle est à privilégier pour les patients jeunes présentant un risque défavorable. C'est en effet le traitement qui offre le meilleur moyen de conserver une rémission durable mais il est lié à une importante morbidité et mortalité et doit donc tenir compte des caractéristiques génétiques ainsi que des facteurs du patient, du donneur et du greffon (7,14).

b. Chimiothérapie non intensive

Certains patients ne toléreront pas une chimiothérapie intensive. Les alternatives possibles sont des soins de soutien tel que l'hydroxyurée, des chimiothérapies de faible intensité comme l'azacytidine, decitabine, cytarabine ou des essais cliniques avec des médicaments expérimentaux (7,14).

c. Thérapies innovantes

Des thérapies innovantes sont en cours de développement pré-clinique ou clinique. Elles peuvent être classées en inhibiteurs de protéine kinase (inhibiteurs FLT3), modulateurs épigénétiques (inhibiteurs IDH1), nouveaux agents cytotoxiques (vosaroxine), inhibiteurs mitochondriaux (inhibiteurs bcl-2), thérapies ciblant des protéines oncogènes spécifiques (ciblage NPM1), immunothérapies cellulaires (CART cell) et thérapies ciblant le microenvironnement de la LAM (antagonistes CXCR4) (7,14).

B. Evaluation de la MRD dans les LAM

1. Généralités

a. Définition

Depuis les années 60 (15), le statut de rémission complète (RC) repose sur la cytologie dans la moelle osseuse en microscopie optique après la mise en place du traitement. La rémission complète est définie par l'ELN 2017 selon les critères suivants :

- Moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse
- Absence de blastes circulants ou de blastes avec corps d'auer
- Absence d'atteinte extramédullaire
- Polynucléaires neutrophiles (PNN) > 1G/L et plaquettes > 100G/L. Si un de ces critères est absent, on parle de RC avec récupération hématologique incomplète.

L'émergence de nouvelles techniques telles que la cytométrie en flux et la biologie moléculaire, plus sensibles que l'analyse cytologique a fait naître dans les années 90 la notion de maladie résiduelle minimale/mesurable ou MRD (16). Elle permet donc de détecter la présence éventuelle de cellules leucémiques avec une meilleure sensibilité que les analyses par microscopie optique (avec une sensibilité de 10^{-4} à 10^{-6} contre 10^{-2} pour la morphologie standard) (17).

Différentes raisons d'appliquer la détection de la MRD dans les LAM sont décrites :

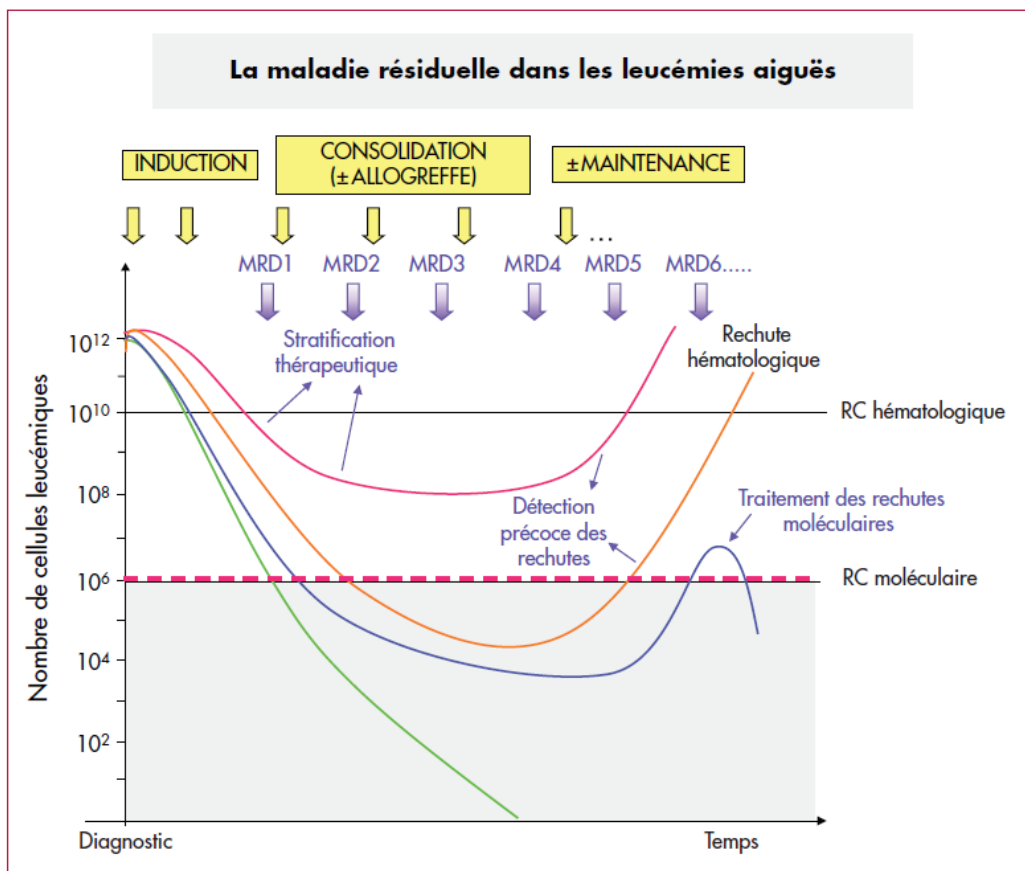
- Fournir une méthodologie objective pour établir un statut de rémission complète avec une meilleure sensibilité,
- Evaluer la réponse au traitement en vue d'une stratification thérapeutique,
- Identifier une rechute imminente et permettre une intervention précoce,
- Evaluer en pré-greffe le risque de rechute et la survie globale et en post greffe pour permettre une surveillance plus robuste (17).

b. Applications cliniques

La détection de la MRD est utile dans l'évaluation de la réponse au traitement en vue d'une stratification thérapeutique en fonction du risque de rechute et de la survie globale. La cinétique de diminution de la MRD est le reflet de la chimiosensibilité des cellules leucémiques. Le but du traitement d'induction est d'obtenir une rémission complète cytologique mais elle

peut tout de même représenter une masse tumorale encore importante (jusqu'à 10^9 cellules). Le traitement de consolidation a pour but d'éliminer les cellules tumorales restantes (**Figure 2**) (18). Dans le cas contraire, les cellules leucémiques résiduelles pourront être à l'origine de rechutes pouvant suivre deux principaux schémas d'évolution clonale : le clone initiateur de la tumeur primaire a obtenu des mutations et a évolué vers le clone de rechute, ou un sous-clone a survécu au traitement initial et a gagné des mutations supplémentaires afin d'aboutir à la rechute (2).

Figure 2 : Représentation schématique de différentes évolutions de la MRD dans les LAM après traitement intensif, ainsi que les indications du suivi de la MRD en fonction du temps de prélèvement (18).



De nombreuses études ont évalué l'utilité de la MRD dans le suivi des LAM et ont montré son potentiel à prédire le risque de rechute et la survie globale (17,19). Les analyses multivariées de certaines études révèlent que la MRD, évaluée par CMF ou biologie moléculaire, semble être un bon indicateur pronostique indépendant qui permettrait d'ajuster la surveillance et le traitement des patients (17).

L'ELN 2017 a d'ailleurs intégré la MRD dans les critères de réponses au traitement. Ainsi, la distinction se fait entre une RC avec MRD- et une RC avec MRD+ dont les patients présentent des rechutes plus fréquentes (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Critères de réponse aux traitements dans les LAM selon l'ELN 2017

Category	Definition
Response	
CR without minimal residual disease (CR _{MRD-})	If studied pretreatment, CR with negativity for a genetic marker by RT-qPCR, or CR with negativity by MFC
Complete remission (CR)	Bone marrow blasts <5%; absence of circulating blasts and blasts with Auer rods; absence of extramedullary disease; ANC $\geq 1.0 \times 10^9/L$ (1000/ μ L); platelet count $\geq 100 \times 10^9/L$ (100 000/ μ L)
CR with incomplete hematologic recovery (CR _i)	All CR criteria except for residual neutropenia ($< 1.0 \times 10^9/L$ [1000/ μ L]) or thrombocytopenia ($< 100 \times 10^9/L$ [100 000/ μ L])
Morphologic leukemia-free state (MLFS)	Bone marrow blasts <5%; absence of blasts with Auer rods; absence of extramedullary disease; no hematologic recovery required
Partial remission (PR)	All hematologic criteria of CR; decrease of bone marrow blast percentage to 5% to 25%; and decrease of pretreatment bone marrow blast percentage by at least 50%

L'évaluation de la MRD est également utile dans la détection précoce des rechutes. Selon l'ELN 2017, on distingue la rechute cytologique ou hématologique de la rechute moléculaire. La rechute cytologique est définie par la présence de plus de 5% de blastes dans la moelle osseuse ou la réapparition de blastes circulants dans le sang périphérique ou une manifestation extra-médullaire de la maladie. La rechute moléculaire quant à elle est définie par la réapparition de la MRD par CMF ou biologie moléculaire (**Tableau 5**). L'ELN 2018 précise que la rechute moléculaire correspond à une augmentation d'un log entre deux prélèvements positifs chez un patient en RC moléculaire initiale. Du fait des techniques plus sensibles qui l'explorent, la MRD moléculaire se positive plus précocement que la MRD cytologique ce qui permet une surveillance accrue du patient et donc une prise en charge thérapeutique plus rapide.

Tableau 5 : Critères de rechute hématologique et moléculaire dans les LAM selon l'ELN 2017

Relapse	
Hematologic relapse (after CR _{MRD-} , CR, CR _i)	Bone marrow blasts $\geq 5\%$; or reappearance of blasts in the blood; or development of extramedullary disease
Molecular relapse (after CR _{MRD-})	If studied pretreatment, reoccurrence of MRD as assessed by RT-qPCR or by MFC

Des études suggèrent qu'une MRD positive avant une allogreffe est un important facteur prédictif de rechutes et de survie globale après la greffe (20).

2. Les techniques d'évaluation de la MRD

La MRD est évaluée en pratique quotidienne par le pourcentage de cellules blastiques sur le myélogramme en fin de cure. Cependant cet examen est peu sensible et difficile à interpréter (moelle de richesse variable, myéloblastes de régénération non pathogènes...). De ce fait, différentes techniques de sensibilité, d'avantages et d'inconvénients variables se sont développées afin d'évaluer la MRD. Les deux méthodes les plus couramment appliquées sont la cytométrie en flux (CMF) et la PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR). Des technologies plus récentes sont en train d'émerger, notamment le séquençage de nouvelle génération (NGS) et la PCR digitale (**Figures 3 et Tableau 6**) (18).

Figure 3 : Comparaison de la sensibilité des différentes techniques utilisées pour le suivi de la MRD (18).

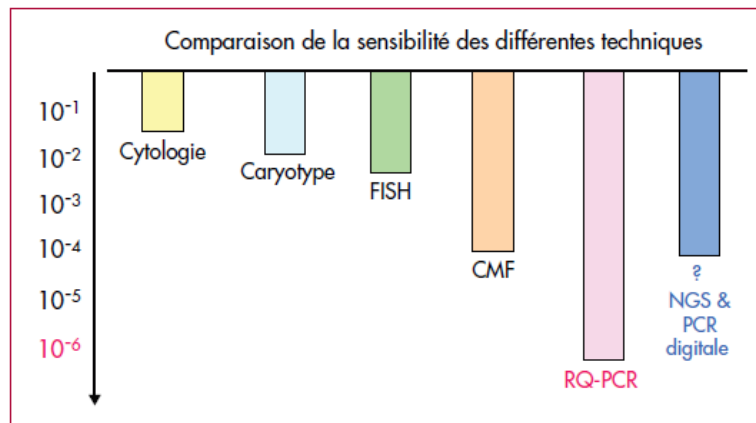


Tableau 6 : Comparaison des différentes méthodes d'évaluation de la MRD selon Dix et al. (21)

Méthodes d'évaluation de la MRD	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
CMF-LAIP	10^{-3} à 10^{-5}	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité - Faisabilité - Applicable >90% des patients - Délai de traitement rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Analyse au diagnostic nécessaire - Large panel d'AC requis - Ne tient pas compte des modifications phénotypiques - Standardisation limitée
CMF-DfN	10^{-3} à 10^{-5}	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité - Analyse au diagnostic non nécessaire - Modifications phénotypiques n'interfèrent pas avec les résultats - Applicable >90% des patients - Délai de traitement rapide 	<ul style="list-style-type: none"> - Opérateur expérimenté nécessaire - Standardisation limitée
RQ-PCR	10^{-4} à 10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> - Sensibilité - Standardisation 	<ul style="list-style-type: none"> - Cibles présentes chez seulement 30 à 60% des patients - Plusieurs mutations ne peuvent être suivies - Analyse longue

Les critères de choix pour l'utilisation d'un marqueur dans le suivi de la MRD sont :

- Sa sensibilité et sa spécificité vis-à-vis de la maladie
- Sa stabilité entre le diagnostic et la rechute
- Son applicabilité à un grand nombre de patients
- Sa détection possible dans un laboratoire de routine
- Son coût acceptable (22).

a. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux

i. Approches LAIP (Leukemia Associated Immunophenotype) et DfN (Different from normal)

Ces deux approches sont assez similaires et font appel toutes deux à l'identification d'aberrations de différenciation ou de maturation des blastes du patient par rapport à une moelle normale. L'évaluation de la MRD par CMF est informative chez environ 90% des patients (1,23).

Les aberrations immunophénotypiques sont de 4 types : les infidélités de lignées (expression de marqueurs des lignées B, T ou NK tels que le CD7, CD19, CD56), les expressions asynchrones d'antigènes de maturation (expression de marqueurs de maturité ou d'immaturité aberrants par rapport au stade de maturation de la cellule, par exemple la coexpression du CD34+ et du CD14+), la surexpression d'antigène et la perte ou diminution d'expression d'antigène (23) (**Tableau 7**).

Tableau 7 : Fréquence des différents types de LAIP dans les LAM (24)

Type de LAIP	Fréquence	Exemple
Infidélités de lignées	30-40%	CD19 CD2 CD7
Asynchronisme de maturation	60-70%	CD34 CD14
Surexpression	20-30%	CD34 CD13 CD33
Perte/diminution d'expression	20-30%	HLA-DR CD33 CD13

Pour être considéré, un LAIP doit être présent sur au moins 10% des blastes et être absent ou très peu exprimé dans la moelle osseuse des patients sains. Plus un LAIP est présent dans une moelle normale, moins il sera sensible. (1,25) (**Tableau 8**).

Tableau 8 : Fréquence des LAIP dans les moelles osseuses et sang périphérique normaux (25)

Aberrancy	LAIP	BM controls %LAIP on WBC (range)	N	PB controls %LAIP on WBC (range)	N	Ratio (BM/PB)	P
CD7	CD7 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.024 (0.008–0.068)	9	0.004 (0.003–0.010)	5	6.0	0.003
	CD7 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.057 (0.016–0.098)	2	0.010 (0.001–0.035)	3	5.7	
CD11b	CD11b ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.054 (0.045–0.072)	3	0.001 (0.000–0.001)	5	54.0	22.0
	CD13 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.022 (0.000–0.044)	2	0.001 (0.000–0.002)	4	0.6	
CD13	CD13 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.006 (0.000–0.021)	4	0.010 (0.000–0.050)	4	10.0	1.8
	CD15 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.010 (0.006–0.029)	5	0.001 (0.000–0.001)	2	1.8	
CD15	CD15 ⁺ /HLADR/CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.027 (0.007–0.041)	6	0.015 (0.015–0.015)	1	3.4	3.6
	CD22 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.024 (0.016–0.102)	5	0.007 (0.005–0.009)	2	2.0	
CD22	CD22 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.061 (0.008–0.079)	3	0.017 (0.017–0.017)	1	36.5	3.0
	CD33 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.002 (0.000–0.070)	6	0.001 (0.000–0.001)	4	> 11.0	
CD33	CD33 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.073 (0.032–0.114)	2	0.002 (0.000–0.005)	4	1.2	4.5
	CD34 ⁺ /MM ⁺ /CD133 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.003 (0.002–0.005)	6	0.001 (0.001–0.001)	1		
CD34	CD56 ⁺ /MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.011 (0.003–0.030)	3	0.000 (0.000–0.006)	5		
	CD56 ⁺ /MM ⁺ /CD117 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.011 (0.000–0.024)	4	0.009 (0.001–0.035)	4		
HLADR	HLADR/MM ⁺ /CD34 ⁺ /CD45 ^{dim}	0.009 (0.008–0.043)	3	0.002 (0.002–0.002)	2		

Abbreviations: BM, bone marrow; LAIP, leukemia-associated immunophenotype; MM, myeloid marker; PB, peripheral blood; WBC, white blood cell. BM and PB control samples consisted of normal control samples and regenerating AML follow-up samples. P-values were calculated using the Mann-Whitney U test if the number of samples in both groups was ≥ 5 .

L'approche LAIP identifie ces aberrations au diagnostic et les suit tout au long de la maladie. Le phénotype au diagnostic est de ce fait indispensable. Elle permet d'obtenir un phénotype blastique spécifique d'un patient qui sera suivi au cours de son traitement. Le principal inconvénient de cette approche est qu'elle peut être mise à défaut en cas de modification des LAIP pouvant survenir après une chimiothérapie ce qui peut conduire à des faux négatifs (22).

L'approche DfN est basée sur l'indentification de ces aberrations par comparaison à une moelle normale à tout moment du suivi du patient, sans tenir compte du phénotype au diagnostic. Cette méthode s'affranchit des limitations de l'approche LAIP causées par les modifications immunophénotypiques des blastes au cours du traitement mais nécessite une expertise importante notamment dans la connaissance de la maturation physiologique des cellules myéloïdes (22).

L'ELN préconise tout de même l'utilisation combinée de ces deux méthodes pour une sensibilité optimale et a publié des recommandations concernant l'utilisation d'un panel commun d'anticorps dans le but d'harmoniser les pratiques (**Figure 4**) (17).

Figure 4 : Recommandations de l'ELN pour évaluer la MRD des LAM (17)

Recommendations	
Flow cytometry	
1	Use the following markers in an MRD panel: CD7, CD11b, CD13, CD15, CD19, CD33, CD34, CD45, CD56, CD117, HLA-DR (backbone: CD45, CD34, CD117, CD13, CD33, forward scatter/sideward scatter) If necessary, add a "monocytic tube" containing: CD64/CD11b/CD14/CD4/CD34/HLA-DR/CD33/CD45.
2	Integrate the classic LAIP approach with the DfN approach. To trace all aberrancies (at and beyond diagnosis, including newly formed postdiagnosis aberrancies) apply a full panel both at diagnosis and at follow-up.
3	Aspirate 5-10 mL of BM and use the first pull for MRD assessment. At present, PB, with its lower MRD content, should not be used for MRD assessment. Pull as low as desirable BM volume because contamination with PB increases with BM volume
4	Estimate the contamination with PB, especially when a first pool of BM was impossible.
5	Use 500 000 to 1 million WBCs; use the best aberrancy available and relate it to CD45 ⁺ WBCs.
6	To define "MRD-negative" and "MRD-positive" patient group, a cutoff of 0.1% is recommended.
7	If true MRD <0.1% is found, report this as "MRD-positive <0.1%, may be consistent with residual leukemia." If applicable, the comment "this level has not been clinically validated" should be added.
8	In a multicenter setting, transport and storage of full BM at room temperature for a period of 3 d are acceptable.
9	Single center studies with no extensive experience on MFC MRD are strongly discouraged.

Le seuil de positivité qui a été retenu et jugée pertinent est celui de 0,1% dans la plupart des études (**Tableau 9 et 10**). L'ELN recommande au minimum des prélèvements médullaire et sanguin au diagnostic, après 2 cycles de chimiothérapie, à la fin du traitement puis tous les 3 mois pendant 2 ans.

