

Table des matières

LISTE DES FIGURES.....	22
LISTE DES TABLEAUX	24
LISTE DES ABREVIATIONS	25
I. INTRODUCTION.....	27
II. ONTOGENESE.....	28
1. Hématopoïèse :	28
2. Lymphopoïèse B	30
2.1. Structure générale du BCR	30
2.2. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène	32
2.3. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène	35
III. LEUCEMIES AIGUES LYMPHOBLASTIQUES B.....	38
1. Définition.....	38
2. Epidémiologie	39
3. Facteurs de risques.....	41
3.1. Facteurs de risques établis	41
3.2. Facteurs de risques suspectés	41
4. Diagnostic clinique	42
5. Diagnostic biologique	43
6. Classification.....	47
6.1. Cytologique.....	47
6.2. Immunologique	47
6.3. Classification OMS	48
7. Pronostic.....	51
7.1. Facteurs liés à la maladie.....	51

7.2. Facteurs liés au traitement	58
IV. La maladie résiduelle	62
1. Définition et concept	62
2. Intérêt clinique	64
3. Méthode de détection de la MRD	66
3.1. La cytométrie en flux	66
3.2. La biologie moléculaire	75
4. Points de suivi de la MRD	78
4.1. Protocole FRALLE	78
4.2. Protocole CAALL	84
V. OBJECTIFS DE L'ETUDE	86
VI. MATERIEL ET METHODES	87
1. Population étudiée	87
2. Prélèvements	88
3. Méthode en cytométrie en Flux	88
3.1. Cytomètre	88
3.2. Panels d'anticorps	88
3.3. Préparation des échantillons	93
3.4. Stratégie d'analyse	95
4. Analyses statistiques	98
VII. RESULTATS	100
1. Caractéristiques de la population	100
1.1. Données démographiques	100
1.2. Données biologiques	100
1.3. Classification immunophénotypique	101

1.4. Anomalies cytogénétiques et moléculaires	101
1.5. Protocoles thérapeutiques.....	102
2. Comparaison des résultats de MRD	103
2.1. Echantillons analysés.....	103
2.2. Performance de la méthode CMF	103
2.3. Concordance et corrélation entre les 2 méthodes.....	106
2.4. Analyses des discordances	109
VIII. DISCUSSION	122
1. Corrélation des résultats	122
1.1. Discordance CMF négative/ BM positive	123
1.2. Discordance CMF positive / BM négative	124
2. Avantages et inconvénients des deux techniques.	125
2.1. Rapidité d'analyse	125
2.2. Faisabilité de la technique.....	125
2.3. Sensibilité	126
2.4. Spécificité	126
IX. PERSPECTIVES	130
1. Axes d'amélioration de la technique.....	130
1.1. Standardisation.....	130
1.2. Apport de nouveaux marqueurs.....	131
1.3. Fonctionnalités des logiciels de traitement de données.....	132
2. Apport du Next generation sequencing (NGS)	135
X. CONCLUSION	136
Annexe 1 Recueil des données clinico-biologiques de l'étude (simplifié).....	137
BIBLIOGRAPHIE	142

LISTE DES FIGURES

FIGURE 1 SCHEMA ILLUSTRATIF SIMPLIFIE DE LA DIFFERENTIATION HEMATOPOIETIQUE D'APRES A. FERNANDES 2015 (2).....	29
FIGURE 2 STRUCTURE D'UNE IMMUNOGLOBULINE ET RELATION ENTRE STRUCTURE GENOMIQUE ET STRUCTURE PROTEIQUE D'APRES LEFRANC M.-P. ET LEFRANC G., <i>GENETIQUE MOLECULAIRE DES IMMUNOGLOBULINES</i> (4).....	31
FIGURE 3 STRUCTURE GENERALE DU RECEPTEUR BCR (5)	32
FIGURE 4 REPRESENTATION D'UN RECEPTEUR PRE B (PRE-BCR)	33
FIGURE 5 ETAPES DE DIFFERENCIATION LYMPHOCYTAIRE INDEPENDANTE DE L'ANTIGENE (D'APRES PR KAÏS LASSOUED, INES MASMOUDI. DCEM1 2010-2011 IMMUNOLOGIE LYMPHOCYTES B : MARQUEURS, DIFFERENCIATION ET ACTIVATION).....	34
FIGURE 6 LYMPHOPOÏESE B : DE LA CELLULE SOUCHE AU LYMPHOCYTE B CIRCULANT (4)	37
FIGURE 7 REPARTITION DES DIFFERENTS CANCERS CHEZ L'ENFANT ENTRE 2 ET 10ANS D'APRES LE REGISTRE NATIONAL DES TUMEURS SOLIDES DE L'ENFANT (10).	39
FIGURE 8 TAUX D'INCIDENCE DES LEUCEMIES AIGUËS SELON L'AGE EN FRANCE (RNHE 2000-2004) ((11))	40
FIGURE 9 CARYOTYPE ILLUSTRE UNE TRANSLOCATION (9;22) CHEZ UN PATIENT ATTEINT DE LAL B PHI+ (CARYOTYPE : T(9;22)(Q34;Q11)).....	44
FIGURE 10 PRINCIPE DE LA FISH D'APRES C. OZOUF-COSTAS FISH CYTOGENETICS	44
FIGURE 11 PRINCIPE DE LA RT-MLPA D'APRES P.RUMINY, CENTRE HENRI BECQUEREL.	46
FIGURE 12 ESTIMATION DES FREQUENCES DES ANOMALIES GENETIQUES DANS LES LAL DE L'ENFANT (EN VIOLET FIGURE LES ANOMALIES EXCLUSIVEMENT RELIES AUX LAL T) (19)	50
FIGURE 13 TAUX DE SURVIE EN FONCTION DU TAUX DE MRD OBTENUE APRES INDUCTION (44)	59
FIGURE 14 EVALUATION SCHEMATIQUE DE LA MASSE TUMORALE EN FONCTION DE LA REPONSE AU TRAITEMENT (45)	63
FIGURE 15 INCIDENCE CUMULEE DES RECHUTES SELON LES TAUX DE MRD CHEZ DES ENFANTS ATTEINTS DE LALB EN POST INDUCTION (49)	65
FIGURE 16 REPRESENTATION SCHEMATIQUE D'UN CYTOMETRE D'APRES V. FRAISIER SPENCER BROWN ISV.....	69
FIGURE 17 CRITERES D'INCLUSION/EXCLUSION AU PROTOCOLE FRALLE A (2003)	78
FIGURE 18 PROTOCOLE THERAPEUTIQUE FRALLE A.....	80
FIGURE 19 CRITERES D'INCLUSION/EXCLUSION AU PROTOCOLE FRALLE B (2003)	81
FIGURE 20 CRITERES D'INCLUSION B1/B2 DU PROTOCOLE FRALLE B (2003).....	82
FIGURE 21 PROTOCOLE THERAPEUTIQUE FRALLE B	83
FIGURE 22 STRATIFICATION APRES TRAITEMENT D'INDUCTION (TP1) ET CONSOLIDATION (TP2) SELON LE PROTOCOLE CAALL-F01. 85	85
FIGURE 23 EXEMPLE D'HISTOGRAMME TIME AVEC REPARTITION HOMOGENE DES EVENEMENTS.	95

FIGURE 24 EXEMPLE D'HISTOGRAMME TAILLE STRUCTURE.....	96
FIGURE 25 EXEMPLE D'HISTOGRAMME FS INT/FS PEAK.....	96
FIGURE 26 EXEMPLE D'HISTOGRAMME CD45/SSC D'UNE MOELLE PRESENTANT UN ENVAHISSEMENT BLASTIQUE A GAUCHE ET D'UNE MOELLE NORMALE A DROITE.	97
FIGURE 27 REPARTITION DES LAL B DIAGNOSTIQUEES D'APRES LA CLASSIFICATION EGIL	101
FIGURE 28 REPARTITION DES DIFFERENTES ANOMALIES CYTOGENETIQUES ET/OU MOLECULAIRES PRESENTES AU DIAGNOSTIC OU A LA RECHUTE.....	101
FIGURE 29 REPARTITION DES PATIENTS SELON LES PROTOCOLES THERAPEUTIQUES	102
FIGURE 30 REPARTITION DES ECHANTILLONS DE MOELLE CONCERNES PAR L'ETUDE.....	103
FIGURE 31 ANALYSE DES PRELEVEMENTS DE MRD POSITIVE PAR LA REPRESENTATION DE BLAND-ALTMAN.....	108
FIGURE 32 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/S/U/T/S/V), LA REPRESENTATION DE 113 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	110
FIGURE 33 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/S/U/T/V), LA REPRESENTATION DE 7 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	111
FIGURE 34 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/S/U/T/V), LA REPRESENTATION DE 657 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES (MRD DU 08/03/2016).....	113
FIGURE 35 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/S/T2/U), LA REPRESENTATION DE 240 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	114
FIGURE 36 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/S/U/T/V), LA REPRESENTATION DE 14 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	116
FIGURE 37 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE U/S/K/O/T), LA REPRESENTATION DE 141 501 CELLULES RESIDUELLES.....	117
FIGURE 38 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE BLASTES/C/M/N/O/Q), LA REPRESENTATION DE 32 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	119
FIGURE 39 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/C/N/O/P/Q), LA REPRESENTATION DE 3 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES (INFERIEUR AU SEUIL).....	120
FIGURE 40 MASQUE D'ANALYSE AVEC EN GRAPHIQUE D'INTERSECTION CD45/SS (FENETRE B/C/N/O/P), LA REPRESENTATION DE 212 CELLULES BLASTIQUES RESIDUELLES.....	121
FIGURE 41 EXEMPLE D'ANALYSE EN CMF DE MOELLE OSSEUSE MONTRANT L'EVOLUTION PHENOTYPIQUE DE L'HEMATOGONE (74) 128	
FIGURE 42 EXEMPLE DE RADAR PLOT AVEC FENETRAGE SUR LES POPULATIONS X ET Y (INSTRUCTIONS FOR USE KALUZA FLOW CYTOMETRY ANALYSIS SOFTWARE)	133
FIGURE 43 EXEMPLE DE REPRESENTATION SPADE (82)	134

LISTE DES TABLEAUX

TABLEAU 1 CLASSIFICATION DES LAL B SELON L'EGIL (17)	48
TABLEAU 2 CLASSIFICATION OMS 2016 DES LAL B AVEC ANOMALIES CYTOGENETIQUES RECURRENTES (18).	49
TABLEAU 3 CRITERES INCLUSIFS DU PROTOCOLE CAALL-F01	84
TABLEAU 4 COMPOSITION EN ANTICORPS/FLUOROCHROMES DES TUBES UTILISES AU CHU DE ROUEN.	92
TABLEAU 5 CONSTANTES BIOLOGIQUES PRESENTES AU DIAGNOSTIC OU A LA RECHUTE.	100
TABLEAU 6 TABLEAU DE CONTINGENCE DES RESULTATS DE MRD OBTENUS PAR LES TECHNIQUES DE CMF AVANT RELECTURE ET DE BM.	104
TABLEAU 7 TABLEAU DE CONTINGENCE DES RESULTATS DE MRD OBTENUS PAR LES TECHNIQUES DE CMF AVANT RELECTURE ET BM.	104
TABLEAU 8 REPARTITION DES RESULTATS OBSERVES EN BM ET CMF	106
TABLEAU 9 VALEURS DE MRD OBTENUES POUR LES 7 PATIENTS PRESENTANT UN MRD POSITITVE QUANTIFIABLES EN CMF ET BM.	107

LISTE DES ABREVIATIONS

ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique

ARN : Acide ribonucléique

BCR : B Cell Receptor

BM : Biologie moléculaire

CG : Centre germinatif

CLP : Common lymphoid precursor

CMF : Cytométrie en flux

CPA : Cellule présentatrice de l'antigène

CSH : Cellule souche hématopoïétique

Dg : Diagnostic

EGIL : European group for the immunological classification of leukemia

FISH : Fluorescente *in situ* Hybridation

GEIL : Groupe d'étude immunologique des leucémies

Ig : Immunoglobuline

IL : Interleukine

ITK : inhibiteur de tyrosine kinase

LA : Leucémie aiguë

LAIP : Leukemia-associated aberrant immunophenotypes

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LB : Lymphocyte B

MRD : Maladie résiduelle

NF : Non fait

OMS : Organisation mondiale de la santé

PCR : Polymerase Chain Reaction

Phi : Philadelphie

PMP : Progéniteur multipotent

PMT : Photomultiplicateur

RT-MLPA : Retro-Transcriptase Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification

TCR : T-cell receptor

I. INTRODUCTION

La quantification de la maladie résiduelle est un outil devenu indispensable dans la prise en charge des hémopathies. Elle permet d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place, de prédire le risque de rechute et est ainsi utilisée dans la stratification thérapeutique. Les techniques mises en place doivent donc répondre à des exigences en termes de sensibilité, de spécificité et de rapidité de rendu de résultats.