Tableau 9 : Principales études sur la valeur pronostique de la MRD mesurée par CMF selon l'ELN 2018 (17)

Reference	Multicenter, yes/no	Study population, adult/children	% LAIP	Number of patients	MRD measurement following	Cutoff MRD level			Univariate analysis significant for	Multivariate analysis significant for
						I	C	Post-Tx		
81	N	A	46	53	I, C	<0.05%	0.2%		RFS, OS	RFS
82	Y	A	70	56	I, C	0.045%	0.035%		I-C: RFS, OS	I-C: RFS, OS
83		A	75	126	I	<0.01%, 0.01%-0.1% 0.1%-1% >1%	- - -		RFS, OS	RFS
84	Y	Ch	?	252	I ₁	0.5%			RFS, OS	RFS, OS
85	Y	A	100	106	Day 16	Log difference 2.11			CR, EFS, RFS, OS	EFS, RFS
86	N	A	100	62	I, C	Log difference 2.11	Log difference 2.53		I: RFS C: RFS, OS	I: RFS C: RFS
34	N	A	100	72	I ₁ , I ₂ , C, PBSCT	I ₁ : 1% I ₂ : 0.14%	0.11%	0.13%	I ₁ , I ₂ , C, PBSCT; RFS, OS	I ₁ , I ₂ , C, PBSCT; RFS, OS
87	Y	A	89	100	I, C	0.035%	0.035%		I and C: RR, RFS, OS	I-C: RR, RFS, OS
88	Y	A, Ch	?	150	Day 15, I, I ₂ , C	0.1%-2%	0.1%-1.3%		Day 15, I; RFS	—
89	Y	A	?	142	I, C	0.035%	0.035%		I and C: RFS, OS	I and C: RFS, OS
90	N	A	94	54	I, C	0.15%	0.15%		I: RFS, OS C: RFS, OS	I: RFS, OS C: —
91	Y	Ch	?	94	I ₁ , I ₂ , C, end of Tx	<0.1% 0.1%-0.5% >0.5%			I ₁ : RFS, OS	I ₁ : RFS, OS
61	Y	Ch	100	188	I ₁ , I ₂ , end of Tx	>0%, 0-1%			I ₁ : OS, RFS I ₂ : RFS, OS	I ₁ : OS, RFS I ₂ : RFS, RR
62	Y	Ch	?	203	I ₁ , I ₂ , end of Tx		<0.1% 0.1%-1% >1%		I ₁ : EFS, RFS I ₂ : EFS, RFS	I ₁ : EFS, RFS I ₂ : EFS, RFS
28	Y	A	89	517	I ₁ , I ₂	<0.1%	<0.1%		I ₁ : RFS, OS I ₂ : RFS, OS	I ₁ : RFS, OS I ₂ : RFS, OS

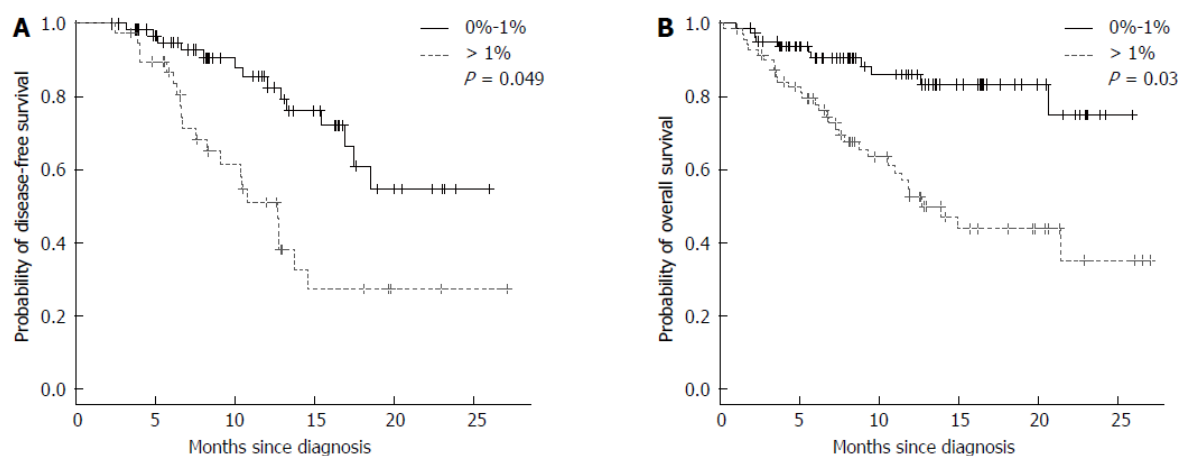
Tableau 10 : (Suite) Principales études sur la valeur pronostique de la MRD mesurée par CMF selon l'ELN 2018 (17).

Reference	Multicenter, yes/no	Study population, adult/children	% LAIP	Number of patients	MRD measurement following	Cutoff MRD level			Univariate analysis significant for	Multivariate analysis significant for
						I	C	Post-Tx		
30	Y	A	93	427	I ₁ , I ₂	<0.1%	<0.1%		I ₁ : RFS, OS I ₂ : RFS, OS	
32	N	A, Ch	100	253	Pre-Tx	<0.1%		DFS OS		
92	Y	A	?	210	I, C	0.035%	0.035%		I, C: DFS, OS	
76	N	A	100	359	Pre-Tx	0.1%			OS, PFS, RFS	
93	Y	A	100	306	At the time of morphological CR	<0.01% 0.01%-0.1% >0.1%			RFS	
94	Y	Ch	78	101	Day 15, pre-C	0.1%	0.1%		Day 15: EFS, OS Pre-C: EFS, OS	
95	Y	Ch (1-21 y)	?	216	I ₁ , I ₂	<0.1%, 0.1%-1% >1%	- -		I ₁ , I ₂ : EFS I ₁ , I ₂ : OS	
96	N	A	100	241	Pre-Tx	0.1%			DFS, OS, relapse	

ii. Approche des cellules souches leucémiques (CSL)

Des études ont montré que les CSL étaient capables à elles seules de développer une LAM lorsqu'elles étaient greffées dans une souris immunodéficiente (26). Elles possèdent différentes propriétés communes aux cellules souches hématopoïétiques qui sont les cellules progénitrices de tous les éléments figurés du sang (hématies, plaquettes et leucocytes). Ces propriétés comprennent la capacité d'auto-renouveau, la résistance à l'apoptose, la quiescence cellulaire et une augmentation de l'efflux des médicaments ce qui peut entraîner une diminution de l'efficacité des thérapies conventionnelles sur les CSL (27). Un taux élevé de CSL a été identifié comme facteur prédictif indépendant de rechute et de survie globale chez les patients atteints de LAM (**Figure 5**) (28).

Figure 5 : Survie sans rechute et survie globale des patients atteints de LAM en fonction du taux de CSL (28)



Les CSL peuvent être détectées par immunophénotypage grâce à différents marqueurs dont certains permettent de les différencier des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Le profil immunophénotypique CD34+ CD38- est largement utilisé afin de détecter les CSL mais il détecte également les CSH (26). Différentes études ont montré l'intérêt d'utiliser d'autres marqueurs tels que le CD90, CD45RA, CD123, CLL1, TIM3, CD36 et CD97 afin de distinguer les CSL des CSH (**Tableau 11**) (29–35). Dans l'étude de Zeijlemaker et al. les CSL sont définies par l'immunophénotypage suivant : CD34+CD38- et CD44++ et/ou CD123++ et/ou CD33++ et/ou CLL-1+ et/ou TIM-3+ et/ou CD45RA+ et/ou Lin+ (par opposition aux CSH qui sont Lin- c'est-à-dire CD2-/CD7-/CD11b-/CD14-/CD15-/CD19-/CD22-/CD56-) (36).

Tableau 11 : Liste de certains marqueurs retrouvés sur les CSL et leur expression potentielle à la surface des CSH et des autres cellules sanguines saines, d'après l'étude de Hanekamp et al.(37)

Marker	Identified as	Expression	Expression			References
			Normal	In AML (%)	HSC	
IL1RAP	IL1R3	T cells	79	-	+	[70-72]
CLL-1	CLEC12A, MICL, DCAL-2	Myeloid cells	70	-	+	[6]
TIM-3	T-cell Ig Mucin 3	Activated T cells, NK cells	91	-	+	[73]
CD2	SRBC, LFA2, T11	T cells, NK cells	87	-	+	[14]
CD7	GP40, TP41, LEU-9	T cells	43	-	+	[6]
CD11b	Integrin alpha M, Mac-1	Myeloid cells	55	-	+	[6]
CD22	BL-CAM, Siglec-2	B cells	51	-	+	[6]
CD25	IL2RA, TAC	Activated B and T cells	25	-	+	[74]
CD33	P67, Siglec-3	Myeloid cells, NK cells	82	+	++	[6] [75]
CD44	Adhesion molecule	Ubiquitously	100	+	++	[6]
CD45RA	Tyrosine phosphatase receptor type C	T cells, myeloid cells	65	-	+	[76]
CD47	Integrin-associated protein (IAP)	Ubiquitously	100	+	++	[77]
CD56	N-CAM, MSK39	NK cells, activated T cells	32	-	+	[6]
CD96	TACTILE	Activated T cells	33	-	+	[6]
CD99	MIC2, single-chain type-1 glycoprotein	Myeloid cells	83	-	+	[78]
CD123	IL3R	Myeloid cells	82	+	++	[6] [48] [79]

Les stratégies LAIP et CSL sont des méthodes complémentaires. L'inclusion des CSL dans les MRD standard par CMF a permis d'améliorer l'évaluation de la valeur pronostique. Dans l'étude de Zeijlemaker et al., les patients MRD- CSL- après 2 cycles de consolidation présentaient le meilleur pronostic (incidence cumulée de rechute à 3 ans (CIR) 35% et survie globale à 3 ans (OS) 66%). Les patients avec une MRD+ CSL- avaient des résultats similaires (CIR 43% et OS 68%). Les patients présentant des CSL positives semblaient avoir un moins bon pronostic (CSL+ MRD- CIR 53% et OS 53%). La valeur pronostique était significative uniquement lorsque la présence de CSL était associée à une MRD positive (CIR 100% OS 0%) (**Figure 6**) (38). Des résultats similaires ont été obtenus dans l'étude de Terwijn et al. avec cependant une différence au niveau du groupe CSL+ MRD- qui présentait une différence de survie globale significative avec le groupe CSL- MRD- et CSL+ MRD+ (**Figure 7**) (39). Cette discordance provient probablement de la différence de seuil de positivité des CSL entre les deux études. En effet, il n'existe pas à ce jour de seuil établi de CSL prédictif de rechute (28,38).

Enfin, une autre étude a montré que la détection de CSL en post greffe avait un impact négatif sur la survie (40).

Figure 6 : Valeur pronostique du statut CSL/MRD sur l'incidence cumulée de rechute (à gauche) et sur la survie globale (à droite) pendant le suivi. (seuil de CSL à 0,03%) (38).

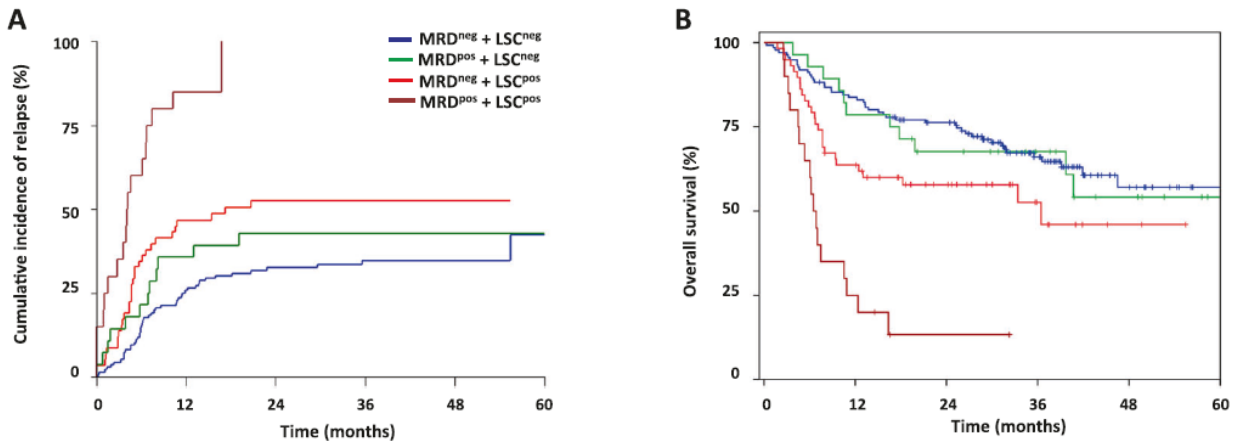
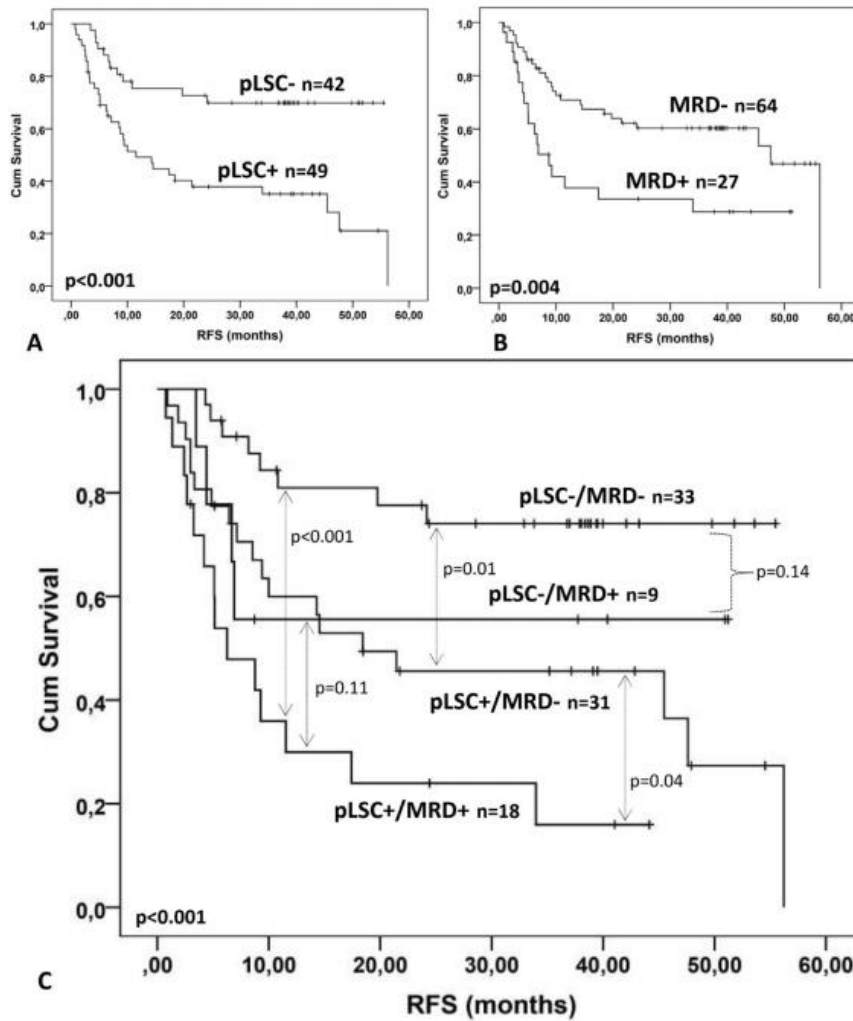


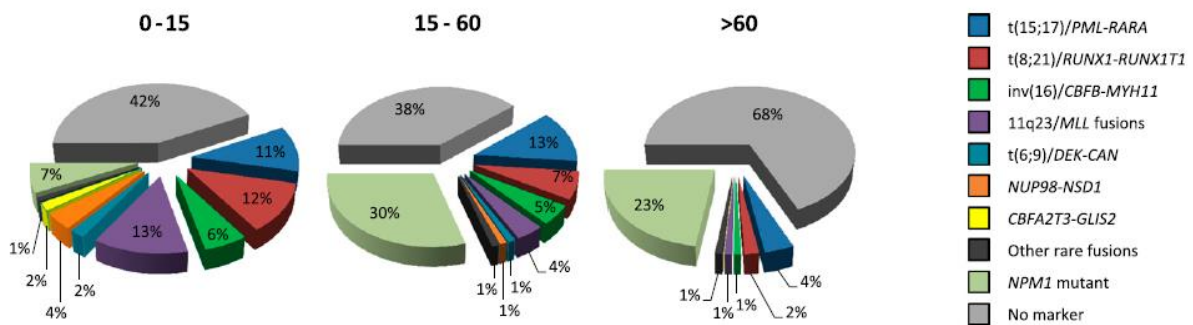
Figure 7 : Valeur pronostique des stratégies combinées LSC et LAIP selon l'étude de Terwijn et al. (seuil de CSL à 0,03%) (39).



b. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire

Il existe deux approches principales pour étudier la MRD par biologie moléculaire, la PCR quantitative en temps réel traditionnellement utilisée et le séquençage, en particulier le séquençage haut débit qui est en cours de développement. Des marqueurs moléculaires sont retrouvés dans 60% des cas en moyenne mais ce taux est plus faible parmi les patients plus âgés (32% pour les patients de plus de 60 ans) (**Figure 8**) (1).

Figure 8 : Proportion de patients présentant une MRD par BM informative en fonction des marqueurs et des âges (1)



Les marqueurs moléculaires utilisés le plus fréquemment pour l'étude de la MRD sont les transcrits de fusion CBFB-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 et PML-RARA ainsi que la mutation NPM1. En effet, ces derniers sont de puissants marqueurs prédictifs de rechute. Le transcrit CBFB-MYH11 est issu de l'inversion du chromosome 16 ou de la translocation des chromosomes 16, le transcrit RUNX1-RUNX1T1 de la translocation des chromosomes 8 et 21 et PML-RARA de la translocation des chromosomes 15 et 17. Ces marqueurs moléculaires possèdent une bonne sensibilité allant de 10^{-4} à 10^{-6} en fonction des études. Le seuil pronostique n'est pas clairement déterminé car il dépend de la sensibilité inhérente à la technique (**Tableau 12 et 13**). De plus, l'ELN précise l'importance de la prise en compte de la cinétique dans l'interprétation d'un résultat, notamment une rechute moléculaire est définie par deux prélèvements successifs positifs qui augmentent d'au moins un log. Par exemple, dans le protocole BIG selon lequel nos patients sont traités, une décroissance de moins de 4 log de la mutation NPM1 dans le sang en post-consolidation n°1 reclasse le patient dans le groupe « pronostic défavorable » s'il était initialement inclus dans le groupe de pronostic favorable.

Du fait de son manque de sensibilité et de spécificité (**Tableau 12 et 13**), la surexpression du gène WT1, pourtant marqueur pronostique pertinent, ne devrait être utilisé que lorsqu'il n'existe pas d'autres marqueurs de MRD, y compris par cytométrie en flux (17,41).

Tableau 12 : Principales études sur la valeur pronostique et le seuil prédictif de rechute de la MRD mesurée par BM selon l'ELN 2018 (13).

Gene	Number of patients	Time point	PB vs BM	cDNA vs DNA	Favorable prognostic cutoff (proportion of patients)	Associated risk	Sensitivity of the assay	Reference
NPM1	194	After 2 cycles of chemotherapy	PB	cDNA	Negative (84.5%)	3-y CIR 30% (vs 82% if positive), 3-y OS 75% (vs 24% if positive)	10^{-5} (range, $10^{-3.7}$ to $10^{-7.1}$)	60
NPM1	137	After 2 cycles of chemotherapy	BM	cDNA	Negative (19%)	4-y CIR 6.4% (vs 53% if positive), 4-y OS 90% (vs 56% if positive)	10^{-5} to 10^{-6}	54
NPM1	82	After 2 cycles of chemotherapy	BM	cDNA	Negative (26%)	3-y OS 84% (vs 76% if NPM1/ABL $\leq 1\%$ vs 47% if NPM1/ABL $> 1\%$)		53
NPM1	194	At end of treatment	PB	cDNA	Negative (92%)	3-y OS 80% (vs not estimable if positive)	10^{-5} (range, $10^{-3.7}$ to $10^{-7.1}$)	60
NPM1	131 (for PB)	After 1 or 2 induction cycles	PB	cDNA	$\geq 4 \log_{10}$ reduction (55%)	3-y CIR 20.5% (vs 65.8% if $< 4 \log_{10}$ reduction); 3-y OS 91% (vs 93% (vs 40.8% if $< 4 \log_{10}$ reduction)	0.01%	78
NPM1	129	At end of treatment	BM	cDNA	Negative (48%)	4-y CIR 15.7% (vs 66.5% if positive), 4-y OS 80% (vs 44% if positive)	10^{-5} to 10^{-4}	54
NPM1	80	At end of treatment	BM	cDNA	Negative (49%)	1-y CIR 37% (vs 63% if NPM1/ABL $\leq 1\%$ vs 85% if NPM1/ABL $> 1\%$); 2-y OS 82% (vs 61% if NPM1/ABL $\leq 1\%$ vs 45% if NPM1/ABL $> 1\%$)	10^{-5}	53
NPM1	136	In follow-up	BM	cDNA	< 200 copies (68% of patients completing chemotherapy)	No relapses occurred.	10^{-5} to 10^{-6}	54
RUNX1-RUNX1T1	94	At end of treatment	PB	cDNA	Negative (70%)	4-y CIR 23.6% (vs 50.9% if positive), 4-y OS 96% (vs 63.6% if positive)	10^{-5}	73
RUNX1-RUNX1T1	120	At end of treatment	BM	cDNA	Negative (49%)	4-y EFS 81% (vs 61% if positive), 4-y OS 93% (vs 67% if positive)	10^{-4}	72
RUNX1-RUNX1T1	94	At end of treatment	BM	cDNA	Negative (30%)	4-y CIR 28.2% (vs 33.8% if positive), 4-y OS 86.4% (vs 87.7% if positive, n.s.)	10^{-5}	73

Tableau 13: (suite) Principales études sur la valeur pronostique et le seuil prédictif de rechute de la MRD mesurée par BM selon l'ELN 2018 (13).

Gene	Number of patients	Time point	PB vs BM	cDNA vs DNA	Favorable prognostic cutoff (proportion of patients)	Associated risk	Sensitivity of the assay	Reference
RUNX1-RUNX1T1	163	In follow-up	PB	cDNA	<100 copies/10 ⁵ ABL copies (85%)	5-y CIR 7% (vs 100% if ≥ 100), 5-y OS 95% (vs 59% if ≥ 100)	10 ⁻⁵	70
RUNX1-RUNX1T1	163	In follow-up	BM	cDNA	<500 copies/10 ⁵ ABL copies (83.5%)	5-y CIR 7% (vs 100% if ≥ 500), 5-y OS 94% (vs 57% if ≥ 500)	10 ⁻⁵	70
CBFB-MYH11	115	At end of treatment	PB	cDNA	<10 copies/10 ⁵ ABL copies (80%)	5-y CIR 36% (vs 78% if ≥ 10)	10 ⁻⁵	70
CBFB-MYH11	115	In follow-up	PB	cDNA	<10 copies/10 ⁵ ABL copies (69%)	5-y CIR 7% (vs 97% if ≥ 10), 5-y OS 91% (vs 57% if ≥ 10)	10 ⁻⁵	70
CBFB-MYH11	115	In follow-up	BM	cDNA	<50 copies/10 ⁵ ABL copies (73%)	5-y CIR 10% (vs 100% if ≥ 50), 5-y OS 100% (vs 25% if ≥ 50)	10 ⁻⁵	70
PML-RARA	301	At end of treatment (ATRA + anthracycline based)	BM	cDNA	Negative (95%)	3-y CIR 11% (vs 34% if positive)	At least 10 ⁻³	66
PML-RARA	115	At end of treatment (ATO + ATRA, low and intermediate risk APL)	BM	cDNA	Negative (100%)	4.2-y CIR 1.9%	n.d.	67
WT1	129	After induction	PB or BM	cDNA	≥ 2 log reduction in the same tissue (PB or BM) (6.2%)	5-y CIR 40% (vs 75% if < 2 log)	10 ⁻⁴	45
WT1	584	At end of treatment	BM	cDNA	<10 copies (32%)	3-y CIR 25% (vs 45% if 10-100 copies vs 72 of > 100 copies), 3-y OS 72% (vs 59% if 10-100 copies vs 30% if > 100 copies)	10 ⁻⁴	46

II. Objectifs

Depuis 2018, le laboratoire d'hématologie du CHU de la Timone à Marseille réalise l'analyse de MRD par CMF des LAM à la suite d'un travail collaboratif multicentrique pour les patients inclus dans les études cliniques BIG et ALFA-1200.

L'objectif de ce travail a été d'évaluer l'applicabilité de cette analyse au sein de notre laboratoire.

III. Matériels et méthodes

A. Patients

Nous avons travaillé à partir d'une cohorte rétrospective comprenant les patients hospitalisés à l'AP-HM atteints de LAM de novo ou secondaires diagnostiqués entre janvier 2018 et décembre 2020. Les informations clinico-pathologiques ont été obtenues par l'examen des dossiers médicaux. Les critères d'inclusion étaient l'âge supérieur à 18 ans au moment du diagnostic et la présence d'au moins de 2 points de suivi hors diagnostic. Les patients inclus étaient traités selon le protocole BIG.

B. Matériel et méthode

1. Prélèvements

Au moment du diagnostic et lors du suivi des patients, le médecin prélève au niveau de l'épine iliaque ou du sternum un échantillon de moelle osseuse (MO) qu'il étale directement sur des lames puis 2 tubes EDTA permettant l'analyse de la CMF et de la biologie moléculaire et enfin une seringue héparinée pour effectuer le caryotype. Ces prélèvements sont réalisés à des temps précis du parcours de soin du patient, au diagnostic, en post induction, pendant la consolidation, durant la surveillance post thérapeutique, post greffe et devant une suspicion de rechute.

2. Cytométrie en flux

a. Traitement des échantillons

Après réception au laboratoire de la Timone du tube EDTA contenant 1 à 2 mL de prélèvement médullaire, ce dernier doit être techniqué dans les 24 à 48h afin de limiter l'altération des cellules et ainsi obtenir une bonne sensibilité.

b. Evaluation de la pureté de la MO

Afin d'évaluer la qualité du prélèvement médullaire, sa pureté est calculée grâce à la formule d'Holdrinet (42) (**Figure 9**). Pour cela, il est nécessaire de réaliser la numération de la moelle osseuse et du sang périphérique du patient afin d'obtenir la quantité d'hématies et de leucocytes dans ces deux prélèvements. Cette formule permet d'apprécier l'éventuelle dilution de la moelle osseuse, information importante pour l'interprétation des résultats.

Figure 9 : Formule d'Holdrinet (42)

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

GR_{Mo} : Quantité d'hématies dans la moelle osseuse

GR_{Sg} : Quantité d'hématies dans le sang périphérique

GB_{Mo} : Quantité de leucocytes dans la moelle osseuse

GB_{Sg} : Quantité de leucocytes dans le sang périphérique

c. Macrolyse ou lyse en macrovolume

Le but de la macrolyse est d'une part de lyser les globules rouges et érythroblastes et d'autre part de concentrer l'échantillon. Un volume de moelle osseuse est mélangé avec 24 volumes de lyse NH_4Cl ($\text{pH}=7,4$) par retournement. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, l'échantillon est centrifugé 10 minutes à $1100g$ à 4°C . Après 2 lavages de 10mL de PBS ($\text{pH}=7,2$), le culot cellulaire est repris avec $500\mu\text{l}$ ou 1mL de PBS (en fonction de la taille du culot) avant d'être numéré à partir d'une dilution au $1/10$. La suspension cellulaire est ajustée à 2 millions cellules/ $100\mu\text{L}$.

d. Marquage des échantillons et panel utilisé

L'expression antigénique est analysée en utilisant des combinaisons de plusieurs fluorochromes: brillant violet 421 (BV421), brillant violet 500 (BV500), fluoresceine isothiocyanate (FITC), phycoerythrine (PE), phycoerythrine-Texas Red (ECD), peridinine chlorophylle protéine-cyanine5.5 (PerCP-Cy5.5), phycoerythrine cyanine 7 (PC7), allophycocyanine (APC), allophycocyanine alexa fluor 700 (AAF700), allophycocyanine H7 (APC-H7) et allophycocyanine alexa fluor 750 (AAF750) fournis par les laboratoires BD (Becton Dickinson) et BC (Beckman-Coulter).

Les différents anticorps nécessaires à l'analyse de la MRD sont répartis en plusieurs tubes. Entre 2018 et 2019 le laboratoire utilisait des tubes 8 couleurs pour l'analyse de la MRD (**Tableau 14**). Puis en 2020 conformément aux recommandations du groupe, des tubes 10 couleurs ont été mis en place permettant l'ajout de différents marqueurs (comme le HLA-DR et le CD10 dans le tube 1 LAIP) (**Tableau 15**). Dans chaque tube sont incubés avec les anticorps 100µL de suspension cellulaire préalablement décrite au § III.B.2.c pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité.

Tableau 14 : Panels d'anticorps 8 couleurs (8C) utilisés afin déterminer la MRD de 2018 à 2019

Tubes 8C de maladie résiduelle	FL9	FL10	FL1	FL2	FL4	FL5	FL6	FL8
T1 (LAIP)	CD117-BV421	CD45-V500	CD7+56-FITC	CD13-PE	CD33-PerCP Cy5.5	CD38-PC7	CD34-APC	CD19-APC-H7
T2 (CSL)	CD117-BV421	CD45-V500	CD90-FITC	Mix*-PE	CD123-PerCP Cy5.5	CD38-PC7	CD34-APC	CD45RA-APC-H7
T3 (Monocytaire)	CD117-BV421	CD45-V500	CD65-FITC	CD4-PE	CDD33-PerCP Cy5.5	CD11b-PC7	CD34-APC	CD14-AAF750

Tableau 15 : Panels d'anticorps 10 couleurs (10C) utilisés afin de déterminer la MRD à partir de 2020

Tubes 10C de maladie résiduelle	FL9	FL10	FL1	FL2	FL3	FL4	FL5	FL6	FL7	FL8
T1 (LAIP)	CD117-BV421	CD45-V500	CD7+56-FITC	CD13-PE	HLA-DR-ECD	CD33-PerCP Cy5.5	CD38-PC7	CD34-APC	CD10-AAF700	CD19-APC-H7
T2 (CSL)	CD117-BV421	CD45-V500	CD90-FITC	Mix*-PE	CD19-ECD	CD123-PerCP Cy5.5	CD38-PC7	CD34-APC	CD36-AAF700	CD45RA-APC-H7
T3 (Monocytaire)	CD117-BV421	CD45-V500	CD65-FITC	CD4-PE	HLA-DR-ECD	CDD33-PerCP Cy5.5	CD11b-PC7	CD34-APC	CD36-AAF700	CD14-AAF750

*Mix comprend les anticorps anti : CD97, CD366 (TIM3) et CD371 (CLL1).

Le tube 1 (T1) ou tube LAIP permet de déterminer le phénotype de la LAM mais aussi de caractériser et suivre les LAIP. Le tube 2 (T2) ou tube CSL sert à détecter la présence de CSL.

Le tube 3 (T3) ou tube monocytaire est utile dans les LA à composante monocytaire afin de caractériser d'autres LAIP.

Les tubes T1 et T2 sont réalisés pour tous les patients, le tube 3 uniquement pour ceux avec une composante monocytaire.

Après marquage, les tubes sont lavés avec 3mL de PBS, puis les culots cellulaires sont repris avec 500µL de PBS avant d'être analysés sur le cytomètre. Toutes les acquisitions sont réalisées grâce à un cytomètre Navios (Beckman-Coulter) et les analyses sont effectuées avec le logiciel Kaluza® (Beckman-Coulter). Un minimum de 500 000 cellules vivantes est acquis pour obtenir une sensibilité potentielle de 10^{-4} soit 0,01 %.

e. Standardisation

La standardisation au sein du groupe de travail est réalisée grâce aux billes Rainbow. Les cibles pour les différents canaux de lecture sont données par le groupe pour un type d'automate donné (ici Navios BC). La réalisation de la matrice de compensation pour ces réglages passe par l'utilisation de billes VersaComp® « positives » et négatives (Beckman-Coulter). Les billes positives sont capables de fixer n'importe quelle association d'AC monoclonaux/fluorochrome alors que les billes négatives ne fixent aucun anticorps. Des tubes monomarqués contenant des billes VersaComp® positives et négatives marquées avec les différents fluorochromes du panel sont analysés un à un par le cytomètre pour établir la matrice de compensation. Le dernier tube contenant un mélange de tous les tubes précédents, est analysé pour appliquer et éventuellement corriger la matrice de compensation précédemment générée. Ces différentes étapes sont gérées via une application automatique présente sur le cytomètre appelée Autosetup® (Beckman-Coulter). La matrice de compensation obtenue pourra être affinée par l'opérateur si besoin.

f. Contrôles de qualité

Différents contrôles de qualité sont passés sur chaque cytomètre afin de s'assurer du bon fonctionnement et de la standardisation des cytomètres. On distingue le contrôle de qualité interne (CIQ) flow check, le CIQ externalisé immunotrol et les contrôles de calibration flow set et billes 8Peak « Rainbow ».

Le contrôle flow check est passé tous les jours et permet de s'assurer du bon fonctionnement fluide et optique grâce à des billes de taille et de fluorescence différentes.

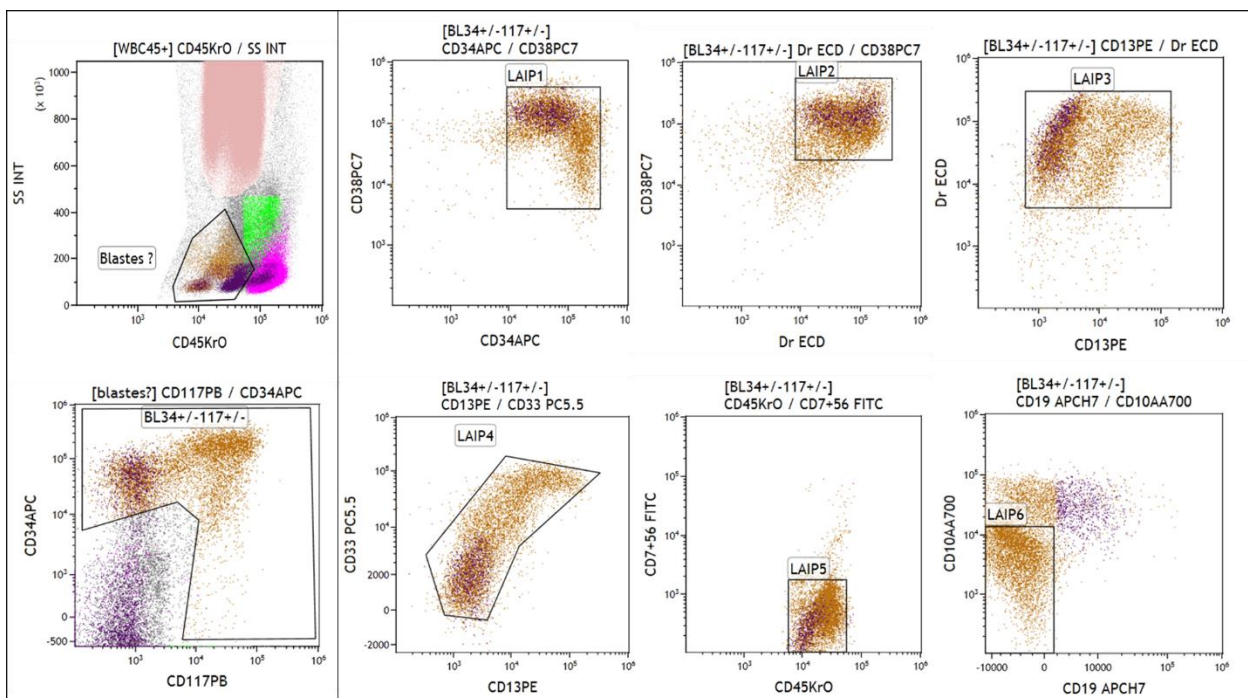
L'immunotrol est un sang stabilisé qui est lysé, marqué par des AC et acquis quotidiennement sur le cytomètre ce qui permet de contrôler toutes les étapes du marquage. Les pourcentages d'expression des marqueurs d'intérêt CD3, CD4, CD8, CD19 sont confrontés à ceux donnés par le fournisseur pour le lot concerné et sont externalisés pour comparaison avec le groupe de pairs.

Le contrôle flow set permet de suivre l'évolution des niveaux de fluorescence (sensibilité du cytomètre et contrôle des photomultiplicateurs ou PMT) grâce à des billes de polystyrène fluorescentes passées quotidiennement. Les billes 8Peak « Rainbow » quant à elles permettent la standardisation de technique et les travaux multisites et multicytomètres grâce à des cibles définies par le groupe de travail.

g. Moelles osseuses normales

Nous avons utilisé 7 moelles osseuses normales provenant de patients prélevés dans un contexte de don de moelle osseuse ou de moelle de régénération qui ont été traitées comme les moelles osseuses des patients atteints de LAM comme décrits précédemment. Les MO normales sont indispensables pour déterminer les LAIP des patients atteints de LAM. En effet, les immunophénotypes des MO pathologiques sont comparés à ceux des MO normales comprenant des myéloblastes de régénération (**Figure 10**) afin d'en identifier les aberrations immunophénotypiques. Elles permettent également de déterminer le seuil de sensibilité de l'analyse ; moins un LAIP est présent dans la MO normale, plus l'analyse sera sensible.

Figure 10: Immunophénotypage d'une MO normale, en marron les blastes de régénération, en violet les hémotogones, en saumon les granuleux, en vert les monocytes et en rose les lymphocytes.



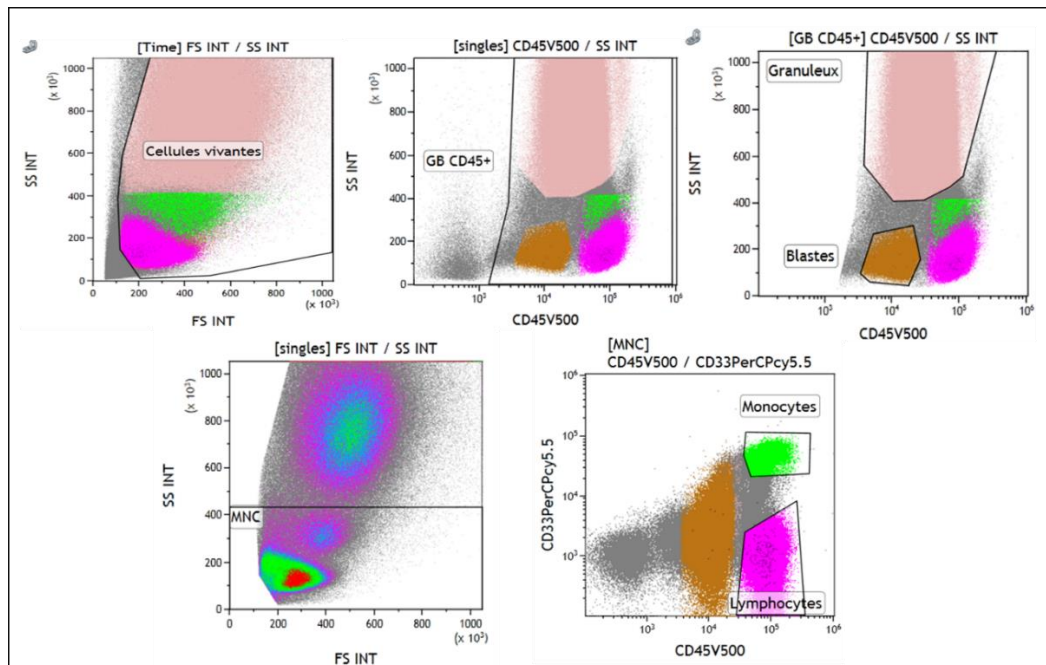
h. Stratégie de fenêtrage

i. Sélection des différentes populations

Sur le graphe taille/structure (FS/SS), les fragments et débris cellulaires (FS faible) sont exclus pour ne garder que les cellules vivantes (**Figure 11**). Puis sur le graphe CD45/SS les leucocytes sont sélectionnés grâce au marqueur panleucocytaire CD45 après élimination des globules rouges et débris restants (CD45 négatifs).