La biologie moléculaire est la méthode de référence de par son très bonne sensibilité et un bon niveau de standardisation cependant, elle reste une technique complexe, coûteuse et peu adaptée à une prise de décision rapide. Ceci justifie le besoin d'envisager d'autres techniques comme la cytométrie en flux. Cette dernière est basée sur la détection d'un profil immunophénotypique caractéristique du blaste au moment du diagnostic. Les performances de la technique se sont améliorées par le développement de nouveaux automates multiparamétriques et les logiciels d'analyses.

II. ONTOGENESE

1. Hématopoïèse :

1.1. Définition

L'hématopoïèse est l'ensemble des mécanismes impliqués dans la production continue et régulée des cellules sanguines : les érythrocytes, les plaquettes et les leucocytes. Elle est initiée par les cellules souches hématopoïétiques (CSH), celles-ci donnent naissance à des progéniteurs engagés dans des voies de différenciation permettant d'obtenir *in fine* les cellules sanguines matures.

Les CSH possèdent une capacité d'auto-renouvellement ainsi qu'une capacité de différenciation qui leur permet de générer les différentes cellules sanguines matures (multipotence). Ainsi elles génèrent des progéniteurs multipotents (PMP) qui se différencient en cellules myéloïdes multipotentes (ou progéniteurs communs érythromyéloïdes) ou en cellules lymphoïdes multipotentes. Ces derniers prolifèrent et se différencient pour aboutir aux précurseurs des cellules sanguines reconnaissables morphologiquement (1).

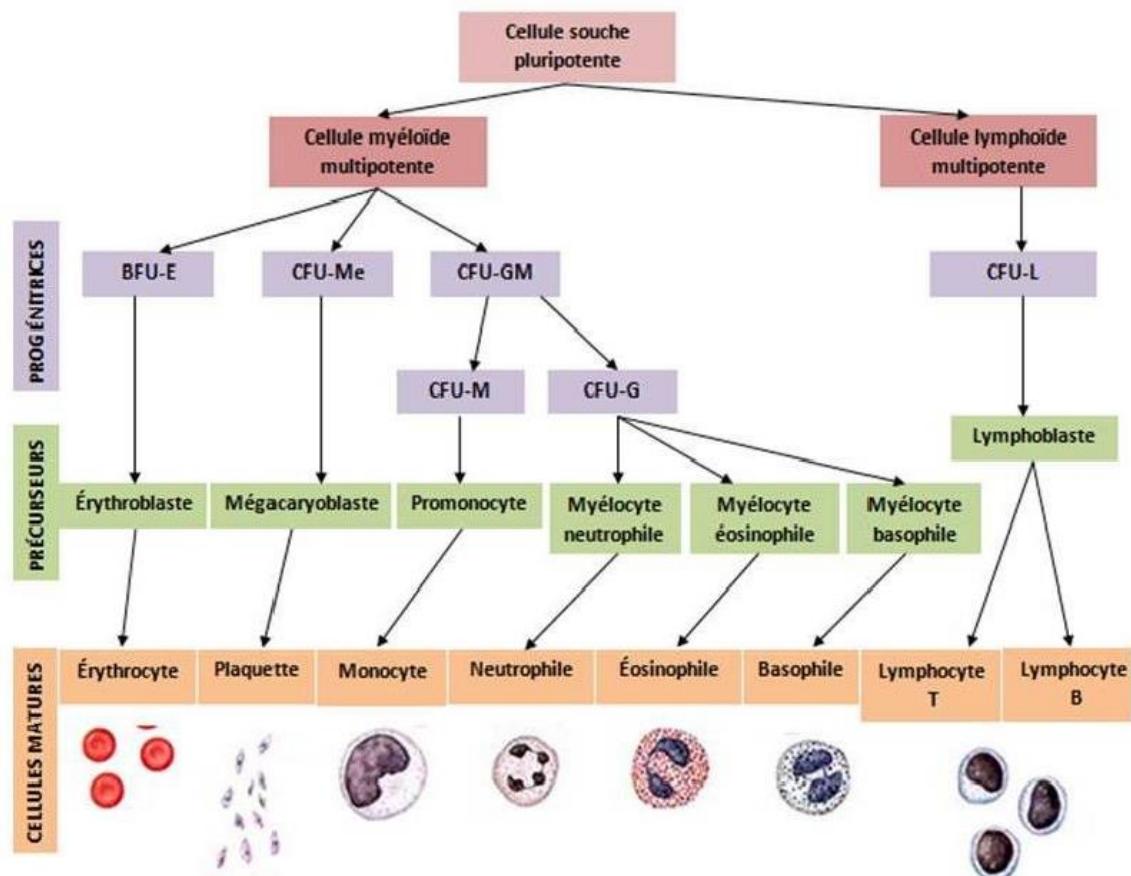


Figure 1 Schéma illustratif simplifié de la différenciation hématopoïétique d'après A. Fernandes 2015 (2)

BFU-E: Unité formatrice de blastes d'érythrocytes; CFU-Me: Unité formatrice de colonies mégacaryocytaire; CFU-GM: CFU granulomonocytaire; CFU-M: CFU de monocytaire; CFU-G: CFU granulocytaire; CFU-L: CFU lymphocytaire

2. Lymphopoïèse B

La lymphopoïèse B désigne l'ensemble des étapes qui conduisent la cellule souche hématopoïétique (CSH) à se différencier en un lymphocyte B (LB) mature exprimant un récepteur membranaire : le BCR (B Cell Receptor).

2.1. Structure générale du BCR

Il est composé d'une molécule d'immunoglobuline associée à un hétérodimère Ig α /Ig β (CD79a/CD79b), responsable de la transduction du signal.

2.1.1. Structure générale d'une immunoglobuline

L'immunoglobuline (Ig) est une hétéroprotéine composée de 2 chaînes lourdes (H pour « heavy ») et de 2 chaînes légères (L pour « light ») identiques deux à deux (Figure 2). La chaîne lourde comporte 1 domaine variable VH porteur de la spécificité antigénique et 3 domaines constants CH1, CH2 et CH3 pour les isotypes δ , γ et α ou 4 domaines constants CH1 à CH4 pour les isotypes μ ou ϵ . La chaîne légère comporte 1 domaine variable VL et 1 domaine constant CL qui définit l'isotype κ ou λ de la chaîne. L'assemblage d'un dimère de chaîne lourde δ , γ , α , μ ou ϵ avec un dimère de chaîne légère (κ ou λ) définit une immunoglobuline de classe IgG, IgD, IgA, IgM ou IgE respectivement (3).

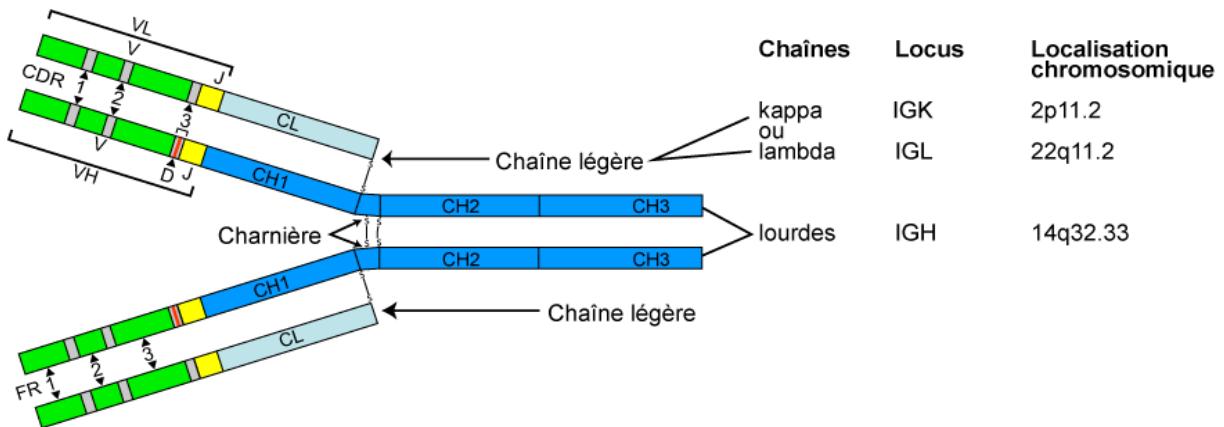


Figure 2 Structure d'une immunoglobuline et relation entre structure génomique et structure protéique d'après Lefranc M.-P. et Lefranc G., *Génétique Moléculaire des Immunoglobulines*(4)

2.1.2. Les gènes des immunoglobulines

Les gènes des immunoglobulines sont organisés en 3 loci localisés sur le chromosome 14 pour le locus IgH, sur le chromosome 2 pour le locus IgK et sur le chromosome 22 pour le locus Ig λ (Figure 2).

Le domaine variable de la chaîne lourde, VH, est codé par un assemblage de gènes V (« variability »), D (« diversity ») et J (« junction »). Une seule combinaison de gènes V, D et J est utilisée par chaque lymphocyte B lors de la phase de différenciation indépendante de l'antigène. Chaque domaine constant de la chaîne lourde (CH1, CH2, CH3) est codé par 1 gène unique qui peut être réarrangé au cours de la phase de différenciation dépendante de l'antigène.

Le domaine variable de la chaîne légère est codée par une combinaison de gènes V et J seulement. Le domaine constant de la chaîne κ est codé par un gène unique. Celui de la chaîne λ est codé par plusieurs copies du gène C λ , chacune étant associée à 1 gène J λ (tandems C λ -J λ)

Les domaines variables des chaînes lourdes et des chaînes légères sont au final constitués de 4 régions peu variables (régions FR1 à FR4 « framework »). Elles encadrent 3 régions hypervariables qui entrent en contact avec l'antigène (CDR1 à CDR3, « complementary determining region »). Les CDR1 et 2 sont codés par le gène V alors que la région CDR3 correspond à la jonction VDJ pour la chaîne lourde et VJ pour les chaînes légères (Figure 2). CDR3 constitue la région hypervariable unique pour chaque lymphocyte.

2.1.3. Structure du récepteur à l'antigène de la cellule B ou BCR :

Le BCR est ainsi composé d'une molécule complète d'immunoglobuline transmembranaire associée à des phosphoprotéines sous forme de dimères CD79a ($\text{Ig}\alpha$) et CD79b ($\text{Ig}\beta$) possédant des régions ITAMs (« immunoreceptor tyrosine-based activation motif ») indispensable à l'initiation de la transduction du signal (Figure 3).