La stratégie de sélection commence par l'identification des différentes populations en fonction de l'expression du CD45 et des propriétés de structure (SS) (**Figure 10**). Les granuleux (en saumon) sont CD45 positifs avec un SS variable traduisant leur hétérogénéité de structure. Les blastes (en marron) sont en général CD45 faible et SS faible, leur fenêtrage varie en fonction du type de la LAM. Après sélection des cellules mononucléées (MNC) qui sont SS faible, les lymphocytes (en rose) et les monocytes (en vert) sont séparés grâce au graphe CD45/CD33. Ces deux populations ont une expression forte du marqueur CD45 et se distinguent par l'expression du CD33 qui est positive sur les monocytes et négative sur les lymphocytes.

Figure 11: Sélection des différentes populations, exemple du patient 16. Grâce à la taille (FS), à la structure (SC), à l'expression du CD45 et du CD33, la lignée granuleuse (en saumon), les blastes (en marron), les lymphocytes (en rose) et les monocytes (en vert) sont sélectionnés.



Par la suite, des étapes de sélection multiples reposant sur des marqueurs spécifiques sont réalisées sur les blastes afin d'identifier les LAIP et les CSL. La population leucémique résiduelle est quantifiée en pourcentage du nombre total de cellules CD45 viables. Les cellules souches leucémiques sont exprimées en pourcentage du nombre total de blastes myéloïdes.

ii. Stratégie LAIP

Les LAIP sont déterminés au moment du diagnostic en identifiant les blastes leucémiques présentant des phénotypes aberrants par rapport aux cellules normales et recherchés à chaque point de suivi. Les fenêtrages de ces LAIP permettent d'obtenir un protocole d'analyse propre à chaque patient leucémique qui sera appliqué à différentes moelles normales afin d'en déterminer la sensibilité. Un LAIP moins présent dans une moelle normale sera plus sensible. De ce fait, le niveau de sensibilité varie en fonction des aberrations phénotypiques des blastes leucémiques par rapport au phénotype des cellules normales ou en régénération de la moelle osseuse. Une sensibilité sur moelle normale inférieure à 0,1% est nécessaire pour valider un protocole d'analyse des LAIP.

Une sélection préalable des différentes populations et en particulier des blastes est nécessaire (§ii). Puis, les blastes myéloïdes CD34 et/ou CD117 positifs sont sélectionnés grâce au graphe CD34/CD117 qui permet également de rechercher d'éventuels marqueurs aberrants (**Figure 12**). Les LAIP sont ensuite déterminés grâce à l'étude de l'expression différentielle de certains marqueurs entre la moelle blastique au diagnostic et les moelles contrôles. Dix marqueurs sont utilisés, le CD117, CD34, CD38, HLA-DR, CD13, CD33, CD45, CD7+/- CD56, CD19 et CD10. Une fenêtre booléenne permet de déterminer le nombre de cellules présentes dans l'ensemble des fenêtres LAIP 1 à 6 et ainsi d'isoler les cellules blastiques. (**Figure 13**).

Figure 12 : Graphe CD34/CD117 permettant la sélection des blastes myéloïdes CD34 et/ou CD117 positifs et la recherche de LAIP dans le TI. Exemple du patient 10 qui présente une perte aberrante du CD34 sur les blastes (encadré en rouge).

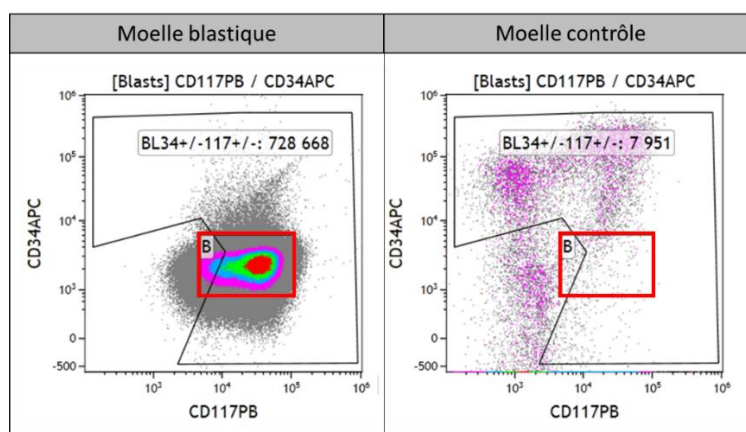
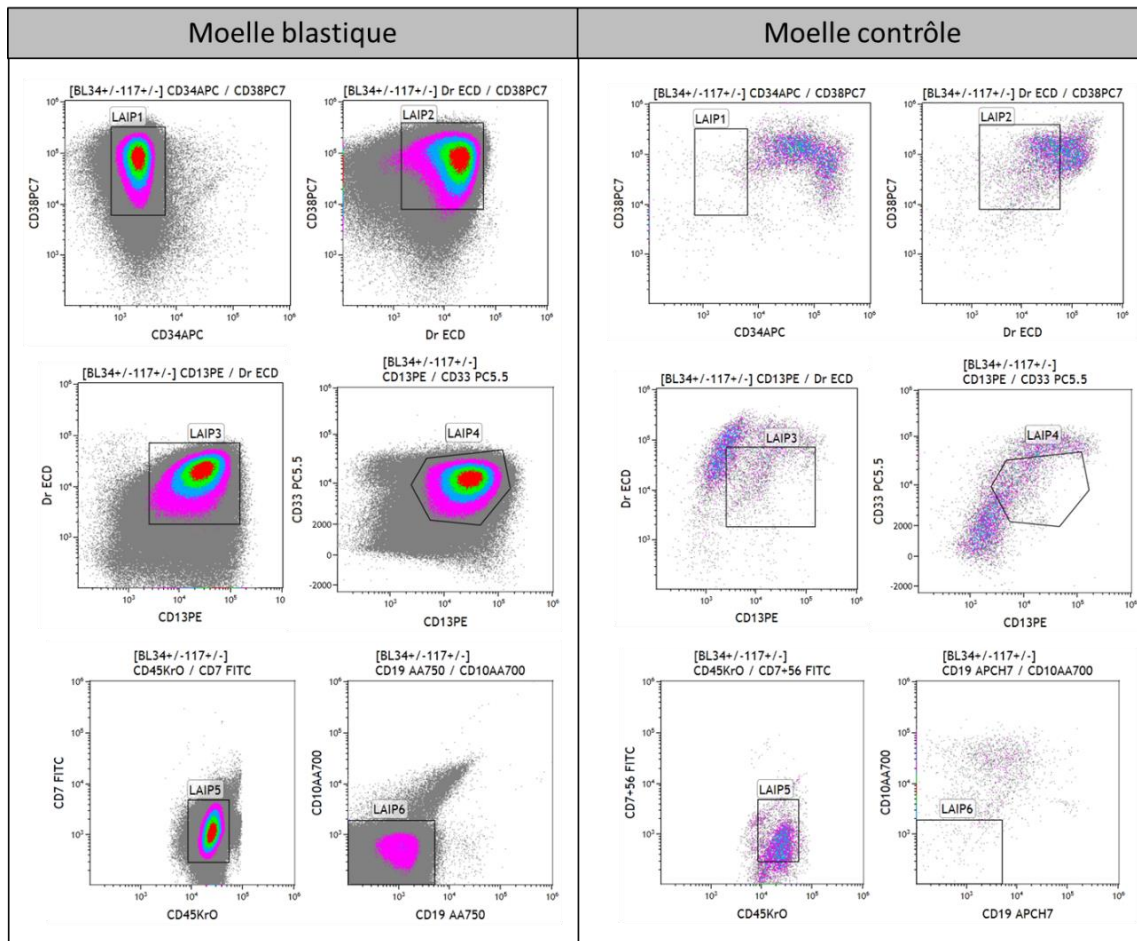


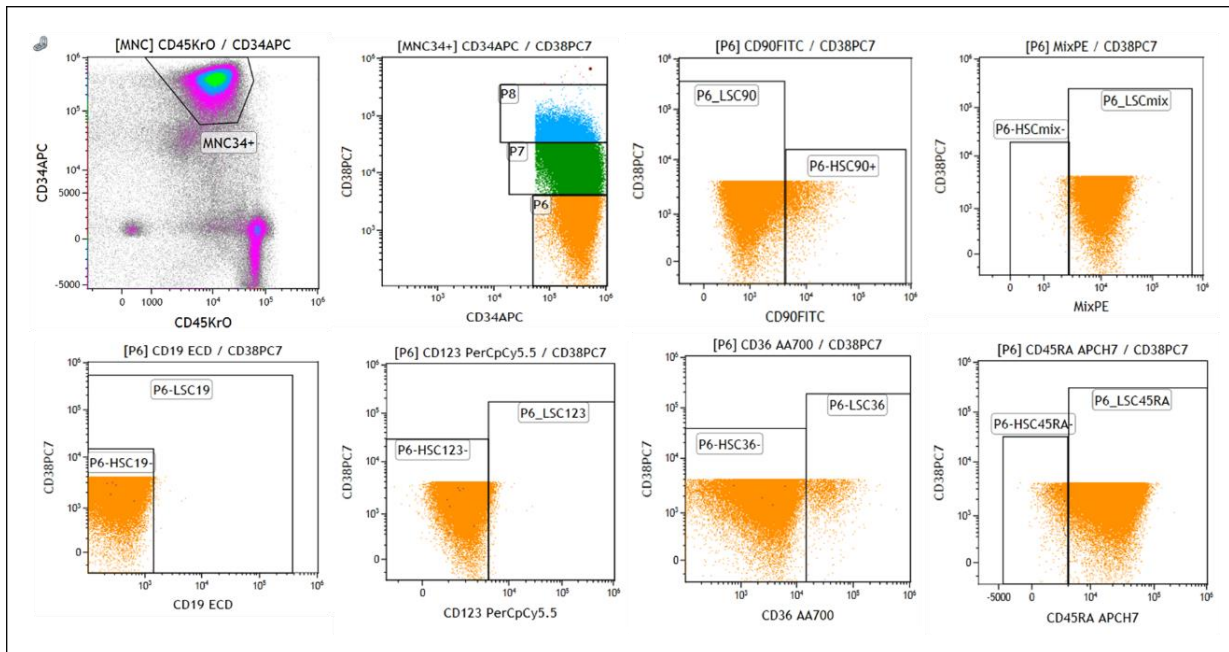
Figure 13 : Graphes permettant la recherche de LAIP sur les blastes myéloïdes d'une moelle blastique (à gauche) comparé à une moelle contrôle (à droite). Exemple du patient 10 qui présente sur les blastes myéloïdes une perte d'expression du CD34, une diminution d'expression du HLA-DR et l'expression aberrante du CD7 sur une partie des blastes



iii. Stratégie CSL

La recherche de cellules souches leucémiques CD34+CD38- est réalisée au diagnostic et à chaque point de suivi. Parmi les cellules mononuclées CD34+, l'intensité d'expression du CD38 met en évidence 3 populations en fonction de leur maturation : en P8 les cellules les plus matures CD38 fort et en P6 les cellules les plus immatures CD38- comprenant les cellules souches leucémiques et les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Afin de différencier les CSL des CSH, d'autres marqueurs sont utilisés comme le CD90, le mix comprenant le CD97, CLL1 et TIM3, CD123, CD45RA et CD36 (**Figure 14**). Ces marqueurs n'ont pas à eux seul une sensibilité ni une spécificité optimale vis-à-vis des cellules souches leucémiques. C'est l'utilisation combinée de ces marqueurs qui permet de détecter les cellules souches leucémiques. Selon la littérature, l'immunophénotype des CSL est CD34+ CD38- CD90- et/ou Mix+ et/ou CD123+ et/ou CD45RA+ et/ou CD36+.

Figure 14 : Stratégie de fenêtrage des CSL. Exemple du patient 4 présentant 38% de CSL au diagnostic. Le phénotype retenu pour les CSL est CD34+ CD38- CD90- et/ou Mix+ et/ou CD123+ et/ou CD36+ et/ou CD45RA+.



Les cellules CD34+ sont réparties selon un gradient d'intensité d'expression du CD38 représenté par 3 fenêtres (P6, P7 et P8). La fenêtre P8 contient les cellules CD34+CD38+, la fenêtre P7 les événements CD34+CD38low et la fenêtre P6 inclut les cellules souches CD34+CD38-. C'est cette fenêtre qui nous permet d'évaluer le taux de CSL. Différentes stratégies sont utilisées pour fixer les seuils nécessaires à la sélection des CSL. Le seuil de négativité entre P6 et P7 est fixé grâce à un tube contrôle fluorescence minus one (FMO). Il s'agit d'analyser sur le cytomètre un tube de moelle marquée seulement avec du CD45 et du CD34 afin de déterminer le seuil de négativité du CD38. Les hémotogones, cellules lymphoïdes immatures CD34+ CD38 fort permettent de fixer le seuil entre P7 et P8.

3. Cytogénétique

L'ensemble des analyses de cytogénétiques (caryotypes et FISH) est réalisé à partir du prélèvement médullaire effectué sur seringue héparinée au laboratoire de cytogénétique du CHU de Marseille.

4. Biologie moléculaire

Les analyses de biologie moléculaire sont externalisées au laboratoire d'hématologie du CHU de Lille (Pr Claude Preudhomme). Les prélèvements de moelle sont prélevés sur tubes EDTA (1 à 2 mL) et sont envoyés à l'état frais ou congelés en DMSO après macrolyse. Pour toutes LAM nouvellement diagnostiquées, les transcrits de fusion suivant sont recherchés RUNX1-RUNX1T1, PML-RARA, CFBF-MYH11, MLLT3-KMT2A, DEK-NUP214,

GATA2-MECOM, RBM15-MKL1, BCR-ABL1 par RT-MLPA. De plus certaines mutations sont également recherchées comme les mutations de NPM1, CEBPA et RUNX1 par RQ-PCR. Les quantifications des marqueurs utiles au suivi de la MRD sont exprimées en pourcentage, correspondant au rapport entre les transcrits de fusion ou les gènes mutés et les taux de transcrits d'ABL1, gène de référence.

Le bilan diagnostique de LAM comprend également la recherche de duplications de FLT3-ITD, surexpression d'EVI1, expression du gène WT1, mutations des gènes FLT3-TKD, IDH1, IDH2 par RQ-PCR. Enfin la technique NGS est utilisée afin de détecter d'autres mutations : ASXL1, BCOR, BCORL1, CALR, CBL, CSF3R, DNMT3A, ETV6, EZH2, FLT3-TKD, GATA2, IDH1, IDH2, JAK2, KIT, KRAS, MPL, NIPBL, NPM1, NRAS, PHF6, PTPN11, RAD21, RIT1, RUNX1, SETBP1, SF3B1, SMC1A, SMC3, SRSF2, STAG2, TET2, TP53, U2AF1, WT1 et ZRSR2.

5. Statistiques

Les variables quantitatives sont exprimées en médiane, minimum et maximum. Les variables qualitatives sont exprimées en effectif et/ou pourcentage.

L'analyse statistique a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPadPrism version 5.0 (Société GraphPad Software, Inc. San Diego, CA, USA). La méthode de Kaplan-Meier a été utilisée pour l'analyse de la survie. La comparaison entre les groupes a été effectuée à l'aide du test du log-rank. Un $p < 0.05$ est considéré comme significatif.

IV. Résultats

A. Description de la cohorte

Entre janvier 2018 et décembre 2020, 59 patients de plus de 18 ans ont eu un diagnostic de LAM au laboratoire d'hématologie de la Timone à Marseille. Treize patients ont été exclus en raison de l'absence de suivi par cytométrie en flux c'est-à-dire moins de 2 points de suivi hors diagnostic. Parmi les 46 patients restant, 5 patients n'ont pas eu de tube de maladie résiduelle au diagnostic par manque de matériel et ont été exclus. Au total, 41 patients ont été inclus dans l'analyse finale et le suivi médian était de 20 mois (**Figure 15**).

Figure 15 : Diagramme de flux

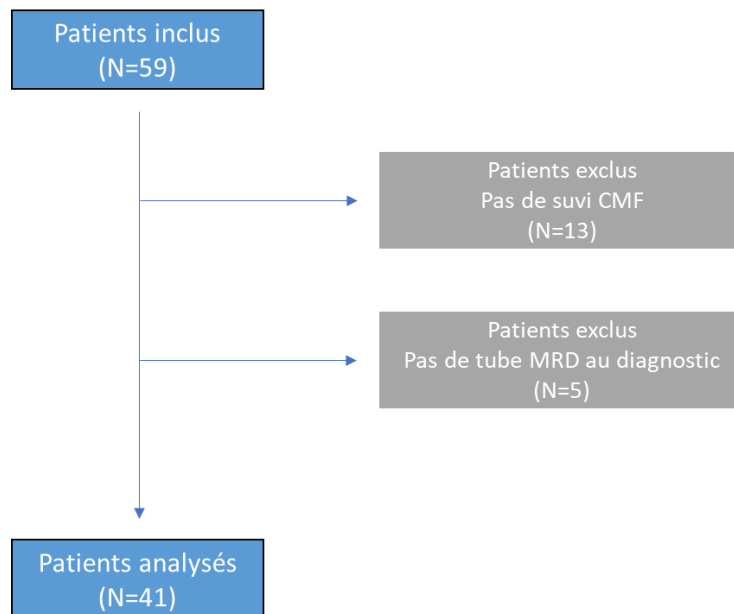


Tableau 16 : Caractéristiques générales de la population

Patient	sexe	Age au diagnostic	Hémoglobine (g/L) au diagnostic	Plaquettes (G/L) au diagnostic	GB (G/L) au diagnostic	PNN (G/L) au diagnostic	% de blastes circulants au diagnostic	% de blastes médullaires au diagnostic	OIMS	Classification FAB	Anomalies caryotypiques au diagnostic	Anomalies moléculaires au diagnostic	Risque pronostic
1	M	83	91	217	13	0,64	84	90	NOS : LAM sans maturation	LAM 1	del7p	WT1, TET2, CEBPA monoallélique	Intermédiaire
2	M	24	112	17	49	0,99	90	56	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	normal	Pas d'anomalie	Intermédiaire
3	M	34	100	60	2,5	0,35	3	32	Muté RUNX1	LAM 4	dérivé 21	RUNX1	Défavorable
4	M	64	74	23	9	1,5	63	peuvre mais blastique	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	caryo complexe	WT1	Défavorable
5	F	52	110	62	1,6	0,25	5	80	LAM inv 16	LAM 4 éosino	caryo complexe dont inv16	KRAS, WT1, CFB MYH11	Favorable
6	F	72	46	10	109	1,1	97	99	muté NPM1	LAM 1	normal	WT1, NPM1	Favorable
7	M	77	87	49	80	18	64	93	NOS : LA monoblastique / monocyttaire	LAM 5	t(5;14)	WT1, FLT3-ITD, DNMT3A, NUP98-NSD1	Défavorable
8	M	26	76	67	1,3	0,03	25	86	LAM avec t(9;11)	LAM 5	t(9;11)	KRAS, PTPN11, TP53, KMT2A-MLT3	Défavorable
9	M	79	71	93	6,8	0,54	46	40	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	del12p et trisomie14	WT1	Intermédiaire
10	M	50	59	101	113	5,7	80	86	NPM1 muté	LAM 2	normal	WT1, NPM1 FLT3-TKD, FLT3-ITD, DNMT3A, KIT	Défavorable
11	M	75	95	45	8,7	0,18	72	91	NOS : LA monoblastique / monocyttaire	LAM 5	del7q	BCOR, DNMT3A, FLT3-TKD, FLT3-ITD, IDH1, NRAS, PHF6, SMC1A, WT1	Défavorable
12	M	53	98	60	113	1,1	97	95	NPM1 muté	LAM 1	normal	WT1, NPM1, IDH2	Favorable
13	M	53	39	12	70	5,6	75	73	LAM inv 16	LAM 4 éosino	inv16 + trisomie 8	WT1, CFB MYH11	Favorable
14	M	53	64	15	15	1,8	58	71	NPM1 muté	LAM 2	normal	FLT3-TKD, WT1, NPM1	Favorable
15	F	87	95	673	1,9	0,37	41	24	LAM post SMP	LAM 2	complexe	ETV6, JAK2, TP53, EV1, WT1	Défavorable
16	M	77	78	89	8,3	4,1	18	25	LAM post SMD	LAM 2	normal	ND	ND
17	F	68	99	275	2,5	0,52	13	36	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	caryo complexe	TP53, WT1	Défavorable
18	M	78	112	95	1,2	0,64	6	37	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	trisomie 8	NR	Intermédiaire
19	M	41	93	6	1,8	0,16	18	45	LAM post SMD	LAM 2	t(3;21) avec trisomie 13	WT1, EV1	Intermédiaire
20	F	87	76	139	2,6	0,05	12	58	NOS : LA myélo-monocyttaire	LAM 4	inv16 + trisomie 22	Pas d'anomalie	Favorable
21	F	76	95	67	2,3	0,14	1	23	LAM post SMD	LAM 2	monosomie 7	WT1	Défavorable
22	M	63	96	20	2,2	0,45	14	21	LAM post SMP	LAM 2	échec caryo	Pas d'anomalie	ND