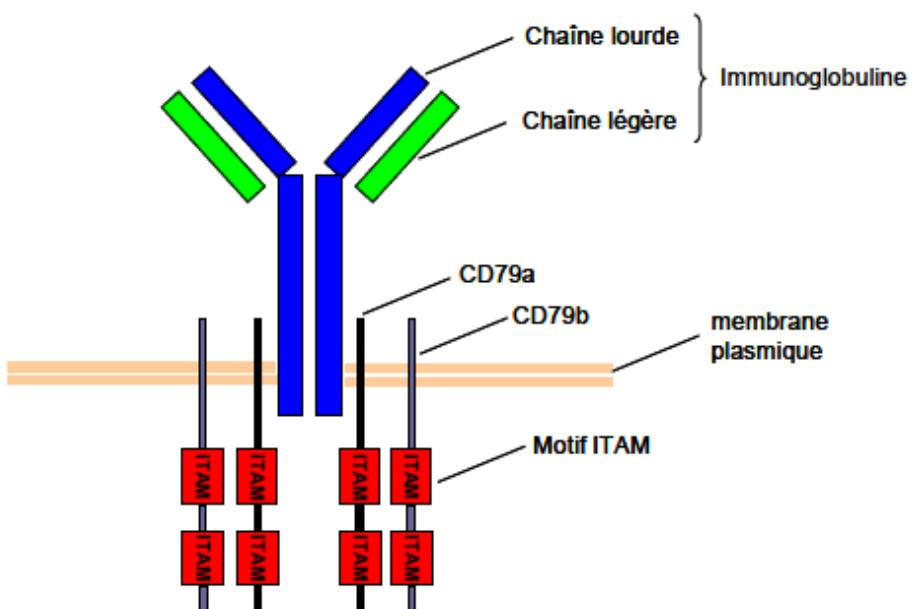


Figure 3 Structure générale du récepteur BCR (5)

2.2. Différenciation lymphocytaire B indépendante de l'antigène

La différenciation lymphocytaire B à partir de la cellule souche hématopoïétique (CSH) dans la moelle osseuse correspond à la phase de lymphopoïèse B indépendante de l'antigène. Une partie des CSH se différencie en progéniteurs lymphoïdes communs (« common lymphoid precursor » ou CLP) aboutissant *in fine* à la formation de lymphocytes B exprimant une immunoglobuline de surface capable de reconnaître l'antigène.

2.2.1. Le stade pré-pro B :

Il s'agit du premier stade de différenciation du lymphocyte B à partir du CLP. L'IL7 sécrétée par le microenvironnement intervient dans cette phase précoce de différenciation. L'engagement du CLP dans la lignée B est caractérisé par l'expression de nombreux facteurs de transcription : IKAROS et PU1 (« purine box factor 1 ») relayés par E2A (« E box binding protein 2A ») et EBF (« early B cell factor ») qui induisent l'expression de Pax5. Pax5 est un facteur de transcription qui sera indispensable au maintien de la différenciation B durant toute la période de maturation(6). Les cellules pré-pro B expriment encore un faible taux de Pax5 et ne portent pas de BCR à la surface.

2.2.2. Le stade pro-B :

Les cellules au stade pro-B expriment le marqueur CD19 à leur surface ainsi qu'une ébauche de BCR que l'on appelle pro-BCR, constituée des 2 corécepteurs CD79a et CD79b associés à la calnexine.

C'est à ce stade que débute le réarrangement des gènes des immunoglobulines : sous l'action de Pax5 dont le niveau d'expression a augmenté, les enzymes RAG1 et RAG2 (« recombination activating gene ») vont initier la recombinaison des gènes V, D et J du locus IgH.

Cette recombinaison VDJ constitue le premier point de contrôle majeur de la différenciation B. Cela permettant l'expression d'une chaîne lourde μ . Son association à une pseudo-chaîne légère va permettre la formation d'un pré-BCR marquant le passage au stade pré-B.

2.2.3. Le stade pré-B :

La cellule B exprimant un pré-BCR est une « pré-BI ». Le pré-BCR émet un signal de survie à la cellule grâce à la chaîne $\lambda 5$ qui reconnaît la galectine-1 exprimée par les cellules stromales médullaires. Le signal du pré-BCR réprime l'expression des gènes RAG1 et RAG2 et inhibe le réarrangement du second allèle IgH. Il donne également un signal de prolifération à

la cellule qui devient une « large pré-BII » (« grande taille »). Enfin le pré-BCR réprime l'expression de la pseudo-chaine légère et induit la perte de son expression membranaire. La cellule devient alors, après prolifération, un « small pré-BII » (« petite taille ») (Figure 5).

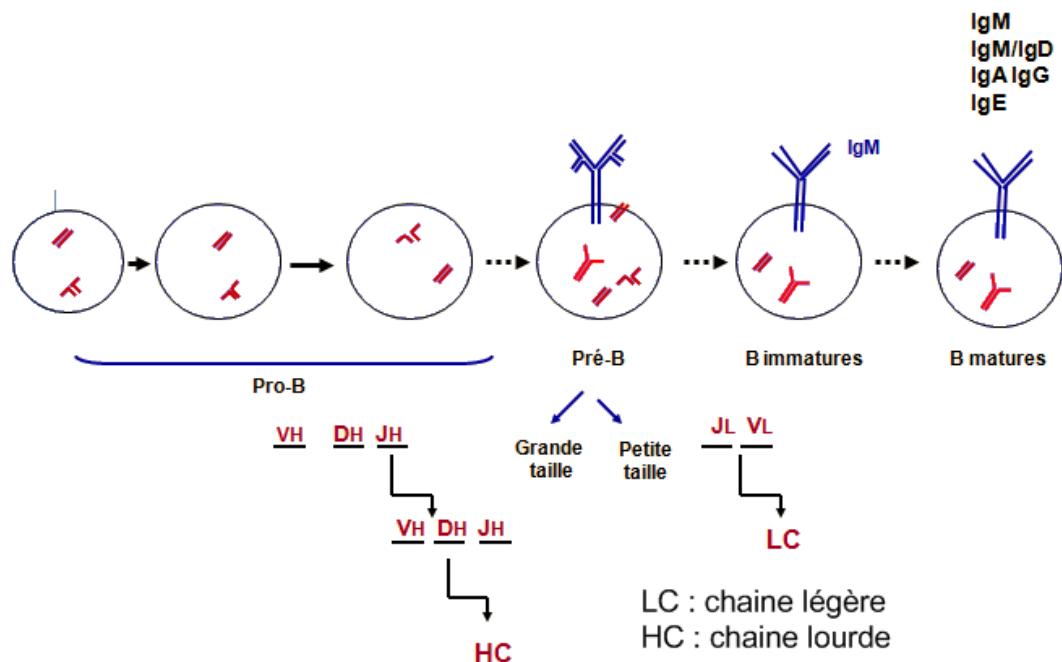


Figure 5 Etapes de différenciation lymphocytaire indépendante de l'antigène (d'après Pr Kaïs Lassoued, Inès Masmoudi. DCEM1 2010-2011 Immunologie Lymphocytes B : Marqueurs, différenciation et activation).

La perte d'expression du pré-BCR permet aux gènes RAG1 et RAG2 d'être à nouveau exprimés. Ils vont permettre un réarrangement VJ de la chaîne légère κ initialement. Si le réarrangement produit est fonctionnel, cette chaîne κ s'associera à la chaîne μ et la structure sera exprimée à la membrane pour former un BCR marquant le passage au stade de **lymphocyte B immature**. L'expression d'un BCR fonctionnel est le second point de contrôle de la lymphopoïèse B intramédullaire.

2.2.4. Le lymphocyte B immature

Le lymphocyte B immature est caractérisé par l'expression d'un BCR de nature IgM, son phénotype à ce stade est donc IgM+ IgD-. Les cellules B exprimant des BCR autoréactifs c'est à dire qui reconnaissent des antigènes du soi, subissent une sélection négative et vont être éliminées par apoptose (délétion clonale). Les lymphocytes B non autoréactifs seront libérés dans la circulation périphérique. S'ils n'interagissent pas avec l'antigène du soi, ces derniers seront orientés vers un état d'anergie ou subiront une ignorance clonale. Si les lymphocytes ont une faible affinité pour l'antigène du soi, ils vont développer un processus d'édition du BCR (« receptor editing ») qui est possible par un réarrangement secondaire sur l'allèle déjà réarrangé ou sur les autres allèles.

2.2.5. Le lymphocyte B transitionnel

Le lymphocyte B immature libéré dans la circulation périphérique est appelé lymphocyte B transitionnel précoce ou T1. Cette phase permet au lymphocyte B de devenir réceptif aux co-signaux des lymphocytes T helper lors de la réponse immunitaire et de stabiliser le signalosome du BCR.

Ces lymphocytes B T1 transitent tout d'abord par la pulpe rouge de la rate dont les nombreux macrophages permettent d'épurer les cellules B autoréactives apoptotiques. Ensuite ils pénètrent dans les follicules lymphoïdes spléniques de la pulpe blanche, riche en antigènes et lymphocytes T helper CD4+ (Th), et se différencient alors en lymphocytes B transitionnels tardifs ou T2. Ces lymphocytes B T2 se caractérisent par la coexpression d'une IgM et d'une IgD de surface et deviennent des lymphocytes matures naïfs.

2.3. Différenciation lymphocytaire B dépendante de l'antigène

Les lymphocytes B matures naïfs IgM+/IgD+ quittent la rate afin de rejoindre la circulation sanguine périphérique et les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions et tissus lymphoïdes associés aux muqueuses MALT). Ils vont alors se différencier soit en lymphocytes B folliculaires conventionnels impliqués dans les réponses humorales

dépendantes des lymphocytes T soit en lymphocytes B de la zone marginale impliqués dans les réponses humorales thymo-indépendantes.

2.3.1. Réponse immune T-dépendante

Le lymphocyte B naïf peut être activé par un antigène « T-dépendant » à l'extérieur du follicule. Cet antigène est présenté par une cellule dendritique (une cellule présentatrice d'antigène ou CPA, d'origine hématopoïétique) ou un macrophage qui activera en parallèle les lymphocytes Th CD4+. Le lymphocyte B activé via son BCR et les co-signaux du lymphocyte Th CD4+ présente une phase rapide de prolifération. La majorité des lymphocytes B activés vont directement se différencier en plasmocytes à courte durée de vie. Ce plasmocyte sécrète une IgM de faible affinité responsable de la réponse immune primaire contre l'antigène qui intervient rapidement après l'infection. Ensuite, d'autres lymphocytes B stimulés par l'antigène vont devenir des cellules fondatrices du centre germinatif (CG) ou cellules folliculaires (Figure 6).

Le CG est une structure interne au follicule dans laquelle le lymphocyte B va subir une intense phase de prolifération et dont la présence identifie un follicule secondaire (*i.e.* follicule réactionnel). Le CG est constitué d'une zone sombre et d'une zone claire. Le lymphocyte B stimulé est d'abord dirigé vers la zone sombre où il recevra de multiples co-signaux des lymphocytes Th CD4+ et des cellules folliculaires dendritiques. Il prolifère rapidement et devient un centroblaste. Dans cette zone, l'enzyme AID (« activation induced cytidine deaminase ») va contrôler le processus **d'hypermutations somatiques** qui correspond à l'introduction de mutations dans les régions variables des gènes de l'Ig permettant ainsi d'augmenter l'affinité de l'Ig pour l'antigène. Le centroblaste est ensuite dirigé vers la zone claire où il devient un centrocyte. Il peut alors subir un processus facultatif de **commutation de classe (CSR pour « class switch recombination »)**, également contrôlé par AID. Ce processus va permettre au lymphocyte d'exprimer un autre isotype (IgG, IgA ou une IgE) différente de l'IgM initiale afin d'adapter au mieux la réponse immunitaire.

Au final, le lymphocyte B ayant répondu à un antigène T-dépendant et ayant fait l'expérience du CG va pouvoir se différencier soit en lymphocyte B mémoire, capable de rester quiescent plusieurs années, soit en plasmocyte à longue durée de vie, producteur d'Ig spécifique de haute affinité pour l'antigène initial.

2.3.1. Réponse immune T-indépendante

Selon le type d'antigène, la réponse immune B peut se faire en dehors du CG et de manière indépendante du Th CD4+. Les lymphocytes B de la zone marginale sont particulièrement sensibles aux antigènes T-indépendants et plusieurs types de réponses sont possibles.

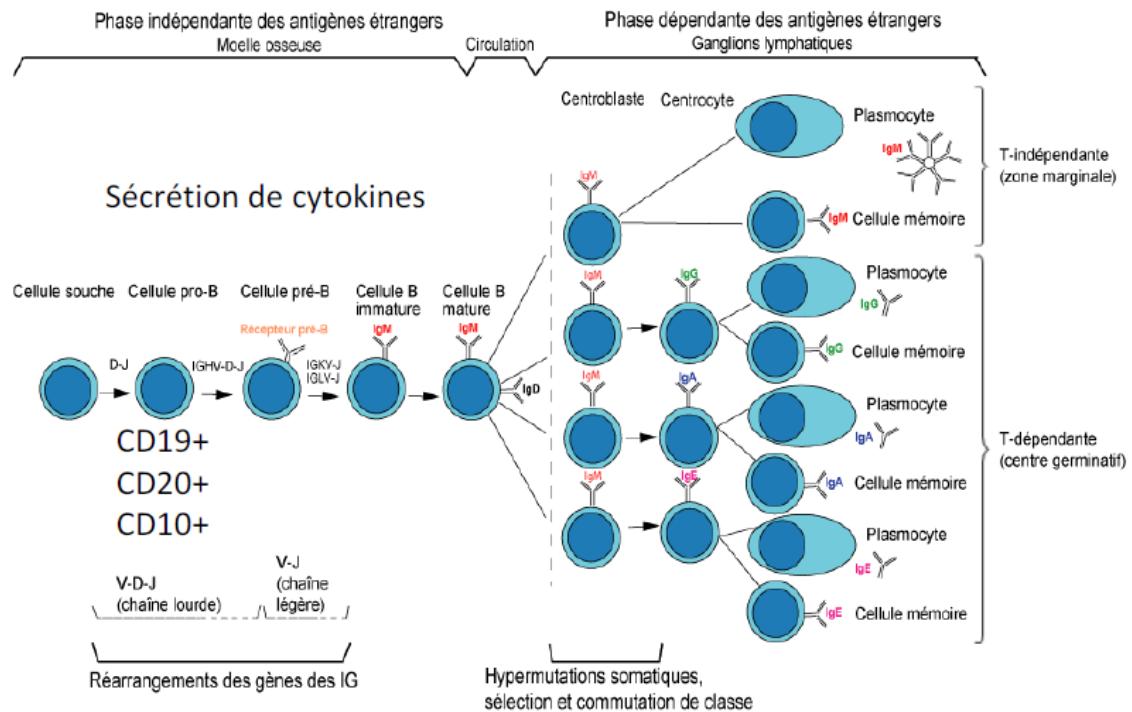


Figure 6 Lymphopoïèse B : de la cellule souche au lymphocyte B circulant (4)

III. LEUCEMIES AIGUES

LYMPHOBLASTIQUES B

1. Définition

Les leucémies aiguës (LA) de l'enfant représentent un groupe très hétérogène d'hémopathies malignes aiguës dues à la transformation oncogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH). Elle est caractérisée par une expansion clonale de précurseurs hématopoïétiques immatures. Selon l'origine du précurseur impliqué, précurseur de la lignée myéloïde ou lymphoïde (lignée B ou T), on distingue les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)(7).

Dans les LAL, le précurseur hématopoïétique lymphoïde appelé lymphoblaste perd sa capacité de maturation et de différenciation et reste bloqué à un stade immature. D'autre part la cellule acquiert une capacité de prolifération exacerbée ce qui va inhiber l'hématopoïèse normale et aboutir à une insuffisance médullaire. Cette expansion clonale est secondaire à l'accumulation de diverses mutations somatiques pouvant survenir sur plusieurs gènes impliqués notamment dans la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Cette prolifération de lymphoblastes peut se poursuivre dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) et infiltrer des organes extra-hématopoïétique (foie, testicules, système nerveux central...).

2. Epidémiologie

Les leucémies aiguës sont la première cause de cancer pédiatrique, elles représentent environ 31 % des cancers diagnostiqués avant l'âge de 15 ans (8) (Figure 7).

La LAL représente 80 % des leucémies chez l'enfant (9) et parmi ces dernières, 80% sont des LAL B dites communes.

L'incidence standardisée sur la population mondiale est de 1,9 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 1,2 chez la femme, soit un sexe ratio à 1,6. Le taux d'incidence spécifique par âge est de 3,8 pour 100 000 personnes-années chez le garçon de moins de 15 ans et 2,5 chez la fille de même âge (9).

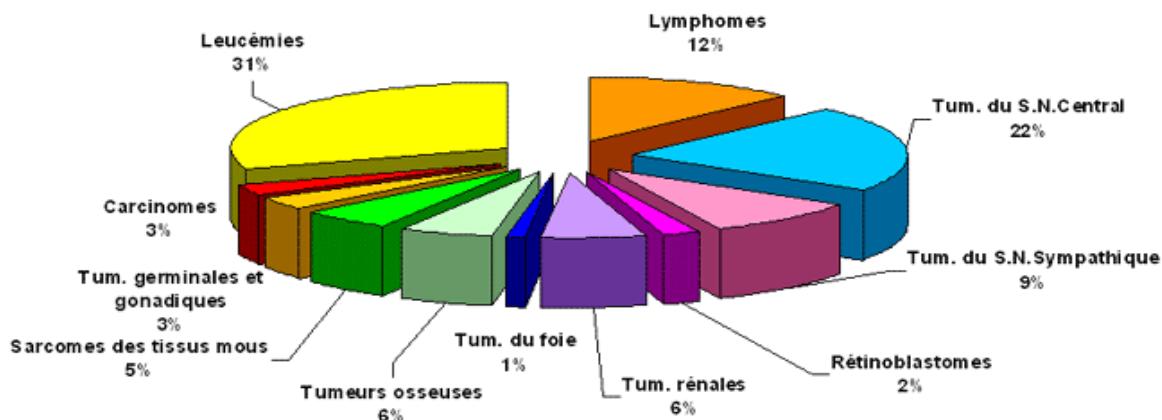


Figure 7 Répartition des différents cancers chez l'enfant entre 2 et 10 ans d'après le registre national des tumeurs solides de l'enfant (10).

La distribution des LAL B (Figure 8) décrit un pic maximum vers l'âge de 2-3 ans, plus marqué chez les garçons que chez les filles, et encore nettement visible un peu après 6 ans.

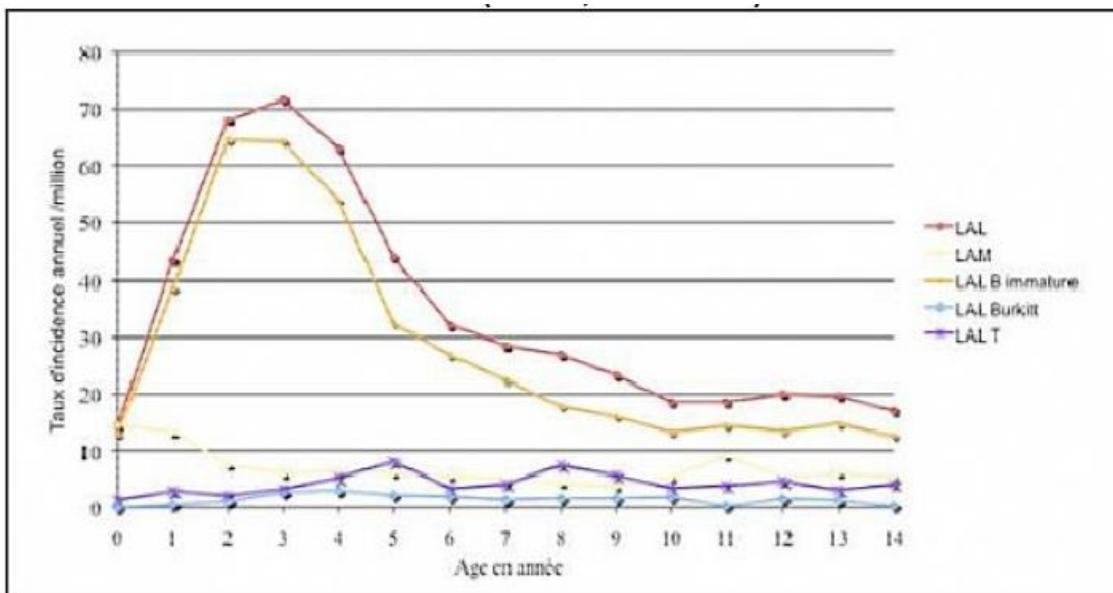


Figure 8 Taux d'incidence des leucémies aiguës selon l'âge en France (RNHE 2000-2004) ((11))

Le pronostic est meilleur chez l'enfant avec une survie à 5 ans de 90 % chez l'enfant alors qu'elle n'est que de 35 à 40 % chez l'adulte. On note une amélioration régulière de cette survie partout dans les pays occidentaux où les LAL B sont plus fréquentes et de meilleur pronostic que les LAL T(12).

Dans les LAL on observe une rémission complète dans plus de 95% des cas chez l'enfant, et entre 70 et 80% des cas chez l'adulte. Cependant, seuls 30 à 40 % des adultes et 80% des enfants présentent une survie à 5 ans sans rechute et sont considérés comme guéris(12).

En dépit de nombreuses améliorations en termes de prise en charge thérapeutique, la LAL reste une cause majeure de mortalité due aux cancers chez l'enfant. Elle représente en effet la deuxième cause de décès par maladie chez les enfants de 1 à 15 ans.

3. Facteurs de risques

3.1. Facteurs de risques établis

3.1.1. Facteurs de risques génétiques

Certaines anomalies chromosomiques constitutionnelles sont clairement associées à un risque accru de leucémie. Ainsi, avant l'âge de 5 ans, les enfants porteurs d'une trisomie 21 ont un risque environ 50 fois supérieur de développer une leucémie par rapport aux enfants de la population générale. Entre 2 et 3% des enfants atteints de leucémie sont porteurs d'une trisomie 21. De plus, certaines maladies génétiques rares sont associées à un risque élevé de LA telle que: l'ataxie-télangiectasie, la maladie de Fanconi (LAM), l'anémie de Diamond-Blackfan (LAM)(13).

3.1.2. Facteurs de risque iatrogènes

Le rôle des radiations ionisantes à forte dose est établi pour la plupart des cancers de l'enfant. L'exposition aux rayonnements ionisants est classée « cancérogène certain » par le Centre International de Recherche sur le Cancer (CIRC).

3.2. Facteurs de risques suspectés

3.2.1. Facteurs de risque infectieux

L'hypothèse d'une infection pouvant être associée à ce processus oncogène chez l'homme a été avancée compte tenu de l'origine virale des leucémies chez certaines espèces animales, de l'implication du virus d'Epstein-Barr dans la genèse du lymphome de Burkitt mais également le rôle de l'HTLV1 dans une forme rare de LAL-T (Japon et Caraïbes principalement). Cependant, aucun virus spécifique n'a jamais été mis en cause dans les leucémies de l'enfant ((11)).

3.2.2. Expositions à des toxiques

De nombreux autres facteurs de risques sont également suspectés dans la genèse des leucémies aiguës mais sans être pour autant établis formellement, c'est le cas des expositions au benzène, aux pesticides, au tabac.

4. Diagnostic clinique

La symptomatologie peut apparaître de manière insidieuse ou brutale et résulte de l'envahissement blastique.

Au moment du diagnostic, la moelle est généralement envahie par plus de 90 % de blastes. Cet envahissement peut être à l'origine d'une insuffisance médullaire se traduisant par l'atteinte d'une ou plusieurs lignées hématopoïétique (hématies, leucocytes et plaquettes). Différents syndromes cliniques seront associés aux cytopénies :

- Syndrome anémique : pâleur cutanéo-muqueuse, asthénie, dyspnée à l'effort
- Syndrome infectieux surtout si la neutropénie est profonde ($<0.5G/L$) : état fébrile avec classiquement des foyers pulmonaires ou des angines ulcéro-nécrotiques
- Syndrome hémorragique : purpura pétéchial et ecchymotique, hémorragies

Dans la majorité des cas, un syndrome tumoral lié à l'envahissement blastique extramedullaire sera mis en évidence. On peut retrouver des adénopathies superficielles ou profondes, une splénomégalie, une hépatomégalie, une atteinte méningée. Cette atteinte neuro-méningée est retrouvé dans 5 à 10% des LAL et constitue un facteur de mauvais pronostic. On peut également observer une infiltration testiculaire.

L'infiltration du système nerveux central bien que relativement rare, peut être à l'origine de signes neurologiques diffus ou focaux ; augmentation de la pression intracranienne (léthargie, vomissements, maux de tête), rigidité de la nuque (14).

Le syndrome tumoral peut se manifester par une masse médiastinale antérieur pouvant être à l'origine d'une détresse respiratoire sévère (concernant le plus souvent les LAL T) (14).

Enfin on observe plus fréquemment chez les enfants des douleurs osseuses et articulaires.