Tableau 16 : (suite) Caractéristiques générales de la population

Patient	sexe	Age au diagnostic	Hémoglobine (g/L) au diagnostic	Plaquettes (G/L) au diagnostic	GB (G/L) au diagnostic	PNN (G/L) au diagnostic	% de blastes circulants au diagnostic	% de blastes médullaires au diagnostic	OMS	Classification FAB	Anomalies cytotypiques au diagnostic	Anomalies moléculaires au diagnostic	Risque pronostic
23	M	64	74	38	18	13	5	20	LAM post SMD	LAM 2	del12p et del17p	EVI1, WT1	Défavorable
24	F	75	72	268	3,6	1,7	11	30	LAM post chimio	LAM 2	del 5q, del 7q, del 17p et del 12	Pas d'anomalie	Défavorable
25	M	78	100	106	2,4	0,63	<1	25	NOS : LAM avec maturation	LAM 2	normal	ASXL1, EZH2, IDH1, SF3B1, TP53	Défavorable
26	M	28	100	57	16	2,9	61	75	LAM avec inv(16)	LAM 4 eosino	inv16	CBFB-MYH11 WT1, NRAS	Favorable
27	F	66	75	311	32	6,4	49	73	LAM post SMP	LAM 2	normal	WT1, IDH2, CALR	Intermédiaire
28	M	34	86	1359	54	20	21	18	LAM post SMP	LAM 2	t(9;22)	M-bcr, EVI1, TET2, WT1	Défavorable
29	M	62	96	111	89	0,89	97	95	NPM1 muté	LAM 1	normal	WT1, NPM1	Favorable
30	M	85	104	13	0,2	<0,2	N	85	NOS : LAM sans maturation	LAM 1	normal	WT1, IDH1	Intermédiaire
31	F	69	95	46	2,4	1,5	0	23	LAM post SMD	LAM 2	normal	ASXL1, BCOR, IDH2, STAG2, TET2	Défavorable
32	F	47	115	121	6	2,9	28	85	NOS : LA monoblastique / monocyttaire	LAM 5	t(11;19)	BCOR, FLT3-TKD, NRAS	Intermédiaire
33	M	19	115	188	48	11	58	85	NOS : LA monoblastique / monocyttaire	LAM 5	normal	NUP98-NSD1, FLT3-ITD, WT1	Défavorable
34	F	64	82	256	3,1	1,5	0	20	LAM post SMD	LAM 2	normal	ASXL1, SETBP1, SRSF2, STAG2	Défavorable
35	M	44	100	51	4	1,5	27	42	NOS : LA monoblastique / monocyttaire	LAM 5	normal	CEBPA, ASXL1, KRAS, NRAS, WT1	Défavorable
36	F	37	82	95	1,6	0,6	6	40	LAM post SMD	LAM 2	t(11;20)	NUP98-TOPI1, EVI1, WT1	Intermédiaire
37	F	41	87	512	18	11	14	20	NPM1 muté	LAM 2	normal	NPM1, WT1, DNMT3A	Favorable
38	M	68	51	20	10	0,9	74	66	LAM post SMD	LAM 2	normal	IDH1, ASXL1, RUNX1, SRSF2, STAG2, SR2, WT1	Défavorable
39	M	69	88	24	9	3,8	13	17	LAM post SMD	LAM 2	t21 et t8	ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, TET2	Défavorable
40	F	24	39	24	5	0,5	60	68	LAM avec t(8;21)	LAM 2	t(8;21)	AML1-ETO	Favorable
41	M	42	80	57	39	0,39	89	77	LAM avec inv(16)	LAM 4 eosino	inv16 + t21	CBFB-MYH11 WT1, CBL, NRAS	Favorable
Médiane		63	88	61	7,6	1,1	27	57					
Range		19-87	39-115	6-1359	0,2-113	<0,2-20	<1-97	18-99					

Les 41 patients de notre étude étaient âgés de 19 à 87 ans avec un âge médian au diagnostic de 63 ans. Vingt-sept patients étaient des hommes soit 66% de notre cohorte et 14 étaient des femmes soit 34% (**Tableau 16**).

Au diagnostic, tous les patients ont montré au moins une cytopénie. La plus fréquente était l'anémie, présente chez tous les patients de notre cohorte. Sept patients étaient hyperleucocytaires au diagnostic (leucocytes > 50G/L). Quatre-vingt-dix pourcents des patients possédaient des blastes circulants avec une médiane à 27%. Les myélogrammes présentaient une blastose médullaire médiane à 57%.

Selon la classification OMS 2016, 9 patients ont présenté une LAM secondaire à un SMD, 4 une LAM secondaire à un SMP et 1 patient avait une LAM secondaire à une chimiothérapie. Quatorze patients avaient des anomalies cytogénétiques récurrentes dont 5 inversions du 16, 1 translocation (8;21), 1 translocation (9;11), 6 mutations NPM1 et 1 mutation RUNX1. Quatorze patients appartenaient au groupe NOS (sans autre spécification). Pour ces derniers, selon la classification FAB, on distinguait 2 LAM1, 6 LAM2, 1 LAM4 et 5 LAM5.

L'analyse caryotypique au diagnostic a révélé que 5 patients avaient un caryotype complexe. Hors caryotype complexe, les principales anomalies caryotypiques retrouvées étaient l'inversion du chromosome 16 (n=4), la trisomie 8 (n=2), une délétion sur le chromosome 12 (n=2) et le chromosome 7 (n=2) ainsi que certaines translocations telles que la t(8;21) et t(9;22). Seize patients présentaient un caryotype normal mais l'analyse en biologie moléculaire permettait d'observer des anomalies telles que les mutations NPM1, ASXL1, IDH, FLT3 et la surexpression du gène WT1. Vingt-sept pourcents des patients présentaient un pronostic favorable au diagnostic alors que 46% présentaient un pronostic défavorable.

B. Description de l'analyse immunophénotypique

1. Stratégie LAIP au diagnostic

Sur les 41 patients pour qui les tubes de maladie résiduelle ont été effectués, seuls les patients ayant un contingent de blastes myéloïdes (n=35) ont été analysés pour la recherche de marqueurs LAIP. L'analyse immunophénotypique des blastes myéloïdes a montré que 97% (34/35) des patients pouvaient être suivis par cytométrie en flux. Pour un seul patient (numéro 31), aucun phénotype aberrant n'a été observé sur le tube 1 (sensibilité sur moelle normale insuffisante à 0,12%). L'analyse du tube LAIP des 34 autres patients permettait d'observer des aberrations phénotypiques avec une sensibilité variant de <0,01 à 0,1% (**Tableau 17**).

Tableau 17 : Caractérisation des LAIP au diagnostic par CMF pour chaque patient

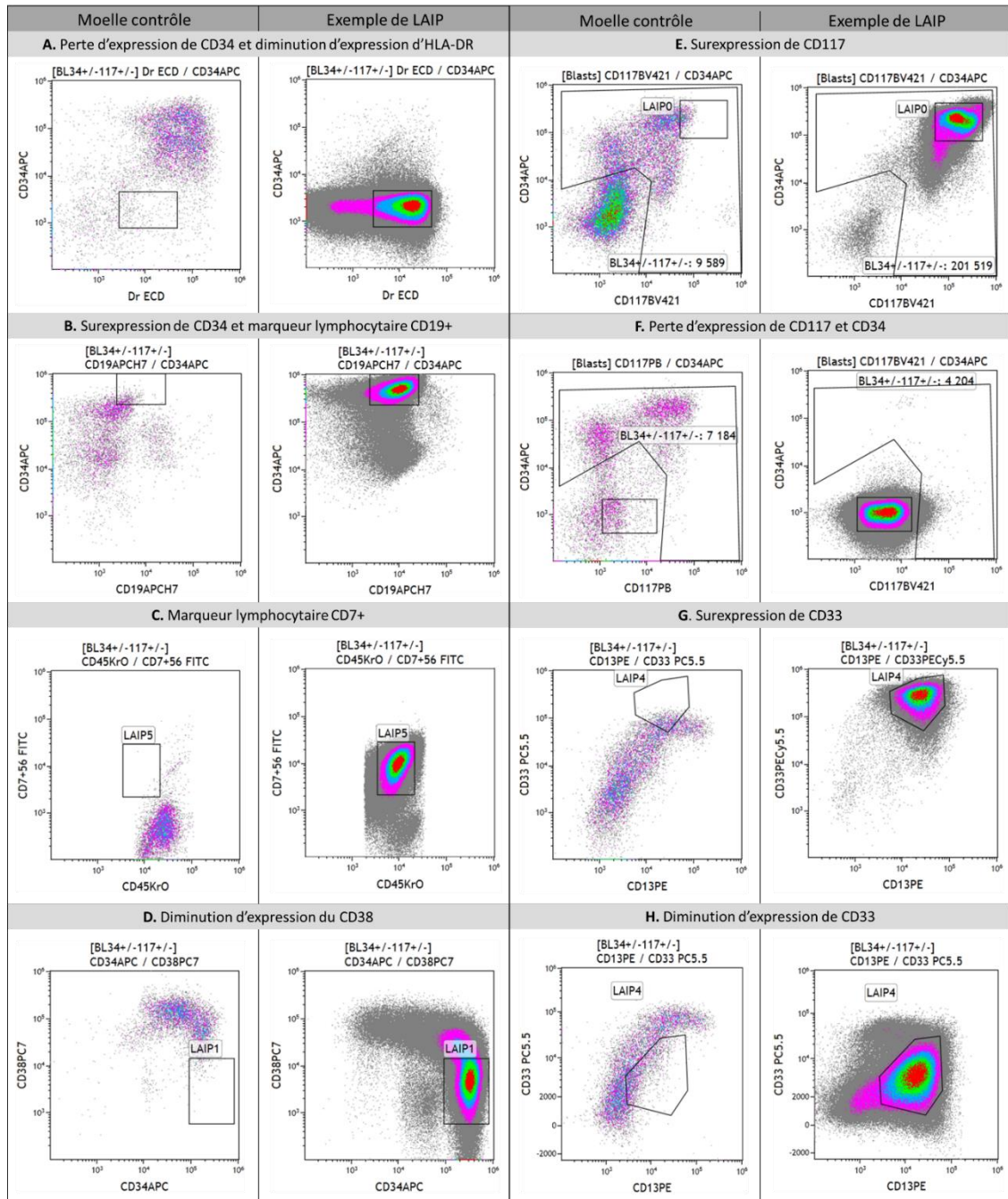
Patients	LAIP au diagnostic	% MRD LAIP sur MO normale	Patients	LAIP au diagnostic	% MRD LAIP sur MO normale
1	CD117 ^{High}	0,03	22	CD34+ (60%) CD7 ^{low}	0,03
2	CD7+	<0,01	23	CD38 ^{low} CD33 ^{low}	0,09
3	CD34 ^{High}	0,02	24	CD33 ^{low}	0,03
4	CD34 ^{High} CD38 ^{low} CD7+ CD56+	<0,01	25	CD13 ^{low}	0,01
5	CD33 ^{low} CD7 ^{low}	<0,01	26	CD34 ^{low}	0,05
6	CD34- CD117 ^{low} CD13 ^{low} CD33 ^{low} CD56+ (30%)	<0,01	27	CD38 ^{low} CD33 ^{low}	0,08
9	CD33 ^{low} CD7+	<0,01	28	CD117 bimodal (50% neg)	<0,01
10	CD34- CD7+ (50%) HLA-DR ^{low}	<0,01	29	CD34- CD117 ^{low} CD13 ^{low}	<0,01
12	CD34- CD13 ^{low} CD56+(50%) HLA-DR-	<0,01	30	CD34 ^{High} CD13 ^{High} CD33+ (70%)	<0,01
13	HLA-DR ^{low}	0,01	31	pas de LAIP	0,12
14	CD34 bimodal (65%neg)	0,01	34	CD33 ^{High} CD13 bimodal (25%High)	0,02
15	CD38 ^{low} CD33 ^{low} CD56+ (30%)	<0,01	36	CD34 ^{low} CD38 ^{low} CD33 ^{low}	0,1
16	CD38 ^{low} CD33 ^{low}	0,04	37	CD34-	<0,01
17	CD38 ^{low} (50%) CD13 ^{low}	<0,01	38	CD34 ^{low} CD38 ^{low} CD33 ^{low} CD7+	0,02
18	CD34-	<0,01	39	CD34 ^{High} CD38 ^{low} CD33 ^{low} CD7+ (50%)	<0,01
19	CD38 ^{low} (60%)	<0,01	40	CD34 ^{High} CD13 ^{low} CD19 ^{low}	<0,01
20	CD33 ^{High}	0,02	41	HLA-DR ^{low}	0,04
21	CD33 ^{low} (65%)	0,08			

Parmi les phénotypes aberrants identifiés chez nos patients au diagnostic, nous observons le plus fréquemment : une surexpression de CD34 (CD34^{high}) chez 5 patients, une diminution d'expression du CD33 (n=11) et/ou du CD38 (n=9) et/ou du CD34 (n=9) et la présence de marqueur d'infidélité de lignée comme le CD7 observé chez 8 patients. (**Tableau 18 et Figure 16**).

Tableau 18 : Différents LAIP identifiés sur le tube 1 dans notre population

	Surexpression	Perte d'expression	Infidélités de lignée
CD34	5	9	/
CD117	1	3	/
CD38	0	9	/
CD33	2	11	/
CD13	2	6	/
HLA-DR	0	4	/
CD7	/	/	8
CD56	/	/	4
CD19	/	/	1
Total	10	42	13

Figure 16: Exemples de graphes obtenus par cytométrie en flux représentant les LAIP observés chez le patient 10 (A), le patient 40 (B), le patient 38 (C), le patient 23 (D), le patient 1 (E), le patient 6 (F), le patient 34 (G) et le patient 24 (H).



2. Stratégie CSL au diagnostic

La présence de cellules souches leucémiques a été déterminée au diagnostic dans les prélèvements médullaires de l'ensemble des patients de la cohorte (n=41, incluant les LA monoblastiques). Cette recherche a été effectuée sur le tube 2 de maladie résiduelle (tube CSL). Le pourcentage de cellules souches leucémiques est exprimé par rapport aux blasts myéloïdes totaux. Les taux de CSL au diagnostic étaient variables allant de <0,01% à 52% avec une médiane à 1% (**Tableau 19**). Dix-neuf patients présentaient des CSL élevées >1% ; ces patients

avaient un âge médian au diagnostic de 66 ans et 53% d'entre eux avaient un pronostic défavorable. Les 22 patients avec des CSL<1% au diagnostic avaient quant à eux un âge médian au diagnostic de 53 ans et 41% présentaient un pronostic défavorable.

Tableau 19 : Quantification des cellules souches leucémiques au diagnostic évaluée par CMF pour chaque patient

Patients	% CSL au diagnostic	Patients	% CSL au diagnostic	Patients	% CSL au diagnostic
1	0,11	15	35	29	0,06
2	0,02	16	52	30	0,22
3	5	17	25	31	2,5
4	38	18	<0,01	32	0,1
5	0,1	19	40	33	<0,01
6	<0,01	20	1	34	<0,01
7	0,1	21	0,07	35	0,02
8	0,1	22	2,6	36	0,4
9	3,5	23	13	37	0,1
10	<0,01	24	5,5	38	51
11	0,1	25	0,1	39	6
12	0,03	26	3	40	0,25
13	1,7	27	5,8	41	1,2
14	0,05	28	2		

3. Etude des LAIP à la rechute

Le suivi des maladies résiduelles par CMF, grâce à l'approche LAIP, permet d'apprécier la réponse au traitement par la décroissance de la quantité de blastes en post induction (MRD 1) et en post consolidation (MRD 2) (**Figure 17**). Ce suivi permet également de détecter précocement les rechutes. Parmi les 35 patients analysés, 15 patients ont rechuté soit 43%, 15 patients sont toujours en rémission complète, 1 patient a été perdu de vue et 4 patients n'ont jamais été en rémission complète. De plus, 10 patients sont décédés.

Parmi les 15 patients ayant rechutés, le phénotype à la rechute n'était pas disponible pour trois d'entre eux en raison d'un diagnostic de rechute sur prélèvement sanguin (pas de myélogramme réalisé), d'un prélèvement médullaire trop pauvre (pas de cytométrie en flux réalisée) ou d'un suivi dans un autre centre (**Tableau 20**). Neuf patients avaient un phénotype

blastique identique à celui du diagnostic ou présentant des LAIP supplémentaires (exemple du patient 4, **Figure 18**). Trois patients ont développé des modifications majeures du phénotype blastique à la rechute pouvant entraîner des difficultés pour le suivi de la maladie résiduelle des patients, notamment la perte totale de LAIP (exemple du patient 29, **Figure 19**).

Les cellules blastiques du patient 10 ont perdu l'expression aberrante du CD7 mais conserve 2 LAIP importants le CD34- et HLA-DR- ce qui n'a pas impacté le suivi immunophénotypique, la sensibilité sur moelle normale à la rechute était <0,01%.

Le patient 18 a montré, lors de la rechute, une expression du CD34 sur 60% de ses cellules blastiques avec apparition d'un nouveau LAIP CD33 faible. La sensibilité sur MO normale était alors de 0,08% donc proche du seuil acceptable de 0,1%. Suite à cette rechute, son suivi par cytométrie en flux n'a pas été impacté puisqu'il a été observé une ré-augmentation du clone CD34- représentant 80% des cellules blastiques et donc une bonne sensibilité sur MO normale.

Les blastes du patient 20 ont perdu la surexpression du CD33 lors de la rechute avec une sensibilité sur moelle normale de 0,01%.

Les cellules blastiques du patient 25, lors de la rechute, ont perdu la négativité du CD13 à la surface de ses blastes, seul LAIP identifié au diagnostic. La sensibilité sur moelle normale passait alors de 0,01% à 0,1% compliquant ainsi le suivi de la MRD par cytométrie en flux. Ce patient est d'autre part décédé de la COVID-19 un mois après sa rechute.

Les blastes du patient 29, lors de la rechute, réexprimaient le CD13 et le CD117 contrairement au diagnostic, tout en conservant la perte du CD34. Ces modifications ont été délétères lors de son suivi. La détection précoce de la rechute a échoué par cytométrie en flux contrairement à la biologie moléculaire.