5. Diagnostic biologique

L'hémogramme est l'examen de première intention. Il permet de mettre en évidence une ou plusieurs cytopénies pouvant être associées à la présence de blastes circulants. **Un myélogramme** doit alors être réalisé. L'étude des cellules de la moelle osseuse après coloration au May-Grünwald Giemsa permet d'établir le diagnostic de leucémie aiguë lorsque le pourcentage de blaste est supérieur à 20% de l'ensemble des cellules hématopoïétiques. Une étude cytochimique pourra être réalisée en complément : la myélopéroxydase, elle sera négative dans le cadre d'une LAL.

L'immunophénotypage des cellules blastiques de la moelle osseuse (ou du sang) est indispensable afin d'affirmer la nature lymphoïde du blaste. Cette analyse permettra également de préciser le stade de maturation du lymphoblaste selon la classification de l'European Group for the Immunological characterization of Leukemia (EGIL). L'immunophénotypage comporte d'autres intérêts qui seront détaillés par la suite comme la mise en évidence de marqueurs aberrants, l'évaluation de la maladie résiduelle ainsi que l'adaptation de la stratégie thérapeutique en fonction de la présence de certains marqueurs (ex : traitement par Rituximab dans les LAL CD20+ (15)).

Cytogénétique conventionnelle

L'analyse cytogénétique correspond à l'étude des chromosomes après division cellulaire. Ainsi, le caryotype, après une étape de culture cellulaire permet d'obtenir des chromosomes bloqués en métaphase (Figure 9), dans le but de détecter des anomalies de nombre (hyperdiploïde ou hypodiploïde) ou de structure (délétion, translocation, inversion...). Une formule chromosomique est alors établie selon la nomenclature internationale ISCN (International System for Human Cytogenetic Nomenclature).

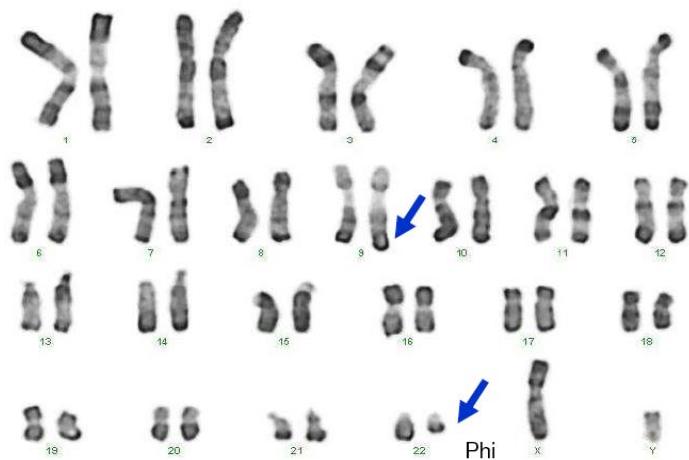


Figure 9 Caryotype illustrant une translocation (9;22) chez un patient atteint de LAL B PHI+ (caryotype : t(9;22)(q34;q11))

Cytogénétique moléculaire

La technique de FISH (Fluorescente *in situ* Hybridation) est complémentaire du caryotype car elle permet de mettre en évidence des anomalies non visibles au caryotype (anomalie dite cryptique). Cette technique est basée sur l'appariement d'une sonde couplée à un fluorochrome avec des régions chromosomiques données, grâce à la complémentarité des bases nucléotidiques, permettant une hybridation spécifique.

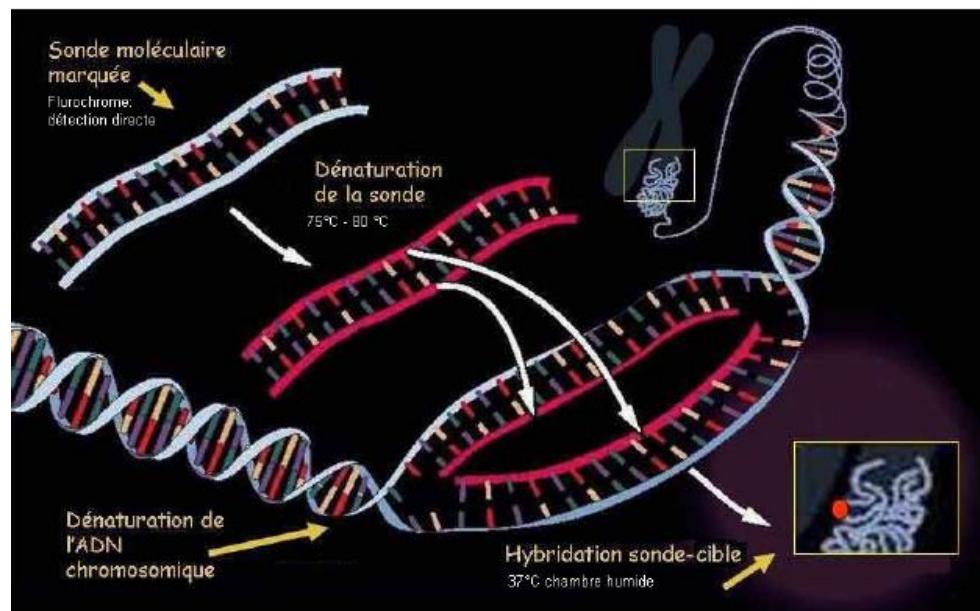


Figure 10 Principe de la FISH d'après C. Ozouf-Costas FISH cytogenetics .

Ces techniques de cytogénétique sont indispensables car la classification OMS 2016 se base sur la présence ou non de ces anomalies.

Biologie moléculaire

Dans le cadre des LAL-B, la biologie moléculaire va permettre de mettre en évidence des transcrits de fusion tels que le transcrit BCR-ABL ou AF4-MLL. On peut ainsi établir un diagnostic mais aussi réaliser un suivi de la maladie par quantification du transcrit.

Il existe un grand nombre de techniques en biologie moléculaire, la plus ancienne étant la RT-PCR (Reverse Transcription Polymérase Chain Reaction) qui suite à une reverse transcription (passage de l'ARN en ADNc) va permettre d'amplifier une séquence nucléotidique spécifique.

La RQ-PCR (« real time quantitative-PCR ») ou RT-PCR quantitative est une technique qui consiste à mesurer la quantité d'ADN polymérisé à chaque cycle (temps réel) grâce à un marqueur fluorescent.

D'autres techniques se sont développées comme la RT-MLPA (« Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification »), elle permet la recherche simultanée d'un grand nombre de transcrit de fusion. Cette technique utilise des oligonucléotides servant de demi-sonde afin de permettre à chacun d'entre eux d'avoir une multitude de partenaires (Figure 11). Cela présente un grand intérêt notamment pour les gènes multipartenaires notamment le gène MLL.

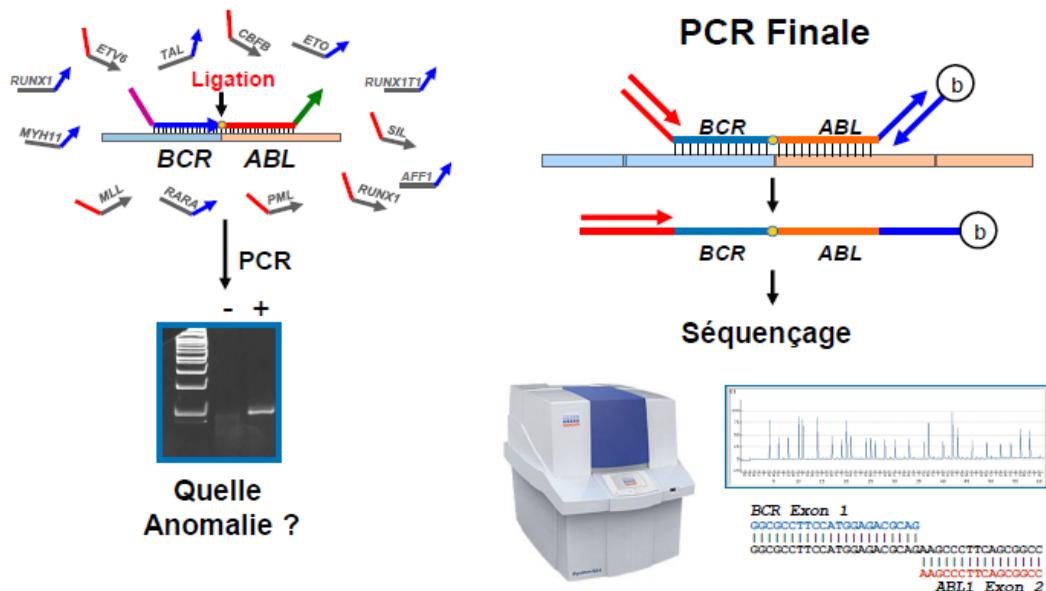


Figure 11 Principe de la RT-MLPA d'après P.Ruminy, Centre Henri Becquerel.

Enfin l'étude du réarrangement des gènes des chaînes lourdes et légères des immunoglobulines et du TCR permet d'affirmer le caractère clonal de la prolifération lymphoïde. Après un design d'amorces spécifiques de ces réarrangements, le suivi de la MRD pourra s'effectuer grâce à la détection de la clonalité.

6. Classification

6.1. Cytologique

La classification FAB (Franco-américano-britannique) a été établie en 1976, celle-ci se base sur les caractéristiques morphologiques et cytochimiques des cellules blastiques. Le premier élément de classification étant la nature myéloïde ou lymphoïde des blastes. Cette classification distinguait les LAL à petit lymphoblastes (LAL1), des LAL à grand lymphocytes (LAL2) et les LAL de type Burkitt (LAL3). Cette classification n'est plus utilisée aujourd'hui.

6.2. Immunologique

Une classification immunologique des leucémies aiguës a été établie en 1995 par l'EGIL. Celle-ci s'effectue par cytométrie en flux et repose sur l'immunophénotypage des cellules blastiques.

Les LAL de la lignée B sont caractérisées par la positivité de plusieurs marqueurs spécifiques de la lignée B présent tout au long de leur maturation, ce sont les marqueurs panB : CD19, CD79a et CD22. A l'inverse leur immunophénotype ne doit pas mettre en évidence de marqueurs myéloïdes (CD13, CD33, CD117) ou lymphoïde T (CD3). Cependant il arrive dans certains cas que le blaste exprime des marqueurs aberrants ou plusieurs phénotypes dans le cadre des LAL dites de phénotype mixte selon la classification OMS 2016, entité rare et de mauvais pronostic (16).

Une fois l'assignation du blaste à la lignée B, la classification selon l'EGIL va s'effectuer selon la positivité ou non de différents marqueurs qui se succèdent durant la période de maturation du lymphoblaste (Tableau 1).

Tableau 1 Classification des LAL B selon l'EGIL (17)

	CD19, c-CD79a	CD10	c-IgM	s-IgM
BI (pro-B)	+	-	-	-
BII (commune)	+	+	-	-
BIII (pré-B)	+	+/-	+	-
BIV (B mature)	+	+/-	+/-	+

6.3. Classification OMS

Cette classification établie par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 1999, révisée en 2008 puis en 2016, regroupe les principales anomalies cytogénétiques récurrentes ayant un facteur pronostique dans la classification des LAL-B (18).

Cette classification regroupe les leucémies aiguës, ainsi que les lymphomes lymphoblastiques pour lesquels la blastose est inférieure à 20% mais où le syndrome tumoral prédomine. Ces deux formes cliniques sont donc assimilés comme une seule entité d'un point de vue pronostic et thérapeutique.

Elle se divise en 2 classes : les LAL-B associées à des anomalies génétiques récurrentes (Tableau 2) et les LAL-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes.

Tableau 2 Classification OMS 2016 des LAL B avec anomalies cytogénétiques récurrentes (18).