Figure 17 : Suivi de la MRD par CMF afin d'évaluer la réponse au traitement : exemple du patient 28. Le cadre rouge représente la population blastique CD117^{low}

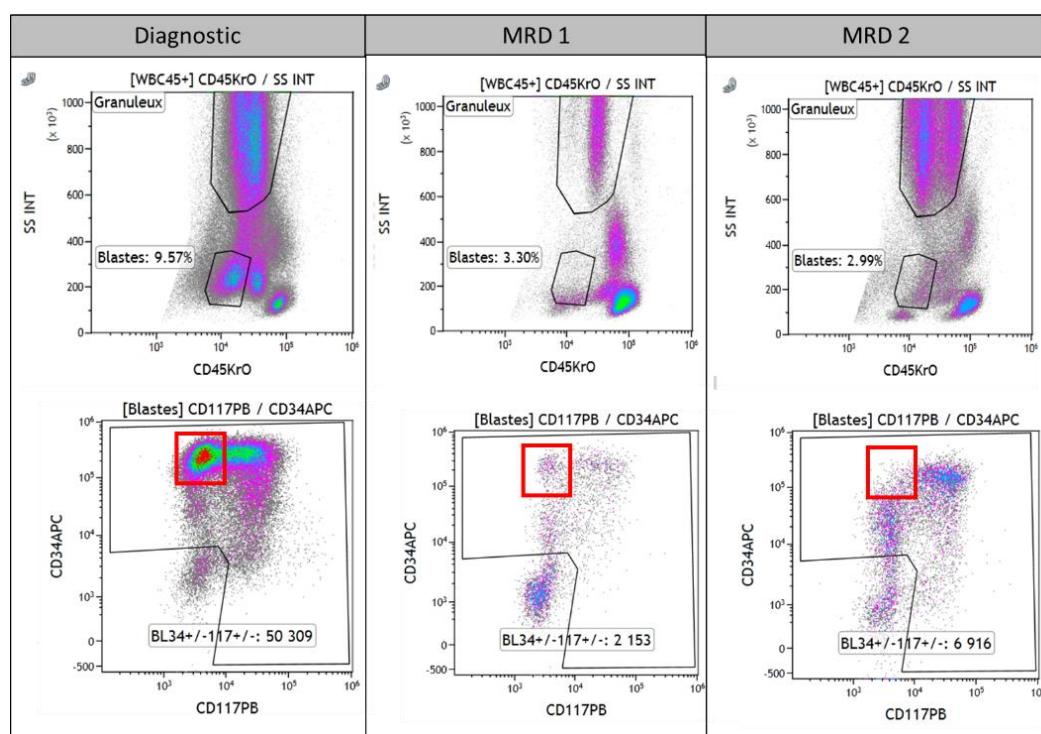


Tableau 2017 : Comparaison des LAIP au diagnostic et à la rechute ainsi que leur sensibilité sur MO normale. (ND = Données non disponibles)

Patients	LAIP au diagnostic	% MRD LAIP du diagnostic sur MO normale	LAIP à la rechute	% MRD LAIP à la rechute sur MO normale
1	CD117 ^{High}	0,03	ND	ND
3	CD34 ^{High}	0,02	Identique	0,06
4	CD34 ^{High} CD38 ^{low} CD7+ CD56+	<0,01	Identique	<0,01
9	CD33 ^{low} CD7+	<0,01	Identique	<0,01
10	CD34- CD7+ (50%) HLA-Dr ^{low}	<0,01	CD7- HLA-DR-	<0,01
13	HLA-Dr ^{low}	0,01	Identique	0,02
18	CD34-	<0,01	CD34+ (60%) CD33 ^{low}	0,04
20	CD33 ^{High}	<0,01	CD33+ CD34 ^{High} CD38 ^{low}	0,01
22	CD34+ (60%) CD7 ^{low}	0,03	ND	ND
24	CD33 ^{low}	0,03	ND	ND
25	CD13 ^{low}	0,01	CD13+	0,1
29	CD34- CD117 ^{low} CD13 ^{low}	<0,01	CD117+ CD13+	<0,01
34	CD33 ^{High} CD13 bimodal (25%High)	0,02	Identique	0,02
39	CD34 ^{High} CD38 ^{low} CD33 ^{low} CD7+ (50%)	<0,01	Identique	<0,01
41	HLA-DR ^{low}	0,04	CD13 ^{low}	0,01

Figure 18 : Graphes obtenus par cytométrie en flux montrant le phénotype des rechutes sans modification de LAIP, exemple du patient 4.

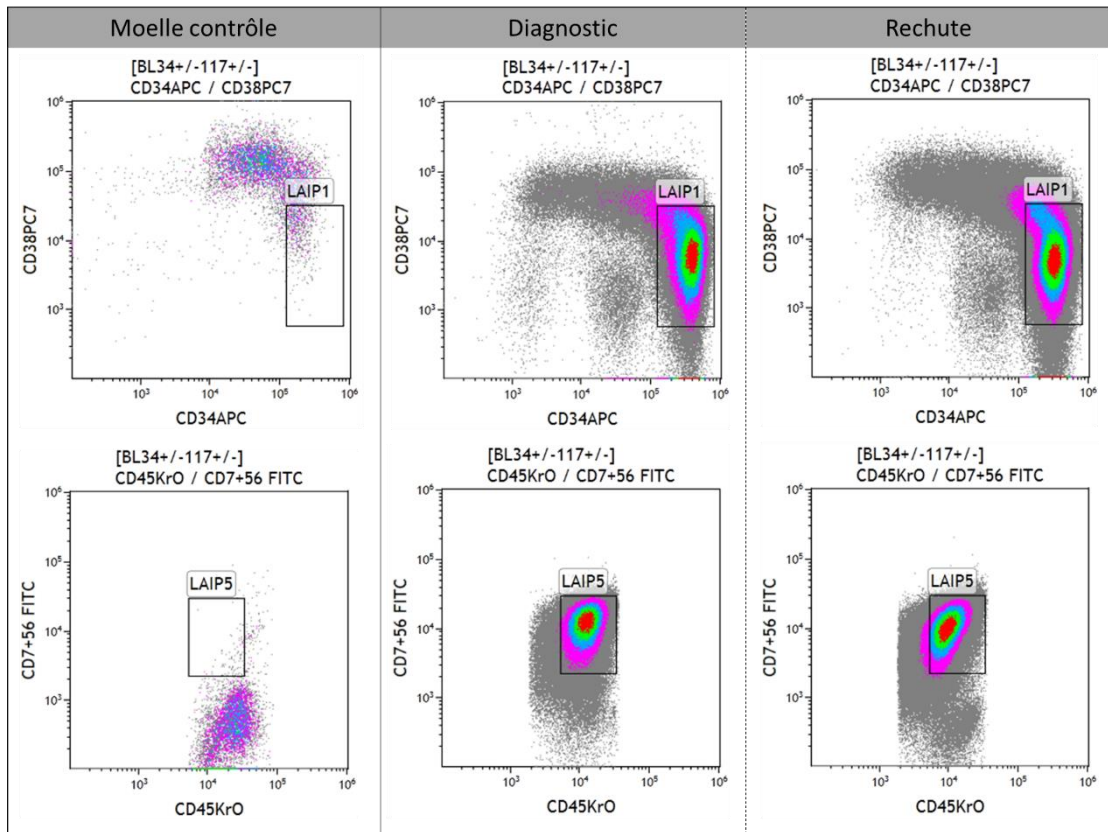
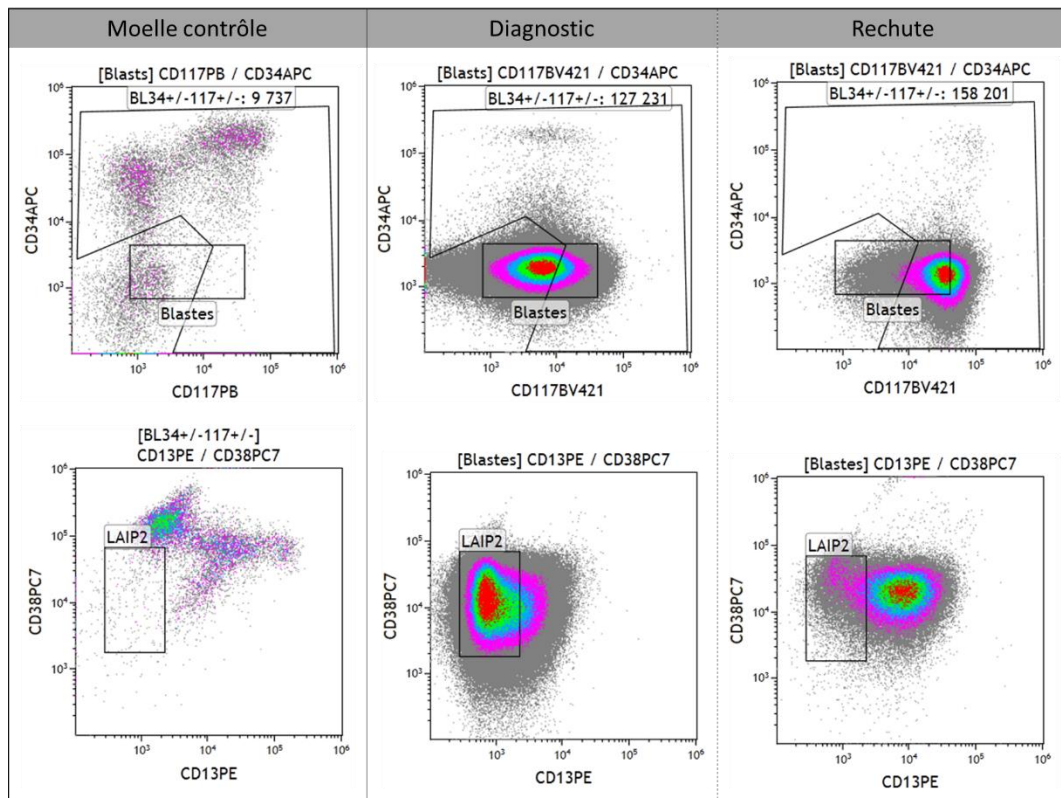


Figure 19: Graphes obtenus par cytométrie en flux montrant le phénotype des rechutes avec modification de LAIP, exemple du patient 29

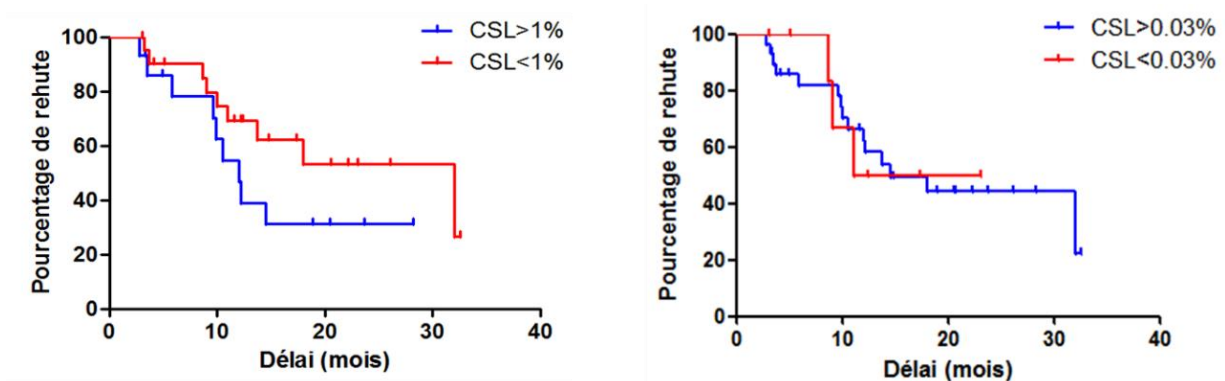


4. Impact des CSL sur la rechute

Quatre patients n'ont jamais été en rémission cytologique et présentaient tous des CSL>1% au diagnostic. Parmi les 37 patients en rémission complète, 15 avaient des CSL>1% au diagnostic. Parmi ceux-ci, 9 ont rechuté soit 60%. Vingt-deux patients avaient des CSL<1% au diagnostic et comptaient 9 rechutes soit 40% des patients (**Tableau 21**). Parmi les 18 patients ayant rechuté 50% avaient des CSL>1%. Parmi eux, un pronostic défavorable était observé dans 50% des cas ainsi qu'un âge médian au diagnostic plus élevé (64 ans) en comparaison des patients n'ayant pas rechuté (42% et 53 ans respectivement).

Une analyse de survie sans rechute en fonction de 2 seuils de CSL différents décrits dans la littérature a été réalisée et ne montre pas de différence significative entre les deux groupes ($p=0,17$ pour un seuil à 1% et $p=0,96$ pour un seuil à 0,03%). Il semblerait néanmoins que les patients avec des CSL>1% aient tendance à rechuter plus fréquemment et plus rapidement que ceux présentant moins de 1% de CSL (**Figure 20**).

Figure 20 : Courbe de survie sans rechute en fonction du pourcentage de CSL, seuil à 1% à gauche ($p=0,17$) et à 0,03% à droite ($p=0,96$) selon la méthode de Kaplan-Meier.



Le taux de CSL paraît être relativement stable entre le diagnostic et la rechute excepté pour le patient 20 dont le taux passe de 1 à 30% (**Tableau 21**).

Tableau 21 : Pourcentage des cellules souches leucémiques évalué par CMF au diagnostic et à la rechute par patient

Patient	% CSL au diagnostic	% CSL à la rechute	Délai entre le diagnostic et la rechute (mois)
1	0,11	ND	13,7
3	5	8	9,6
4	38	32	3,5
8	0,1	0,01	3,7
9	3,5	3	12
10	<0,01	0,09	8,7
11	0,1	<0,01	10
13	1,7	2	10,5
18	<0,01	0,5	9
20	1	30	14,5
22	2,6	ND	5,8
24	5,5	ND	12,2
25	0,1	0,1	32
29	0,06	<0,01	18
32	0,1	0,07	3,2
34	<0,01	<0,01	11
39	6	6	2,8
41	1,2	0,8	9,9

C. Description des résultats de biologie moléculaire

Parmi les patients analysés, les résultats de biologie moléculaire étaient disponibles pour 38 d'entre eux. Onze patients présentaient une anomalie moléculaire pouvant être suivi par biologie moléculaire soit 29% des patients. En tenant compte de la surexpression du gène WT1 ce chiffre passe à 71% des patients. Treize pourcents des patients présentaient une mutation NPM1, 11% un transcrite de fusion CBFM-MYH11, 2% un transcrite de fusion RUNX1-RUNX1T1 et 2% un transcrite de fusion M-bcr (**Tableau 22**).

Tableau 22 : Description des anomalies moléculaires utiles au suivi déterminées au diagnostic pour chaque patients (ND : données non disponibles, Abs : absence de marqueurs utiles au suivi identifiés)

Patients	Anomalies moléculaires utiles au suivi	Patients	Anomalies moléculaires utiles au suivi	Patients	Anomalies moléculaires utiles au suivi
1	WT1 : 90%	15	WT1 : 79,8%	29	ND
2	Abs	16	ND	30	WT1 23%
3	Abs	17	WT1 19%	31	Abs
4	WT1 : 142%	18	ND	32	Abs
5	WT1 : 153% CBFB MYH11 : 92,6%	19	WT1 : 129%	33	WT1 : 14%
6	WT1 : 133% NPM1 : 1782%	20	Abs	34	Abs
7	WT1 : 11,5%	21	WT1 : 1,95%	35	WT1 : 95,3%
8	Abs	22	Abs	36	WT1 : 53,8%
9	WT1 : 32%	23	WT1 : 5%	37	NPM1 : 1568% WT1 : 57%
10	WT1 : 153% NPM1 : 1629%	24	Abs	38	WT1 : 91%
11	WT1 : 8,1%	25	Abs	39	Abs
12	WT1 : 233% NPM1 : 474%	26	CBFB-MYH11 : 107% WT1 : 117%	40	AML1-ETO : 173%
13	WT1 : 61,8% CBFB MYH11 : 144%	27	WT1 : 29%	41	CBFB-MYH11 : 96,4% WT1 : 56,4%
14	WT1 : 48% NPM1 : 1474%	28	M-bcr : 67,9% WT1 : 30%		

D. CMF versus biologie moléculaire

Seize patients ont eu au moins un point de suivi hors diagnostic analysé à la fois par cytométrie en flux et biologie moléculaire ce qui représente 42 prélèvements médullaires au total. Les résultats des 42 maladies résiduelles ont été comparés entre ces 2 méthodes (**Tableau 23**). Elles étaient constituées de 9 prélèvements post-induction, 9 post-consolidation 1, 7 post-consolidation 2, 2 post-consolidation 3, 15 prélèvements de fin de traitement ou post rechute. Une maladie résiduelle est considérée comme positive en cytométrie en flux dès lors qu'elle est détectable, c'est-à-dire supérieure à 0,1%. En biologie moléculaire, le seuil de positivité dépend du marqueur ; pour les mutations, le seuil est à 0,01% alors que pour les transcrits de fusion il est à 0,001%. Pour ce qui est de la surexpression du gène WT1, le seuil de positivité est de 2% dans la moelle osseuse et 0,1% dans le sang périphérique (43).

Tableau 23 : Synthèse des résultats de maladie résiduelle obtenus par cytométrie en flux et par biologie moléculaire des patients de notre cohorte.

	BM positive	BM inférieur au seuil de détection	Total
CMF positive	10	1	11
CMF inférieur au seuil de significativité	12	19	31
Total	22	20	42

Vingt-neuf résultats sont concordants et 13 sont discordants. Une seule MRD est positive en cytométrie en flux et non détectable en biologie moléculaire. Douze MRD sont positives en biologie moléculaires et non détectables en cytométrie en flux. Les résultats discordants sont détaillés dans le **Tableau 24**.

Tableau 24 : Description des résultats discordants de maladie résiduelle obtenus par cytométrie en flux comparativement à la biologie moléculaire par patient.

Patient	Point de suivi	LAIP au diagnostic	Résultats CMF avant relecture	Résultats CMF après relecture	Résultats BM	Suivi
36	MRD1 Post induction	CD34 ^{low} CD38 ^{low} CD33 ^{low}	Positif 0,5%	Positif 0,5%	Négatif WT1 : 0,38%	Perdu de vue
Patient	Point de suivi	LAIP au diagnostic	Résultats CMF avant relecture	Résultats CMF après relecture	Résultats BM	Suivi
5	MRD1 Post induction	CD33f CD7f	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif CBFB MYH11 : 0,038%	RC
6	MRD1 Post induction	CD34- CD117f CD13f CD33f CD56+ (30%)	Négatif <0,3%	Positif 0,3%	Positif NPM1 : 16,5%	RC
6	MRD2 Post conso 1	CD34- CD117f CD13f CD33f CD56+ (30%)	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif NPM1 : 0,08%	RC
10	Post rechute	CD34- HLA-DR-	Négatif <0,1%	Négatif <0,1%	Positif NPM1 : 0,02	Rechute
28	MRD2 Post conso 1	CD117 bimodal (50% neg)	Négatif <0,1%	Négatif <0,1%	Positif M-bcr : 0,13%	RC
29	MRD3 Post conso 2	CD34- CD117f CD13f	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif NPM1 : 0,5%	Rechute
29	Post traitement 1 ^{ère} ligne	CD34- CD117f CD13f	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif NPM1 : 0,05%	Rechute
29	Post traitement 1 ^{ère} ligne	CD34- CD117f CD13f	Négatif <0,5%	Positif 1%	Positif NPM1 : 152%	Rechute
37	MRD1 Post induction	CD34-	Négatif <0,1%	Négatif <0,1%	Positif NPM1 : 0,149%	RC
37	MRD4 Post conso 3	CD34-	Négatif <0,1%	Négatif <0,1%	Positif NPM1 : 0,013%	RC
41	Post rechute	HLA-DRf	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif CBFB MYH11 : 0,016%	Rechute
41	Post rechute	HLA-DRf	Négatif <0,5%	Négatif <0,5%	Positif CBFB MYH11 : 5,86%	Rechute

La relecture des analyses de CMF a permis de modifier 2 résultats. Le patient 6 avait un prélèvement en post induction finalement positif à 0,3%, proche du seuil de sensibilité, ce qui devenait concordant avec la biologie moléculaire. Le 2^{ème} point de suivi post traitement de première ligne du patient 29 est positif à 1%. La modification des LAIP de ce patient (**Figure 21**) en cours de traitement est à l'origine du premier résultat erroné. La relecture des données est en accord avec la biologie moléculaire contrairement aux autres points de ce patient.

L'évolution des maladies résiduelles par cytométrie en flux et par biologie moléculaire chez les patients présentant des discordances est reportée dans la **Figure 22**.

Figure 21: Modifications de l'immunophénotype blastique à la rechute entraînant une erreur de rendu des résultats de MRD par CMF, exemple du patient 29.