Anomalie cytogénétique récurrente	Anomalie moléculaire correspondante	Pronostic	Lien avec la classification EGIL
t(9;22)(q34;q11.2)	<i>BCR-ABL1</i>	Défavorable	Toujours LAL BII 3% des enfants
t(v;11q23) principalement t(4;11)(q21;q23) et t(11;19)(q23;p13.3)	Réarrangement de <i>KMT2A (MLL)</i>	Défavorable	Souvent LAL BI 8 % des LAL-B de l'enfant dont 80 % des LAL-B si enfant <1an
t(12;21)(p13;q22)	<i>TEL-AML1</i>	Favorable	Très souvent LAL BII 25% enfants
Hyperploïdie	Absence	Favorable	Très souvent LAL BII 51 à 65 chromosomes 25% enfants
Hypoploïdie	Absence	Défavorable	23 à 43 chromosomes
t(5;14)(q31;q32)	<i>IL3-IGH</i> (conduisant à la surexpression d'IL3)	Défavorable	Très rare (<1%)
t(1;19)(q23;p13.3)	<i>TCF3-PBX1</i>	Favorable	Souvent LAL BIII 5% des enfants
Amplification intrachromosomique sur le chromosome 21 :iAMP21*	Absence	Défavorable	2% des enfants (surtout avec faible taux de leucocytes)
Translocation impliquant des tyrosines kinases ou des récepteurs de cytokines*	<i>BCR-ABL1-like*</i>	Défavorable	10 à 15 % des enfants

*Depuis 2016, la classification OMS intègre iAMP21 et *BCR-ABL1-like* comme deux nouvelles entités provisoires.

D'autres anomalies cytogénétiques non décrites dans cette classification montrent bien la complexité et la diversité dans le mécanisme de leucémogénèse et l'implication d'un grand nombre de facteurs génétiques (Figure 12).

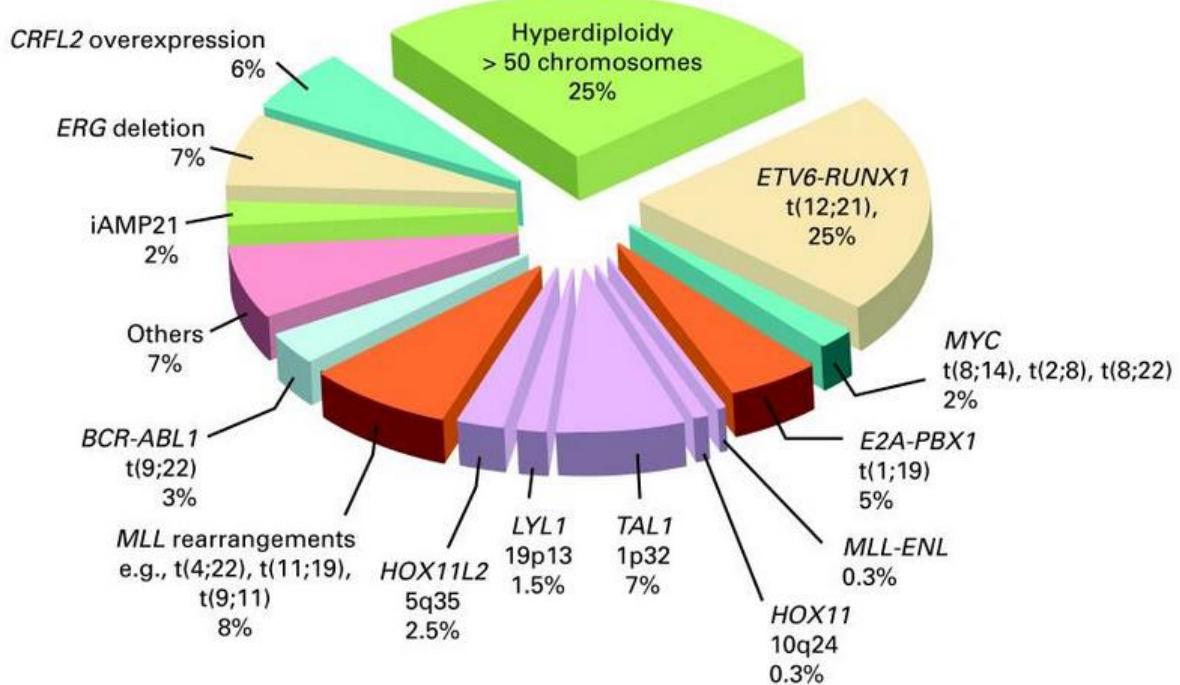


Figure 12 Estimation des fréquences des anomalies génétiques dans les LAL de l'enfant (en violet figure les anomalies exclusivement reliés aux LAL T) (19)

7. Pronostic

7.1. Facteurs liés à la maladie

7.1.1. L'âge

L'âge constitue l'un des facteurs pronostiques principaux dans la LAL. Il est intimement corrélé aux facteurs pronostiques liés à la maladie. La LAL de l'enfant est globalement considérée comme de meilleur pronostic que celle de l'adulte. Chez l'adulte, plus l'âge au diagnostic est élevé, moins le pronostic est favorable. En effet, les patients de plus de 50 ans ont un taux de survie à 3 ans de 20%. Chez l'enfant, les LAL survenant avant l'âge de 1 an ont un pronostic défavorable (taux de survie sans événement de 45%)(20).

On considère que les LAL sont de pronostic plus favorable entre 1 et 9 ans. Les LAL de l'enfant de plus de 10 ans sont souvent considérées comme à haut risque, du fait de caractéristiques qui se rapprochent de celles des adultes (21). A noter que l'âge de survenue d'une LAL est étroitement corrélé aux anomalies cytogénétiques ; en effet, les réarrangements de *KMT2A* (défavorables) sont essentiellement retrouvés avant 1 an, la fusion *BCR-ABL1* (défavorable) représente seulement 3% des LAL de l'enfant (30% des LAL de l'adulte) et les anomalies de bon pronostic (fusion *RUNX1-ETV6* et hyperdiploïdie) sont principalement retrouvées entre 1 et 10 ans.

7.1.2. Le syndrome tumoral

La présence d'un syndrome tumoral important au diagnostic est un facteur pronostique défavorable associé à un risque plus élevé de rechute (22). L'atteinte neuro-méningée est également considérée comme un facteur pronostic défavorable du fait de la plus grande difficulté de diffusion des chimiothérapies et d'un risque augmenté de rechute localisée. A chaque diagnostic doit être réalisé une ponction lombaire pour rechercher une éventuelle atteinte neuro-méningée qui se définit par la présence d'au moins 5 leucocytes/mm³ dont au moins un blaste. Ce diagnostic justifiera un schéma thérapeutique intensifié.

7.1.3. La leucocytose

La leucocytose initiale constitue un critère initial majeur de pronostic et permet de classer le patient dans un groupe de risque. Ainsi on définit le risque standard pour les patients avec une LAL B ayant une leucocytose initiale inférieur à 50 G/L. Ceux ayant une leucocytose supérieur à 50G/L appartiennent au groupe de haut risque (23). La leucocytose est donc un facteur pronostic évoluant de manière proportionnelle à son importance.

7.1.4. L'immunophénotypage

La classification entre LAL de la lignée B et T est indispensable sur le plan diagnostic mais ne constitue pas un facteur pronostic direct. En revanche on peut tout de même dire que les LAL de la lignée T, ont longtemps été considérées comme de moins bon pronostic chez l'enfant bien que certaines études récentes ne confirment pas cela (24).

En revanche, l'expression du CD 10 dans les LAL B est associée à un meilleur pronostic (inclusion dans le risque standard) en comparaison des LAL B sans expression du CD 10(25). Cependant l'expression du CD 10 ne constitue pas un facteur pronostic indépendant car son absence est associée à un réarrangement du gène MLL (26).

7.1.5. Les anomalies cytogénétiques et moléculaires

Les anomalies cytogénétiques détectées dans les LAL sont devenues un des éléments essentiels de la décision thérapeutique et de la stratification pronostique. En effet il est maintenant bien reconnu que ces anomalies cytogénétiques responsables de l'hétérogénéité des LAL ont une valeur pronostique indépendante des autres paramètres cliniques et biologiques (27).

La classification des LAL proposée par l'OMS en 2008 (actualisée en 2016) reflète cette importance en tenant compte des résultats de la cytogénétique lors du bilan diagnostic (Tableau 2).

Anomalies de structure de mauvais pronostic

Les patients atteints d'une de ces anomalies sont classés à risque élevé dans les protocoles et traités avec des thérapies plus intensives. D'une manière générale, la présence d'un caryotype complexe (>5 anomalies) est de pronostic défavorable.

a) Translocation t(9;22)(q34;q11.2) ou chromosome Philadelphie (Ph), fusion BCR-ABL1

La translocation *BCR-ABL1* est rare chez l'enfant avec une prévalence inférieure à 3%. Généralement ce sont des LAL-B communes (BII selon l'EGIL avec CD10+) avec l'expression d'un ou plusieurs marqueurs myéloïdes aberrants en CMF (CD13 ou CD33) (28). Cette translocation entraîne la création d'un gène de fusion impliquant le gène *BCR* sur le chromosome 22 et le gène *ABL1* sur le chromosome 9. Le réarrangement *BCR-ABL1* conduit à une dérégulation de l'activité tyrosine kinase d'*ABL1*.

Concernant la LAL B Phi+, le point de cassure du gène *BCR* sera dans 90% des cas dans la région minor Breakpoint Cluster (m-BCR) codant pour une protéine de 190 Kd et ayant des propriétés différentes des protéines de fusion que l'on retrouve dans les leucémies myéloïdes chroniques. En effet celle-ci stimule davantage la croissance des lignées lymphoïdes(29). Pour les 10% restant, la cassure se fera dans la région major Breakpoint Cluster M-BCR codant pour une protéine de 210 Kd.

La cytogénétique de la LAL Ph1 diffère de celle de la LMC non seulement par les points de cassure de *BCR* mais également par la fréquence plus importante des anomalies chromosomiques associées au Ph1 : trisomie 8, monosomie 7, trisomie 21, anomalie 9p, hyperdiploïdie (30). Ces anomalies additionnelles sont également plus fréquemment retrouvées dans les LMC en phase d'acutisation.

Au niveau moléculaire, les translocations chromosomiques donnent lieu à un réarrangement génique avec formation d'un gène hybride et synthèse d'un ARN messager chimérique. Ce transcrit chimérique mis en évidence par RT-PCR joue un rôle important : sa quantification

représente actuellement un facteur majeur dans le suivi de l'évolution de la maladie résiduelle dans le cas des LAL Phi+.

La recherche de cette anomalie est indispensable car elle peut permettre la mise en place d'une thérapie ciblée avec un inhibiteur de tyrosine kinase (ITK) comme l'imatinib associé à la chimiothérapie conventionnelle. Initialement considérées comme les LAL de pronostic très défavorable, l'instauration de ce nouveau traitement a permis une amélioration considérable de la survie chez les patients atteint de LAL Phi+(31).

b) *Translocation t(v;11q23), réarrangement MLL*

Ces translocations impliquent le gène *MLL* (mixed lineage leukemia), renommé récemment *KMT2A* (situé dans la bande chromosomique 11q23) et pour lequel plus de 120 partenaires ont été jusqu'ici identifiés (32).

Un réarrangement impliquant *MLL* est retrouvé dans 8 % des LAL-B de l'enfant avec un pic de fréquence chez le nourrisson (dans 80 % des LAL-B survenant avant l'âge de 1an)(28) expliquant le moins bon pronostic dans cette catégorie de population.

Ces LAL ayant un réarrangement *MLL* n'expriment qu'exceptionnellement le marqueur CD10, marqueur très précoce de la différenciation B, démontrant le caractère extrêmement précoce du blocage de la différenciation lymphoïde B. Ces LAL sont donc en général de type pro-B (BI selon l'EGIL) avec l'expression d'un ou plusieurs marqueurs myéloïdes et hyperleucocytaires(33).

Le pronostic, globalement défavorable, est dépendant de l'âge, et du partenaire du gène *MLL* en particulier très défavorable chez le nourrisson de moins de 6 mois avec une survie à 5 ans inférieure à 30% (33).

Seuls de rares événements additionnels ont été identifiés, aussi bien sur le plan cytogénétique que moléculaire, suggérant, avec le fait de l'existence de leucémies chez le

nourrisson, que les réarrangements *MLL* seraient un événement initiateur et suffisant dans le développement de la leucémie (32).

c) *iAMP21*

Il s'agit d'une amplification intrachromosomique du chromosome 21 (*iAMP21*), anomalie rare entraînant une augmentation du nombre de copies (amplification) du gène *RUNX1*, sur ce chromosome 21 que l'on peut détecter en FISH avec une sonde spécifique *RUNX1*.

Ces formes sont le plus souvent retrouvées chez le grand enfant (âge médian, 9 ans), dans des cas non hyperleucocytaires, Il s'agit d'une nouvelle entité dans la classification OMS 2016 qui est associé à un pronostic défavorable(34).

d) *Altération du gène IKZF1 (IKAROS)*

Le facteur de transcription *IKZF1* intervient tout au long de la différenciation hématopoïétique avec un rôle majeur dans la lymphopoïèse. Les altérations de ce gène seraient responsables d'un blocage de la maturation lymphoïde ; il est donc directement impliqué dans un rôle leucémogène. Il est ainsi indispensable de rechercher une altération de ce gène réalisée le plus souvent par RT-MLPA (méthode de référence).

Parmi les LAL Phi+ de l'adulte, les délétions d'*IKZF1* sont très fréquentes (80%) et identifient un sous-groupe de patients ayant un pronostic particulièrement péjoratif avec un taux de rechute très important. D'autre part, des altérations d'Ikaros (délétions, mutations) ont été identifiées dans 10 à 20 % des LAL-B de l'enfant et constituent un facteur pronostic péjoratif indépendant avec un risque de rechute ainsi qu'un risque de chimiorésistance augmentés (35).

e) LAL Ph-like ou BCR-ABL1-like

Cette entité a été récemment identifiée par son profil d'expression proche de celui des LAL Ph positive. Elle représente 10 à 15 % des LAL de l'enfant et 25 % des LAL du jeune adulte (36).

Ainsi elle est associée à un pronostic défavorable mais la possibilité d'utiliser des traitements ciblés de type ITK pourrait modifier ce pronostic. En effet, ces LAL ne présentent pas de chromosome Philadelphie mais des gènes à activité TK sont activés (ex : *CRLF2*, *EPOR*, *JAK2*, *PDGFRB*) soit par réarrangements (possibilité de détection par FISH) soit par mutation (37).

f) Translocation *t(5;14)(q31;q32)*, *IGH-IL3*

Il s'agit d'une entité rare (<1% des LAL) qui se caractérise par une hyperéosinophilie majeure liée à une hyperexpression du gène de l'IL3 (localisé en 5q31), facteur de croissance de la lignée éosinophile qui fusionne avec le locus IgH codant les chaînes lourdes d'immunoglobulines.

Anomalies de structure de pronostic favorable

a) translocation *t(12;21)(p13;q22)* *TEL-AML1* (anciennement *ETV6-RUNX1*)

Il s'agit de l'anomalie la plus fréquemment retrouvée dans près de 25% des LAL-B de l'enfant alors que les cas rapportés chez l'adulte sont plutôt rares (2%). Il s'agit d'une translocation cryptique à savoir indéetectable au caryotype. Le diagnostic se fait donc par biologie moléculaire ou par FISH. Elle est responsable de la fusion des gènes TEL et AML1.

Elles correspondent à un immunophénotype de LAL-B communes (BII selon l'EGIL) avec un marqueur myéloïde CD13 ou CD33 fréquemment associé. Elles sont classiquement associées à un pronostic favorable avec des taux de rémission complète supérieurs à 90%, cependant

des rechutes tardives existent avec une bonne réponse à la chimiothérapie. La présence d'anomalies cytogénétiques ou moléculaires surajoutées ne modifie pas ce bon pronostic (38).

b) t(1;19)(q23;p13.3) TCF3-PBX1

Elles représentent environ 5% des LAL-B de l'enfant. Il s'agit le plus souvent de LAL BIII dont elles représentent 25% des cas. Cette translocation entraîne la fusion des gènes TCF3 et PBX1 codant tous deux pour des facteurs de transcription. Il en résulte une protéine de fusion dans laquelle le domaine de liaison à l'ADN de TCF3 est remplacé par celui de PBX1 empêchant ainsi le développement du lymphocyte.

Le pronostic des LAL associées à cette translocation était initialement mauvais mais depuis l'intensification thérapeutique en pédiatrie, le caractère défavorable de cette anomalie semble avoir disparu.

Une autre translocation impliquant TCF3, t(17;19)(q22;p13), a été identifiée dans de très rares cas de LAL-B de l'enfant, conduisant à une fusion TCF3-HLF. Il s'agit d'une entité associée à une hypercalcémie et/ou à une coagulation intra-vasculaire disséminée au diagnostic et à un très mauvais pronostic (39).

Anomalie de nombre de chromosome (ou anomalie de la ploïdie)

a) Hyperdiploïdie

L'entité OMS « hyperdiploïdie » correspond à l'hyperdiploïdie élevée, de 51 à 65 chromosomes. Elle est retrouvée dans 25% des LAL de l'enfant (absent chez le nourrisson) et 7 % de celles de l'adulte. Les trisomies observées ne sont pas aléatoires et touchent préférentiellement les chromosomes 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21 ainsi que le chromosome X. Le pronostic associé à cette hyperdiploïdie est très favorable avec, chez l'enfant, un taux de

guérison supérieur à 90%. La sensibilité particulière des blastes de cette entité au méthotrexate est l'une des explications de ce bon pronostic (40).

b) Hypodiploïdie

L'OMS considère l'hypodiploïdie à partir de 43 chromosomes car elle est associée à un pronostic très défavorable, alors que l'hypodiploïdie 44-45 chromosomes n'a pas de valeur pronostique. L'hypodiploïdie de 23 à 43 chromosomes est rare, concernant de 1 à 5 % des patients enfants et adultes. On distingue la quasi-haploïdie (23 à 29 chromosomes) et l'hypodiploïdie sévère (30-39 chromosomes), toutes deux de pronostic très défavorable. Les profils chromosomiques ne sont pas aléatoires : la monosomie 7 est constante dans ce groupe (41).

7.2. Facteurs liés au traitement

7.2.1. La corticosensibilité/corticorésistance

La corticosensibilité est définie par une blastose circulante inférieur à 1 G/L après une semaine de corticothérapie et une injection intrathécale de méthotrexate seul. A l'inverse, la corticorésistance, de mauvais pronostic, est définie par un taux de blastes sanguins supérieur à 1 G/L à J8.

7.2.2. La chimiosensibilité/chimiorésistance

La chimiosensibilité, mesurant l'efficacité précoce du traitement, est un facteur pronostique du taux de rechute à court et à long terme. Son évaluation se fait sur la quantification du taux de blastes médullaires après 21 jours de traitement. Les patients ayant moins de 5% de blastes médullaires sont considérés comme chimiosensibles, tandis que les patients ayant plus de 5% de blastes sont chimiorésistants. Néanmoins, cet examen cytologique précoce reste peu sensible et peut s'avérer difficilement interprétable (moelle de richesse variable, présence de blastes de régénération).

7.2.3. La maladie résiduelle (MRD)

La maladie résiduelle est un outil incontournable pour l'évaluation pronostic. Elle permet de quantifier le nombre de cellules blastiques persistantes avec une meilleure sensibilité que l'examen cytologique. Pour cela 2 méthodes peuvent être utilisées à savoir la biologie moléculaire (RQ-PCR temps réel) et la cytométrie en flux qui seront décrites par la suite.

Le but est d'évaluer l'efficacité du traitement, si la rémission est complète ou non afin d'anticiper de façon précoce une rechute pour adapter rapidement la prise en charge. Ainsi de nombreuses études ont mis en évidence une corrélation significative entre le niveau de MRD et l'évolution clinique du patient (42)-(43). De même, il a été démontré que le taux de survie était significativement corrélé au taux de MRD obtenue : plus la MRD était faible (ou indétectable) plus les chances de survie étaient grandes (44)(Figure 13).

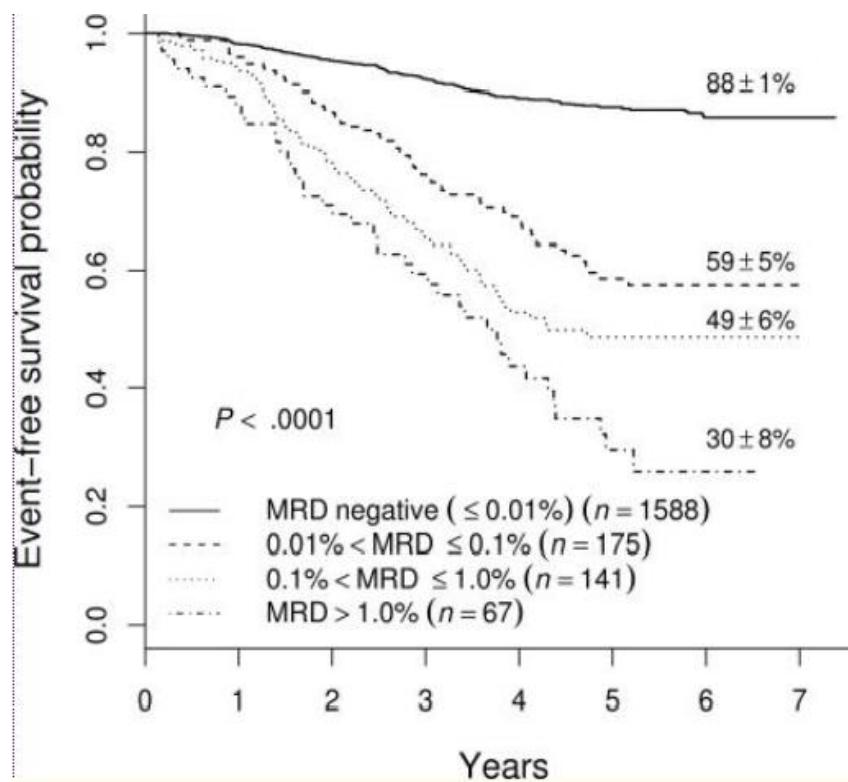


Figure 13 Taux de survie en fonction du taux de MRD obtenu après induction (44)

7.2.4. Le traitement

L'évolution des protocoles et l'amélioration de la prise en charge a permis une amélioration nette de la survie passant de 10 à 90% en 50ans.

Bien que le traitement dépende de nombreux paramètres, le schéma général comprend 5 étapes principales :

Une **préphase** par administration de corticoïdes durant 8 à 10 jours permettant de juger de la corticosensibilité ou non et qui va avoir pour effet de diminuer la masse tumorale.

L'induction visant à obtenir une rémission complète initiale qui consiste en l'administration d'une chimiothérapie pendant 2 à 4 semaines durant laquelle sont administrés généralement une anthracycline, (par exemple : daunorubicine), un alcaloïde de la pervenche (par exemple : vincristine), de la L-asparaginase et/ou cyclophosphamide et un corticoïde. Cette phase permet d'évaluer la chimiosensibilité des blastes, et d'évaluer la maladie résiduelle présente en post-induction, élément pronostic capital qui va orienter la suite du traitement : l'intensité du traitement et une éventuelle greffe de CSH. En cas d'échec du traitement d'induction, une chimiothérapie de rattrapage pourra être effectuée.

Une phase de **consolidation** de 2 à 3 mois où sont introduits d'autres molécules afin d'éviter l'émergence d'un clone leucémique résistant. Son but est d'éliminer les cellules blastiques résiduelles et donc de prévenir la rechute. Classiquement il s'agit de fortes doses de méthotrexate et de cytarabine et L-asparaginase.

Une à deux phases d'**intensification** retardées, qui correspondent à une seconde phase d'induction. Elle consiste à reprendre une chimiothérapie intensive en reprenant les molécules utilisées pendant les phases d'induction et consolidation.

Un traitement d'**entretien** de 18 à 24 mois qui repose sur l'association orale de 6-mercaptopurine (6-MP) quotidienne et de méthotrexate hebdomadaire, à laquelle peuvent s'associer des cures de chimiothérapie intermittentes de vincristine et de corticoïdes.

Parallèlement, un traitement prophylactique des atteintes méningées est réalisé par des injections intrathécales de méthotrexate et/ou une irradiation cérébrale.

Par ailleurs, ces traitements peuvent éventuellement être complétés d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques selon le pronostic de la maladie, l'évaluation de la maladie résiduelle et la capacité du patient à en supporter la forte toxicité.

Ces dernières années, la mise en évidence d'anomalies chromosomiques impliquant des gènes de tyrosines kinases, *BCR-ABL1* ou *BCR-ABL1-like*, permet de traiter les patients jusqu'alors difficiles à soigner. Le traitement repose sur l'administration de thérapies ciblées telles que des inhibiteurs de tyrosine kinases : l'imatinib ou le dasatinib en cas de transcrit de type *BCR-ABL1* ou le ruxolitinib en cas de mutation *JAK2*, en association à la chimiothérapie conventionnelle.