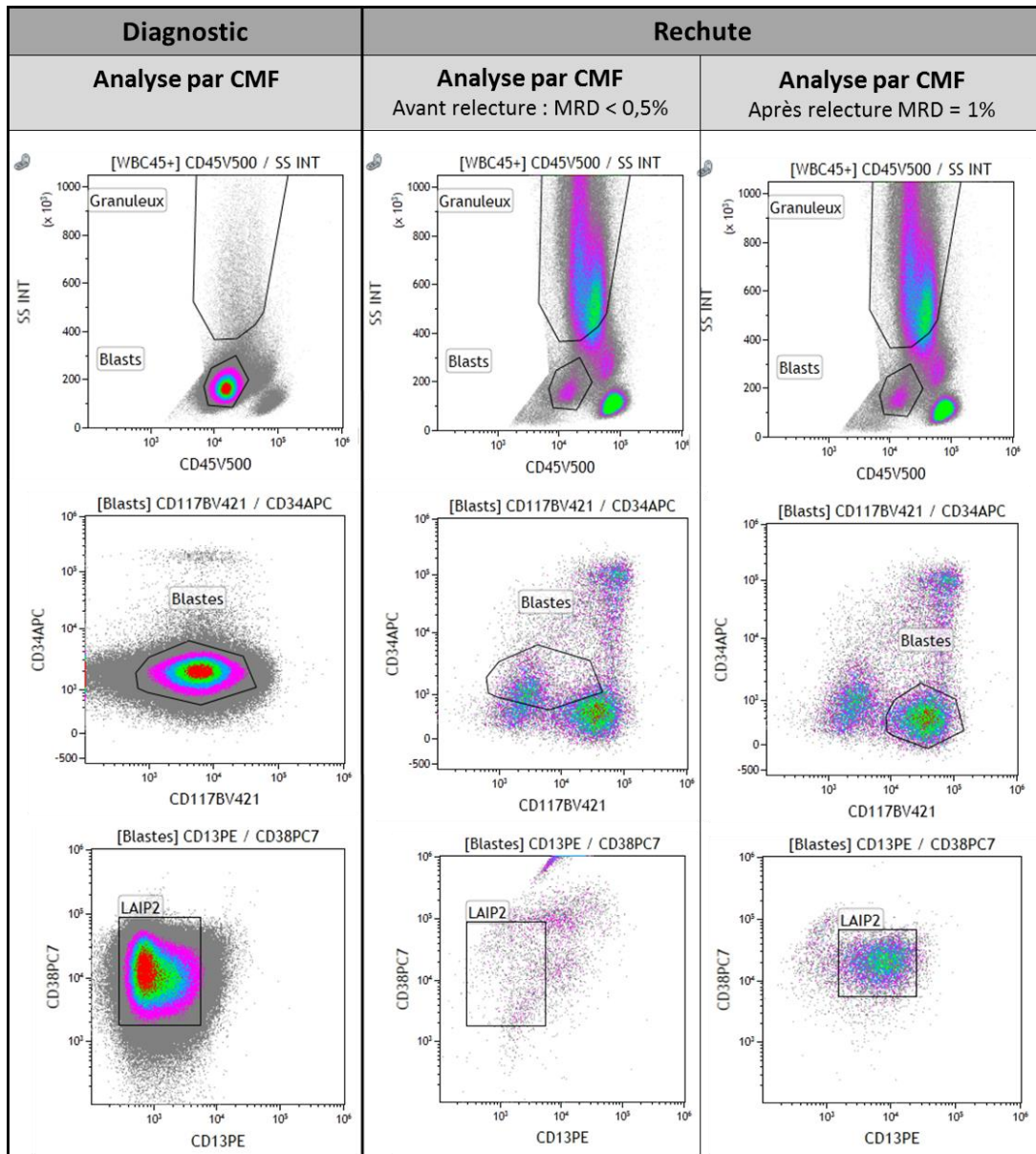
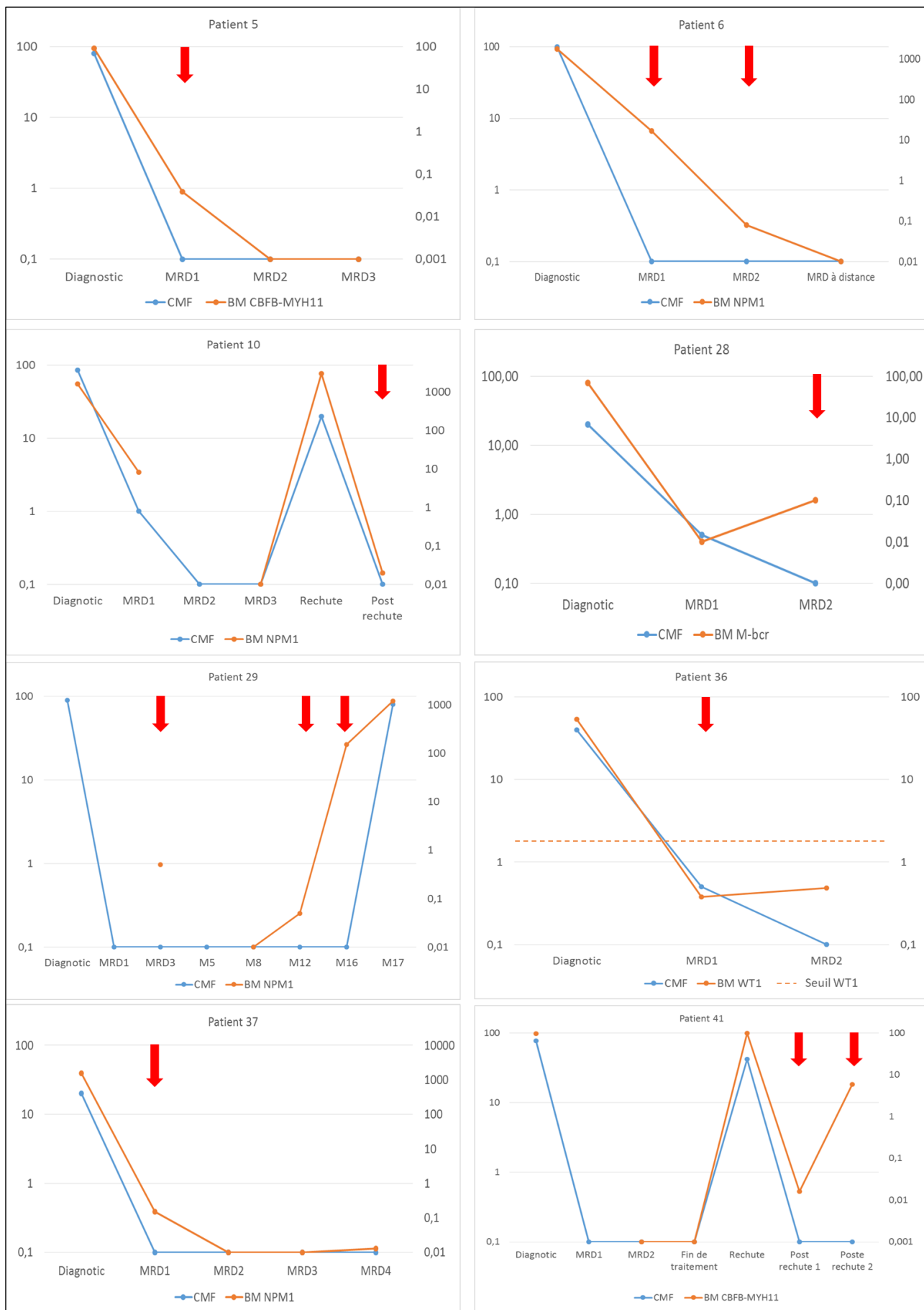


Figure 22: Evolution des maladies résiduelles obtenues par cytométrie en flux (CMF) et biologie moléculaire (BM) chez les patients présentant des discordances (indiquées par les flèches rouges) aux différents points de prélèvements notamment en post induction (MRD1), post consolidation 1 (MRD2), post consolidation 2 (MRD3).



Le patient 5 est discordant sur le point MRD1. Il est faiblement positif en biologie moléculaire (CBFB-MYH11 = 0,038%) et non détectable en CMF, inférieur au seuil de sensibilité. Les points suivants sont bien concordants, avec une cinétique de décroissance concomitante à l'instauration du traitement et le patient est aujourd'hui en RC.

Le patient 6 est discordant sur 2 points. Les prélèvements MRD1 et MRD2 sont non détectables en CMF et positifs en biologie moléculaire (NPM1 = 16,5% et 0,08% respectivement). Les points suivants sont concordants, avec une même cinétique de décroissance et le patient est aujourd'hui en RC.

Pour le patient 10, les points en post induction et post consolidation sont bien concordants ainsi que ceux de la rechute. Cependant, le prélèvement après la mise en place du traitement de rechute est discordant. La biologie moléculaire est discrètement positive (NPM1=0,02%) alors que l'analyse par CMF inférieure au seuil de détection. Ce patient a été allogreffé et il est aujourd'hui en RC.

Le patient 28 présente une ré-ascension de la biologie moléculaire en MRD2 (M-bcr = 0,13%) non retrouvée par cytométrie en flux. Malheureusement, le patient a été perdu de vue ce qui nous empêche de connaître l'évolution de sa maladie.

Le patient 29 est discordant sur le point MRD3, positif en biologie moléculaire (NPM1=0,5%) et inférieur au seuil de sensibilité en cytométrie en flux. Malheureusement les points au diagnostic et en post induction n'ont pas été réalisés en biologie moléculaire ce qui ne permet pas d'en apprécier la cinétique. Deux autres points sont discordants, ceux avant la rechute à 12 et 16 mois post diagnostic. La biologie moléculaire était positive (NPM1 = 0,05% et 152% respectivement) alors que la CMF était indétectable. La ré-analyse en CMF montre bien un résultat positif à M16. En effet, les modifications de LAIP chez ce patient ont empêché de détecter précocement la rechute contrairement à la biologie moléculaire.

Le patient 36 présentait une MRD1 post induction faiblement positive à 0,5% en CMF et négative en biologie moléculaire (par le marqueur WT1).

Le patient 37 présente un point discordant en post induction. La MRD par CMF est indétectable alors que la biologie moléculaire est discrètement positive (NPM1 = 0,15%). Les points précédents et suivants sont bien concordants ainsi que la cinétique de décroissance.

Le patient 41 possède 2 points discordants à la suite d'une rechute avec une biologie moléculaire positive (CBFB-MYH11 = 0,016% et 5,86%). La ré-analyse des données de CMF

a donné les mêmes résultats négatifs. Le dernier point est très récent et ne permet pas de conclure à une bonne ou mauvaise réponse au traitement. Le patient 41 est aujourd'hui en attente d'allogreffe.

V. Discussion

Notre étude vise à évaluer l'applicabilité de l'analyse de la MRD des patients atteints de LAM à l'AP-HM par cytométrie en flux à travers deux approches, LAIP/DfN et CSL et à comparer ces résultats à ceux obtenus par technique de biologie moléculaire.

Les caractéristiques de la population étudiée sont comparables à celles décrites dans différentes études publiées (5,38,44–46). En effet, l'âge médian au diagnostic de notre population est de 63 ans, comme dans certaines études allant de 53 à 69 ans. Conformément aux autres études, des cytopénies étaient observées au diagnostic (hémoglobine médiane à 88g/L et taux de plaquette médian à 61G/L) ainsi qu'une blastose médullaire de 46%. La majorité des patients de notre étude présentaient un risque défavorable (46% des patients) alors que d'autres études rapportent une majorité de risque intermédiaire. Ceci peut s'expliquer notamment par l'utilisation de critères de classification différents ou par une différence de population étudiée (uniquement les adultes jeunes dans certaines études). Le taux de rechute observée dans notre étude est de 43% avec un suivi médian de 20 mois. Dans la cohorte de Freeman et al. ce taux à 20 mois allait de 55% pour les patients avec une MRD négative à 75% pour ceux avec une MRD positive (19).

Dans les LAM de l'adulte, une faible clairance des cellules blastiques pendant le traitement d'induction/consolidation évaluée par microscopie optique sur moelle osseuse est associée à une survie moindre (1,7). Une rémission complète hématologique (blastes médullaires < 5%) peut cependant représenter une masse tumorale encore importante pouvant aller jusqu'à 10^9 cellules leucémiques (18). Des techniques de maladie résiduelle, beaucoup plus spécifiques et sensibles pour évaluer la réponse aux traitements, ont été développées et permettent d'identifier des groupes de patients selon le risque de rechute. Les premières études publiées dans les années 90 ont montré que les techniques de PCR pouvaient prédire le risque de rechute (47–49) ; l'évaluation de la MRD par cette technique est ainsi indispensable dans la prise en charge des patients. La MRD par cytométrie en flux présente quant à elle les avantages d'être applicable à un grand nombre de patient (>90%) quel que soit l'âge et d'être une technique rapide, malgré sa sensibilité moindre. Cependant l'analyse des résultats nécessite des opérateurs expérimentés et l'harmonisation des pratiques en France reste difficile. Des groupes de travail tentent d'élaborer des panels d'anticorps applicables aux différents laboratoires. Le panel d'anticorps utilisé dans notre étude est celui du groupe ALFA-FILO et s'appuie sur les recommandations de l'ELN 2018 (17).

A. Apport de l'analyse des LAIP

Dans notre cohorte, l'évaluation des LAIP par cytométrie en flux au diagnostic montrait que 77% des patients présentaient une perte ou diminution d'expression d'antigène, 34% exprimaient des marqueurs d'infidélités de lignée et 23% une surexpression antigénique. L'évaluation de la différence d'expression d'un antigène à la surface d'un blaste est complexe ; elle peut être comparée d'une part à celle d'un blaste de régénération d'une moelle normale et d'autre part à celle d'une population connue pour exprimer fortement cet antigène (par exemple l'expression du CD33 par les monocytes). Dans la littérature, il est décrit que les LAIP identifiés au diagnostic d'une LAM peuvent être classés en 4 catégories : les expressions asynchrones d'antigènes (60-70% des patients), les infidélités de lignées (30-40%), les surexpressions (20-30%) et les sous-expressions (perte ou diminution) d'antigènes (20-30%) (24). Cependant, cette classification dépend des marqueurs utilisés, ceux-ci variant d'une étude à l'autre. Dans certaines études, l'expression asynchrone d'antigène est définie strictement par la co-expression de marqueurs d'immaturité (CD34, CD117) et de marqueurs tardifs de maturité (CD15, CD11c, CD14 ou CD65) (50,51). L'étude de San Miguel et al. montre une majorité d'expression asynchrone d'antigène (80%). Cependant ils considèrent une perte d'expression du CD13 et/ou du CD33 comme un asynchronisme alors que nous interprétons cette variation comme une perte d'expression. La catégorie « sous-expression d'antigène » n'a donc pas été prise en compte (52). Dans notre étude, les marqueurs de maturité (CD15, CD11c, CD14 ou CD65) sont effectués au diagnostic mais ne sont pas inclus dans les tubes de MRD (tubes communs avec le groupe ALFA-FILO selon les recommandations de l'ELN 2018 (17)). De ce fait, cela nous empêche d'évaluer les expressions asynchrones d'antigène. En accord avec d'autres études, les LAIP les plus fréquemment retrouvés sur les blastes de nos patients étaient la perte ou diminution de CD33 (31%) et de CD34 (26%) et l'expression aberrante du CD7 (23%) (52,53). Nous avons également mis en évidence une proportion importante (26%) de patients présentant une perte ou diminution d'expression de CD38 sur les blastes, LAIP peu étudié dans la littérature. Contrairement à nos résultats, il est décrit que la surexpression de CD33 et la perte d'HLA-DR sont fréquemment retrouvés (52). L'analyse de l'expression d'HLA-DR n'a été réalisée que chez une minorité de nos patients puisque le panel d'anticorps destiné à l'évaluation de la MRD a évolué en 2020 avec le passage de l'association de 8 à 10 anticorps. Le marqueur HLA-DR ECD ainsi que le CD10 AA700 ont été testés à partir de ce moment-là.

La littérature montre qu'une modification des LAIP au cours du traitement des LAM est observée dans 70 à 90% des cas. Les modifications les plus fréquemment observées portent sur les antigènes spécifiques de lignée (tels que CD33 ou CD13), les infidélités de lignée (tels que le CD7 ou CD56) et les antigènes associés aux progéniteurs (CD34, CD117) (53–55). Ces anomalies sont celles retrouvées pour nos 4 patients ayant un phénotype de rechute différent de celui du diagnostic. En revanche, la moitié de nos patients ne montraient pas de modification de LAIP. Cette discordance peut s'expliquer par le fait que notre étude de LAIP à la rechute n'a pu être effectuée que sur un faible nombre de patient (n=12). Ces modifications survenant au cours des traitements peuvent s'expliquer par une instabilité antigénique du clone principal, l'expansion d'un sous-clone chimiorésistant, minoritaire au diagnostic ou l'émergence d'un nouveau clone leucémique (56). Des difficultés pour suivre la MRD peuvent alors survenir et entraîner un retard dans la détection précoce des rechutes. Ces variations fréquentes doivent être connues de l'utilisateur afin de détecter correctement la persistance ou la réapparition des blastes. L'approche DfN et la constante comparaison à des moelles non pathologiques ou de régénération a donc aussi toute son importance dans le suivi de la MRD.

B. Apport de l'analyse des CSL

L'étude des CSL au diagnostic montrait que les patients présentant des CSL élevé (>1%) avait tendance à être plus âgé (66 ans versus 53 ans) et à avoir plus de pronostic défavorable (53% versus 41%) ce qui est en accord avec l'étude de Plesa et al (28). Ces patients semblaient également rechuter en plus grande proportion que ceux ayant un taux faible de CSL au diagnostic (60% contre 40% respectivement). Cependant, l'analyse de la survie globale sans rechute dans notre population n'a pas montré de différence significative au seuil de 0.03% et au seuil de 1% entre les deux groupes contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (28,38,39,57). En effet l'étude de Plesa et al. a montré qu'un taux élevé de CSL (>1%) au diagnostic était corrélé à un taux plus faible de rémission complète (52% versus 75% pour les patients avec des CSL <1%) ainsi qu'une survie sans rechute plus courte (12,7 mois versus non atteinte car plus de 50% des patients avec des CSL<1% n'ont pas rechuté après 25 mois de suivi). Cette différence peut s'expliquer par le fait que notre cohorte est trop faible. La question du seuil prédictif de rechute se pose également. Il n'existe pas de consensus à ce sujet et des taux différents sont utilisés en fonction des études ce qui peut également expliquer certaines différences (28,38,39,57). Les patients de notre étude présentant des CSL>1% au diagnostic

semblaient tout de même rechuter plus rapidement ; il faudrait effectuer une étude sur une plus grande cohorte afin de confirmer ces résultats. De plus, parmi les 4 patients qui n'ont jamais eu de rémission complète, la totalité présentait des CSL>1% au diagnostic. Cette tendance a également été observée dans l'étude de Zeijlemaker et al. sans pour autant être significative lors de l'analyse multivariée.

Malgré l'accumulation de preuves concernant la pertinence pronostique de la quantité de CSL au diagnostic, ce paramètre n'est actuellement pas inclus dans la stratification des groupes à risque. Il serait intéressant de réaliser une étude prospective multicentrique internationale comme celle de Hanekamp et al. sur un grand nombre d'échantillons afin de standardiser les pratiques et fixer un seuil de CSL pronostique commun (58). De plus de nouvelles stratégies ciblant le métabolisme des CSL sont actuellement à l'étude conférant un intérêt thérapeutique à l'identification des CSL (59).

C. CMF versus biologie moléculaire

Parmi les patients analysés, 97% pouvaient être suivis par CMF contre 29% par biologie moléculaire (ou 71% si on tient compte de la surexpression de WT1) ce qui est en accord avec les chiffres décrits dans la littérature qui relatent une plus large applicabilité de la CMF par rapport à la biologie moléculaire (1,7,17,24). En effet, de nombreuses anomalies moléculaires identifiées au diagnostic ne peuvent être utilisées pour le suivi de la MRD et les rechutes peuvent être dues à l'expansion d'un sous-clone ne présentant pas la totalité des mutations du clone initial (2).

La revue de Grimwade et al. précise cependant que l'applicabilité de la biologie moléculaire dépend de l'âge. En effet dans cette revue, un marqueur de biologie moléculaire utile au suivi était identifié chez 60% des enfants et des adultes (< 60 ans) contre 32% pour les adultes plus âgés (> 60 ans)(1). Dans notre étude, 13% des patients présentaient une mutation NPM1, 11% un transcrite de fusion CFBF-MYH11, 2% un transcrite de fusion RUNX1-RUNX1T1 et 2% un transcrite de fusion M-bcr. Ces chiffres sont différents de ceux décrits dans la revue de Dohner et al. qui montre que 30% des patients présentaient une mutation NPM1, 5% un transcrite de fusion CFBF-MYH11, 7% un transcrite de fusion RUNX1-RUNX1T1, 1% un transcrite Bcr-abl et 13% un transcrite PML-RARA. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que l'étude de Dohner et al n'a pris en compte que les patients jusqu'à 65 ans alors que 44% de nos patients ont plus de 65 ans.

Dans notre étude, l'analyse comparative des MRD obtenues par cytométrie en flux et par biologie moléculaire a montré que 31% des points de suivi étaient discordants dont la majorité (92%) était positif en biologie moléculaire et négatif en CMF. La relecture des analyses de CMF présentant des discordances a permis de modifier 2 résultats. Le premier cas était dû à un changement de LAIP entre le diagnostic et la rechute ce qui a entraîné l'échec de détection du clone leucémique. La deuxième modification de résultat était due à une MRD par CMF proche du seuil de sensibilité ce qui a rendu l'interprétation du résultat difficile. Ces deux modifications illustrent bien un des principaux inconvénients de la cytométrie en flux qui est la nécessité d'avoir un opérateur expérimenté et une constante comparaison avec des moelles normales afin de rechercher la présence de cellules présentant un phénotype 'DfN'. En accord avec nos résultats, l'étude de Ouyang et al. portant sur les transcrits de fusion RUNX1/RUNX1T1 et CBF β -MYH11 retrouvait 40% de discordances entre les MRD qui étaient positives en biologie moléculaire et négatives en CMF (60). Ces discordances concernaient majoritairement les points en post induction où la CMF était plus prédictive de rechute. Cette étude a également montré que les taux faibles <0,01% et élevés >10% de transcrits de fusion étaient bien corrélés aux résultats de MRD obtenus par CMF. Nos résultats montrent que 92% des points discordants étaient faiblement positifs (<10%) en biologie moléculaire (transcrits de fusion) et négatif en CMF, ce qui est en accord avec cette étude (60). De même, une étude de Inaba et al. a montré que les résultats de MRD évaluée par CMF et par biologie moléculaire étaient concordants dans 99% des cas lorsqu'ils étaient négatifs. En revanche, seuls 10% des prélèvements positifs par biologie moléculaire étaient positifs en cytométrie en flux, les analyses d'AML1-ETO et de CBF β -MYH11 représentant la plupart des divergences (61). Ces discordances pourraient s'expliquer par une différence de sensibilité entre les 2 méthodes (62). De plus, la cinétique des MRD est un point important à prendre en compte dans l'évaluation de la réponse au traitement ou celle de la rechute précoce. Une étude du United Kingdom Medical Research Council a montré l'importance de suivre la décroissance de ces transcrits de fusion en post induction (63). En effet, une diminution des taux de RUNX1/RUNX1T1 >3log (ou >500 copies pour CBF β -MYH11) était de meilleur pronostic. En post-consolidation ou pendant le suivi, cette étude montrait qu'un résultat de biologie moléculaire positif était associé à un risque élevé de rechute, résultat également retrouvé dans l'étude de Ivey et al. portant sur la mutation NPM1 (64). Toutefois, la MRD moléculaire peut persister à un faible nombre de copies après la fin du traitement, ce qui est associé à un faible risque de rechute. L'ELN a créé une catégorie de MRD incluant cette notion chez les patients ayant eu une RC cytologique, basé notamment sur une étude de Shayegi et al. (65). La

persistance moléculaire à faible nombre de copie est définie comme une MRD <1-2% et une augmentation de moins d'un log entre 2 prélèvements consécutifs. Si l'augmentation est supérieure à un log, il s'agit d'une rechute moléculaire. Différents seuils prédictifs sont décrits en fonction des temps de prélèvement, des marqueurs étudiés et des études (17,66).

Dans notre étude, un seul point de suivi était négatif en BM et positif en CMF. Pour ce patient, le seul marqueur moléculaire identifié pour le suivi était la surexpression de WT1. Malgré son applicabilité à un grand nombre de patients (~90%) (43), l'ELN ne préconise pas d'utiliser l'expression de WT1 comme marqueur de MRD en raison d'une faible sensibilité et spécificité, sauf si aucun autre marqueur n'est disponible pour le patient (17,67). De plus, il est recommandé de privilégier la quantification de WT1 dans le sang plutôt que dans la MO en raison de sa meilleure sensibilité (17). En effet, WT1 est exprimé plus faiblement par les cellules sanguines que les cellules hématopoïétiques médullaires en condition physiologique (43). Des seuils de surexpression pathologiques ont été fixés à 0,5% dans le sang et 2,5% dans la MO (43). L'étude de Hao et al. portant sur l'évaluation de la MRD post greffe retrouvait une sensibilité comparable de la surexpression de WT1 par rapport à la CMF mais préconisait une utilisation combinée de ces 2 techniques permettant d'obtenir une meilleure sensibilité (68).

L'étude de Liu et al. (69) a montré l'intérêt d'utiliser conjointement les résultats de MRD évaluée par CMF et biologie moléculaire (transcrits de fusion RUNX1-RUNX1T1 et mutation NPM1) dans le but d'améliorer la prédiction de rechutes et de survie globale en post-consolidation.

VI. Conclusion et perspectives

Nos données ont permis d'évaluer l'applicabilité au CHU de Marseille d'un panel de cytométrie en flux commun au groupe ALFA-FILO. Ce panel, utilisé dans le cadre du diagnostic et du suivi des leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte, a été mis en place en s'appuyant sur les recommandations de l'ELN 2018 dans un souci d'harmonisation des pratiques entre les différents laboratoires.

Notre étude a montré que la MRD par CMF était applicable dans 97% des cas et concordante à la biologie moléculaire dans 69% des cas. La grande majorité des points discordants étaient faiblement positifs en biologie moléculaire et négatifs en cytométrie en flux. Ces résultats mettent en lumière les différences de sensibilité existant entre ces deux méthodes ainsi que l'importance de prendre en compte la cinétique des MRD et les éventuelles modifications immunophénotypiques en cours de traitement ou lors des rechutes. Cependant, cette méthode nécessite une grande expertise dans l'analyse des résultats.

L'analyse des CSL est un paramètre important déterminé par la CMF puisqu'un taux élevé de CSL est décrit comme prédictif de rechute. Même si nous n'observons pas de différence statistiquement significative entre les patients présentant un taux de CSL $>$ ou $<$ à 1%, nous mettons en évidence une tendance à rechuter plus fréquemment et plus rapidement chez les patients avec un taux de CSL $>$ 1% au diagnostic.

Nos résultats confirment donc que la CMF est une technique présentant de nombreux avantages à la fois dans la détermination des CSL au moment du diagnostic ainsi que dans l'évaluation de la MRD au cours du suivi des patients atteints de LAM. L'utilisation dans nos laboratoires hospitaliers de nouveaux cytomètres permettant d'augmenter le nombre de paramètres analysés en un seul tube ainsi que le développement des analyses non supervisées seront des perspectives tout à fait intéressantes nous permettant encore très certainement d'améliorer la sensibilité de cette technique.

Références bibliographiques

1. 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.
2. 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*. 11 janv 2012;481(7382):506-10.
3. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med*. 17 sept 2015;373(12):1136-52.
4. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 1 nov 2006;107(9):2099-107.
5. Le Guyader-Peyrou S, Defossez G, Dantony E, Mounier M, Cornet E, Uhry Z, et al. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. *Santé publique France*. 2019;169.
6. Lowenberg B, Downing JR, Burnett A. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 30 sept 1999;341(14):1051-62.
7. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.
8. 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.
9. 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.
10. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 9 juin 2016;374(23):2209-21.
11. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, Amler S, Sauerland MC, Görlich D, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 4 août 2016;128(5):686-98.
12. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):453-74.
13. Krug U, Röllig C, Koschmieder A, Heinecke A, Sauerland MC, Schaich M, et al. Complete remission and early death after intensive chemotherapy in patients aged 60 years or older with acute myeloid leukaemia: a web-based application for prediction of outcomes. *The Lancet*. déc 2010;376(9757):2000-8.

14. Dombret H, Gardin C. An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia. *Blood*. 7 janv 2016;127(1):53-61.
15. Freireich EJ, Gehan EA, Sulman D, Boggs DR, Frei E. The effect of chemotherapy on acute leukemia in the human. *J Chronic Dis*. déc 1961;14:593-608.
16. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 15 mars 1995;85(6):1416-34.
17. 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.
18. Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. *Hématologie*. juin 2019;5:3-16.
19. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *JCO*. 10 nov 2013;31(32):4123-31.
20. Buckley SA, Wood BL, Othus M, Hourigan CS, Ustun C, Linden MA, et al. Minimal residual disease prior to allogeneic hematopoietic cell transplantation in acute myeloid leukemia: a meta-analysis. *Haematologica*. mai 2017;102(5):865-73.
21. 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*. 3 juin 2020;9(6):E1714.
22. Chen X, Wood BL. Monitoring minimal residual disease in acute leukemia: Technical challenges and interpretive complexities. *Blood Rev*. mars 2017;31(2):63-75.
23. 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.
24. Del Principe MI. Minimal residual disease in acute myeloid leukemia of adults: determination, prognostic impact and clinical applications. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 20 oct 2016;8:2016052.
25. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJM, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, et al. Peripheral blood minimal residual disease may replace bone marrow minimal residual disease as an immunophenotypic biomarker for impending relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. mars 2016;30(3):708-15.
26. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature*. 17 févr 1994;367(6464):645-8.
27. Clarke MF, Dick JE, Dirks PB, Eaves CJ, Jamieson CHM, Jones DL, et al. Cancer Stem Cells—Perspectives on Current Status and Future Directions: AACR Workshop on Cancer Stem Cells. *Cancer Res*. 1 oct 2006;66(19):9339-44.

28. Plesa A, Dumontet C, Mattei E, Tagoug I, Hayette S, Sujobert P, et al. High frequency of CD34+CD38-/low immature leukemia cells is correlated with unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *World J Stem Cells*. 26 déc 2017;9(12):227-34.
29. O'Brien JA, Rizzieri DA. Leukemic stem cells: a review. *Cancer Invest*. mai 2013;31(4):215-20.
30. 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.
31. Jordan C, Upchurch D, Szilvassy S, Guzman M, Howard D, Pettigrew A, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. *Leukemia*. oct 2000;14(10):1777-84.
32. 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.
33. Kikushige Y, Miyamoto T. Identification of TIM-3 as a Leukemic Stem Cell Surface Molecule in Primary Acute Myeloid Leukemia. *Oncology*. 2015;89 Suppl 1:28-32.
34. 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. *Journal of Experimental Medicine*. 7 oct 2019;216(10):2362-77.
35. Arnone M, Konantz M, Hanns P, Paczulla Stanger AM, Bertels S, Godavarthy PS, et al. Acute Myeloid Leukemia Stem Cells: The Challenges of Phenotypic Heterogeneity. *Cancers*. 12 déc 2020;12(12):3742.
36. Zeijlemaker W, Kelder A, Oussoren-Brockhoff YJM, Scholten WJ, Snel AN, Veldhuizen D, et al. A simple one-tube assay for immunophenotypical quantification of leukemic stem cells in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. févr 2016;30(2):439-46.
37. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. mai 2017;105(5):549-57.
38. 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.
39. 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*. 2014;9(9):e107587.
40. Bradbury C, Houlton AE, Akiki S, Gregg R, Rindl M, Khan J, et al. Prognostic value of monitoring a candidate immunophenotypic leukaemic stem/progenitor cell population in patients allografted for acute myeloid leukaemia. *Leukemia*. avr 2015;29(4):988-91.
41. Nomdedéu JF, Hoyos M, Carricondo M, Bussaglia E, Estivill C, Esteve J, et al. Bone marrow WT1 levels at diagnosis, post-induction and post-intensification in adult de novo AML. *Leukemia*. nov 2013;27(11):2157-64.

42. Holdrinet RS, von Egmond J, Wessels JM, Haanen C. A method for quantification of peripheral blood admixture in bone marrow aspirates. *Exp Hematol.* janv 1980;8(1):103-7.
43. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol.* 1 nov 2009;27(31):5195-201.
44. Walter RB, Othus M, Borthakur G, Ravandi F, Cortes JE, Pierce SA, et al. Prediction of Early Death After Induction Therapy for Newly Diagnosed Acute Myeloid Leukemia With Pretreatment Risk Scores: A Novel Paradigm for Treatment Assignment. *JCO.* 20 nov 2011;29(33):4417-24.
45. Voskova D, Schoch C, Schnittger S, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. Stability of leukemia-associated aberrant immunophenotypes in patients with acute myeloid leukemia between diagnosis and relapse: comparison with cytomorphologic, cytogenetic, and molecular genetic findings. *Cytometry B Clin Cytom.* nov 2004;62(1):25-38.
46. Venditti A, Piciocchi A, Candoni A, Melillo L, Calafiore V, Cairoli R, et al. GIMEMA AML1310 trial of risk-adapted, MRD-directed therapy for young adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia. *Blood.* 19 sept 2019;134(12):935-45.
47. Muto A, Mori S, Matsushita H, Awaya N, Ueno H, Takayama N, et al. Serial quantification of minimal residual disease of t(8;21) acute myelogenous leukaemia with RT-competitive PCR assay. *British Journal of Haematology.* oct 1996;95(1):85-94.
48. Tobal K, Yin JAL. Molecular Monitoring of Minimal Residual Disease in Acute Myeloblastic Leukemia with t(8;21) by RT-PCR. *Leukemia & Lymphoma.* janv 1998;31(1-2):115-20.
49. Laczika K, Novak M, Hilgarth B, Mitterbauer M, Mitterbauer G, Scheidel-Petrovic A, et al. Competitive CBFbeta/MYH11 reverse-transcriptase polymerase chain reaction for quantitative assessment of minimal residual disease during postremission therapy in acute myeloid leukemia with inversion(16): a pilot study. *JCO.* avr 1998;16(4):1519-25.
50. Bahia DM, Yamamoto M, Chauffaille M de L, Kimura EY, Bordin JO, Filgueiras MA, et al. Aberrant phenotypes in acute myeloid leukemia: a high frequency and its clinical significance. *Haematologica.* août 2001;86(8):801-6.
51. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. The role of multiparameter flow cytometry for detection of minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Am J Clin Pathol.* janv 2009;131(1):16-26.
52. San Miguel JF, Vidriales MB, López-Berges C, Díaz-Mediavilla J, Gutiérrez N, Cañizo C, et al. Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood.* 15 sept 2001;98(6):1746-51.
53. Cui W, Zhang D, Cunningham MT, Tilzer L. Leukemia-associated aberrant immunophenotype in patients with acute myeloid leukemia: changes at refractory disease or first relapse and clinicopathological findings. *Int J Lab Hematol.* déc 2014;36(6):636-49.

54. Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, Creutzig U, Griesinger F, Puhlmann U, et al. Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse in childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom.* janv 2005;63(1):1-9.
55. 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.
56. Vergez F. Maladie résiduelle en cytométrie. *Horizons hemato.* 2018;08(04):189-190.
57. Buccisano F, Palmieri R, Irno Consalvo M, Piciocchi A, Maurillo L, Del Principe MI, et al. Leukemic Stem Cells Persistence Measured By Multiparametric Flow Cytometry Is a Biomarker of Poor Prognosis in Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 13 nov 2019;134(Supplement_1):2688-2688.
58. Hanekamp D, Snel AN, Kelder A, Scholten WJ, Khan N, Metzner M, et al. Applicability and reproducibility of acute myeloid leukaemia stem cell assessment in a multi-centre setting. *Br J Haematol.* sept 2020;190(6):891-900.
59. Valent P, Sadovnik I, Eisenwort G, Bauer K, Herrmann H, Gleixner KV, et al. Immunotherapy-Based Targeting and Elimination of Leukemic Stem Cells in AML and CML. *IJMS.* 29 août 2019;20(17):4233.
60. Ouyang J, Goswami M, Peng J, Zuo Z, Daver N, Borthakur G, et al. Comparison of Multiparameter Flow Cytometry Immunophenotypic Analysis and Quantitative RT-PCR for the Detection of Minimal Residual Disease of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia. *Am J Clin Pathol.* juin 2016;145(6):769-77.
61. Inaba H, Coustan-Smith E, Cao X, Pounds SB, Shurtleff SA, Wang KY, et al. Comparative analysis of different approaches to measure treatment response in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol.* 10 oct 2012;30(29):3625-32.
62. Pettersson L, Levéen P, Axler O, Dvorakova D, Juliusson G, Ehinger M. Improved minimal residual disease detection by targeted quantitative polymerase chain reaction in Nucleophosmin 1 type a mutated acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* oct 2016;55(10):750-66.
63. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood.* 4 oct 2012;120(14):2826-35.
64. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med.* 4 févr 2016;374(5):422-33.
65. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, Schaich M, Schetelig J, Platzbecker U, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood.* 4 juill 2013;122(1):83-92.

66. Forghieri F, Comoli P, Marasca R, Potenza L, Luppi M. Minimal/Measurable Residual Disease Monitoring in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Clinical Viewpoint and Perspectives. *Int J Mol Sci.* 6 nov 2018;19(11):E3492.
67. Rossi G, Minervini MM, Carella AM, de Waure C, di Nardo F, Melillo L, et al. Comparison between multiparameter flow cytometry and WT1-RNA quantification in monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia without specific molecular targets. *Leuk Res.* avr 2012;36(4):401-6.
68. Hao Y, Cheng Y, Wu Q, Zhang A, Jiang X, Xu X. Combined usage of Wilms' tumor gene quantitative analysis and multiparameter flow cytometry for minimal residual disease monitoring of acute myeloid leukemia patients after allogeneic hematopoietic stem cells transplantation. *Exp Ther Med.* févr 2018;15(2):1403-9.
69. Liu F-J, Cheng W-Y, Lin X-J, Wang S-Y, Jiang T-Y, Ma T-T, et al. Measurable Residual Disease Detected by Multiparameter Flow Cytometry and Sequencing Improves Prediction of Relapse and Survival in Acute Myeloid Leukemia. *Front Oncol.* 20 mai 2021;11:677833.

SERMENT DE GALIEN

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

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

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

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

Evaluation de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans les leucémies aiguës myéloïdes : expérience du laboratoire d'hématologie du CHU de Marseille

Les LAM constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes dont le pronostic reste sombre chez les adultes. La détection de la maladie résiduelle (MRD) par cytométrie en flux (CMF) et biologie moléculaire (BM) tout au long du parcours de soins du patient est primordiale afin d'évaluer la réponse au traitement mais aussi d'identifier précocement une rechute. Dans le but d'harmoniser les pratiques de détection de la MRD par CMF, un panel commun à de nombreux laboratoires a été développé selon les recommandations nationales et européennes. Ce panel comprend différentes approches reposant sur la recherche d'aberrations immunophénotypiques blastiques (approches LAIP et DfN) et la détection de cellules souches leucémiques (CSL). L'objectif de ma thèse a été d'évaluer l'applicabilité de cette analyse au sein du laboratoire d'hématologie de la Timone au CHU de Marseille.

L'évaluation de la MRD par CMF a été effectuée chez 41 patients et comparés aux résultats de biologie moléculaire. Nous montrons que la MRD par CMF est applicable dans 97% des cas et observons des résultats comparables à ceux de la biologie moléculaire dans 69% des cas.

Malgré une moindre sensibilité, ces résultats mettent en évidence que la CMF détient une place importante dans l'évaluation de la MRD au cours du traitement des LAM notamment grâce à son importante applicabilité.

Mots clés : Maladie résiduelle, leucémies aiguës myéloïdes, cytométrie en flux, cellules souches leucémiques.