IV. La maladie résiduelle

1. Définition et concept

L'objectif du traitement de la leucémie est d'éradiquer l'ensemble des cellules blastiques afin d'obtenir une rémission complète (RC) et sans rechute.

La rémission cytologique complète se définit par la présence de moins de 5% de blastes leucémiques sur le myélogramme et l'absence de leucémie extramédullaire. Elle est le reflet d'une diminution du nombre de cellules leucémiques correspondant au passage de 10^{12} ou plus de cellules au diagnostic à 10^{10} ou moins en post induction (Figure 14). Ainsi lorsque le patient est en RC, il peut persister jusqu'à 10^9 à 10^{10} cellules tumorales sans qu'elles ne soient visibles en cytologie.

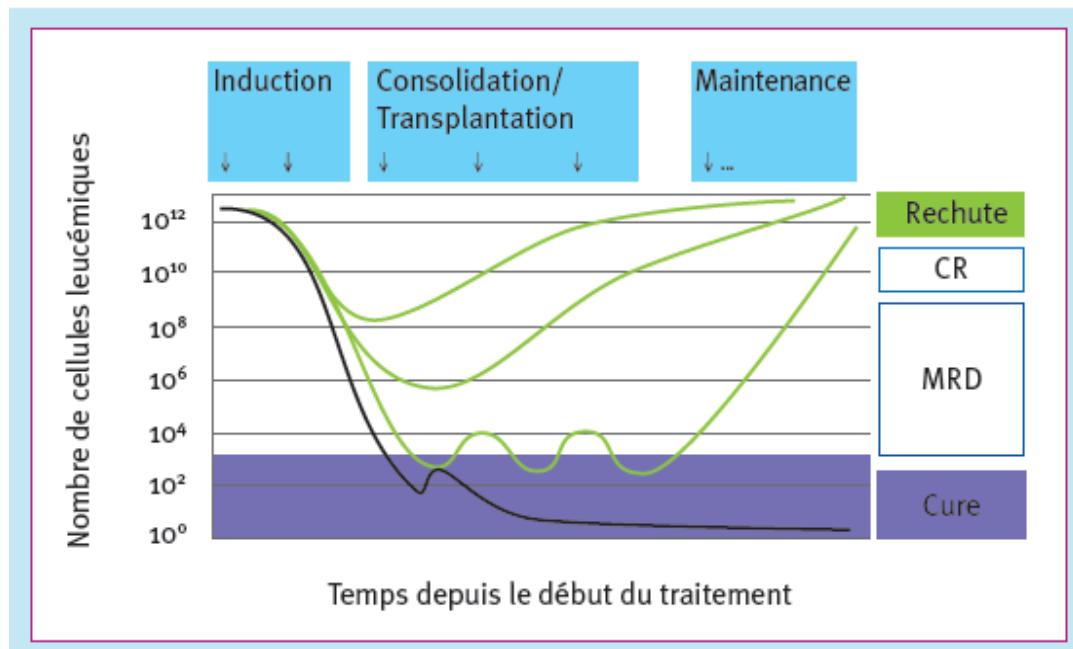


Figure 14 Evaluation schématique de la masse tumorale en fonction de la réponse au traitement (45)

Devant la faible sensibilité des techniques cytologiques, il a été nécessaire de développer une analyse beaucoup plus sensible : la Minimal Residual Disease (MRD).

La MRD est ainsi définie comme la persistance d'un contingent de cellules leucémiques ayant survécu à la chimiothérapie et présentes en nombre inférieur au seuil de détection des méthodes de cytologie classique.

Ainsi les objectifs de l'évaluation de la maladie résiduelle seront d'évaluer individuellement l'efficacité du traitement, de prédire l'évolution ultérieure de la maladie et ainsi d'adapter la stratégie thérapeutique.

2. Intérêt clinique

La majorité des patients obtiennent une rémission complète suite à la chimiothérapie d'induction mais 20 à 30% des enfants atteint de LAL vont rechuter. Les rechutes sont liées à la persistance de cellules leucémiques qui peut s'expliquer par le fait que certaines de ces cellules ont subi des altérations moléculaires lors de l'introduction de la chimiothérapie. L'autre possibilité pouvant expliquer la rechute étant la résistance intrinsèque de certaines cellules, en effet il peut exister une hétérogénéité phénotypique importante d'un ou plusieurs sous-clones leucémiques. L'évaluation de la MRD est donc indispensable dans le but de prédire le risque de rechute précoce.

De nombreux facteurs pronostics tels que l'âge, la leucocytose et plus récemment les anomalies cytogénétiques/moléculaires ont été utilisés pour établir des groupes de risque (faible, intermédiaire, haut) afin d'adapter la thérapeutique mais aucun d'entre eux ne prend en compte le risque individuel (données pharmacogénétiques, données pharmacodynamiques de l'hôte, réponse immune vis-à-vis des cellules cancéreuses...).

Ainsi la MRD est un outil de bonne sensibilité pour l'évaluation du pronostic individuel de chaque patient. En effet de nombreuses études ont montré que le niveau de MRD étaient significativement corrélé avec le risque de rechute précoce (46)-(47) (Figure 15). Une MRD positive est donc un facteur de mauvais pronostic et un facteur prédictif de rechute tandis qu'une MRD non détectable est prédictif d'un meilleur taux de survie (48). La MRD constitue un facteur pronostic permettant d'identifier des sous-groupes de patients au sein des groupes constitués en fonction des facteurs pré-thérapeutiques conventionnels au moins pour les LAL non PHI (42). En effet, une LAL de risque standard présentant une MRD positive sera considéré à haut risque ou à l'inverse, une LAL de haut risque initiale avec une MRD négative aura un risque de rechute faible. Cela démontre le fait que la MRD est un facteur pronostic puissant et indépendant des autres paramètres.

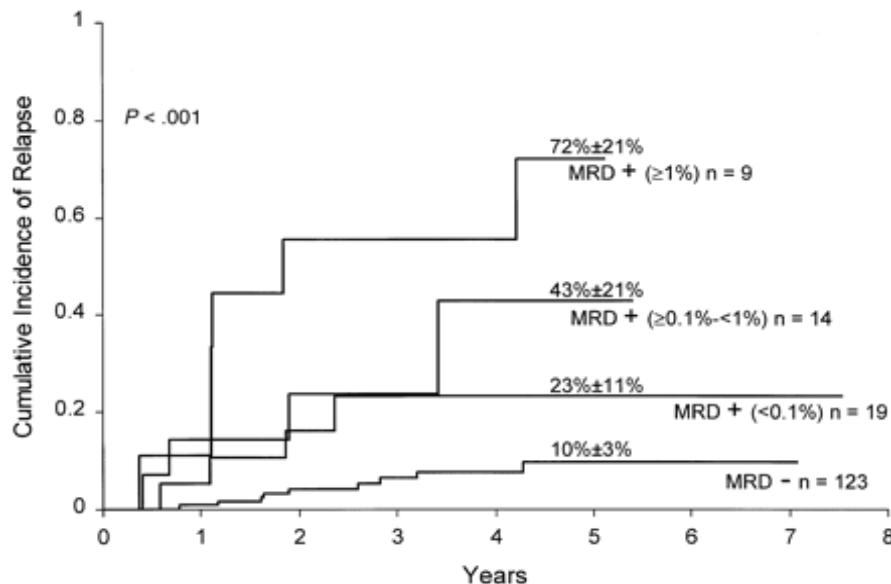


Figure 15 Incidence cumulée des rechutes selon les taux de MRD chez des enfants atteints de LALB en post induction (49)

La MRD peut être évaluée à différentes périodes du traitement pour lequel l'intérêt clinique sera différent :

- En post-induction, elle permet d'apprécier la réponse thérapeutique précoce et d'améliorer la survie globale des patients en ajustant leur traitement. Ainsi les patients avec une MRD positive auront une intensification de leur schéma thérapeutique : dose de chimiothérapie plus importante ou plus fréquente, molécule plus puissante afin d'éviter les rechutes (50).
- Durant les phases de consolidation et d'entretien, elle permet de détecter les rechutes de manière précoce.
- En pré-greffe, elle permet de choisir le moment idéal pour effectuer la transplantation car c'est un facteur prédictif très important de l'issue de la greffe. La valeur de cette MRD a un impact pronostic important en terme de survie, les patients avec une MRD pré-greffe positive ayant un risque plus important de rechute. En conséquence, des lignes supplémentaires de chimiothérapie peuvent être entreprises afin de réduire au maximum le taux de MRD avant la greffe(51).
- En post-greffe, elle permettra de juger de l'efficacité de la transplantation et d'évaluer le risque de rechute, car le niveau de MRD en post greffe est corrélé de manière significative avec le risque de rechute (52).

3. Méthode de détection de la MRD

L'objectif de l'évaluation de la MRD va être d'identifier une population blastique présente en faible quantité, pour cela il va falloir mettre en évidence des caractéristiques spécifiques de la cellule tumorale présentes au diagnostic et qui perdurent après la mise en place du traitement de façon à pouvoir les suivre aux différents points de traitement. La technique de MRD doit répondre à différents paramètres techniques :

- Une bonne sensibilité d'au moins 10^{-4} (au moins une cellule détectable parmi 10 000 cellules normales).
- Une bonne spécificité vis-à-vis du clone tumorale afin d'éviter les faux positifs.
- Une utilisation applicable chez le plus grand nombre des cas.
- Une bonne stabilité dans le temps, ce marqueur doit être présent à la rechute afin d'éviter les faux-négatifs.
- Une quantification possible et précise.
- Une bonne reproductibilité inter-laboratoire pour permettre la réalisation d'essai multi-centrique.
- Un délai de rendu de résultat rapide pour permettre une prise en charge clinique adaptée.

Le choix de la technique va dépendre du type de LA et des marqueurs de suivi possible de la maladie.

3.1. La cytométrie en flux

L'immunophénotypage cellulaire par cytométrie en flux (CMF) est indispensable dans le diagnostic des leucémies aiguës car celui-ci contribue à la caractérisation précise du clone leucémique en déterminant l'appartenance à une lignée cellulaire et en décrivant son stade de maturation. Celui-ci est également utilisé pour le suivi de la maladie, il est basé sur l'identification d'un profil immunophénotypique exprimé par les cellules leucémiques différent de celui des cellules normales.

3.2.1. Principe de fonctionnement d'un cytomètre en flux

La cytométrie en flux permet d'effectuer une analyse multiparamétrique de cellules individualisées, en fonction de ses propriétés physiques (taille et structure) et des antigènes présents à leur surface ou dans leur cytoplasme.

Le fonctionnement d'un cytomètre en flux est basé sur la combinaison de trois systèmes :

- la fluidique : ce système de distribution de l'échantillon va entraîner les cellules contenues dans l'échantillon et permettre un flux unicellulaire au niveau des lasers
- l'optique : de la source d'émission à la récupération des signaux lumineux.
- l'électronique : conversion des signaux optiques en signaux électriques proportionnels, puis l'informatique pour les numériser et en faire une analyse sur ordinateur.

Le **système de distribution** de l'échantillon consiste en un système de fluide sous pression, qui a pour but de diriger l'échantillon (cellules ou particules), dans un flux et un courant soigneusement contrôlé, qui coupe un faisceau laser. Les cellules vont défiler une par une devant le faisceau grâce au principe de focalisation hydrodynamique. Pour réaliser ce flux, une pression est appliquée sur le liquide de gaine et sur l'échantillon. Le liquide de la gaine subit une accélération progressive ce qui entraîne un étirement du liquide de l'échantillon et ainsi l'alignement des cellules au centre du jet pour permettre le défilement rapide et centrée des cellules dans le flux (53).

Le **système optique** intervient à deux niveaux : l'excitation et l'émission. L'excitation se fait à partir de lasers associés à des lentilles permettant de focaliser le faisceau sur le flux cellulaire. Les lasers présentent la propriété d'être puissant, stable, et monochromatique (émet à une seule longueur d'onde). La présence de plusieurs lasers permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques spectrales différentes.

Lorsque les cellules circulant dans la veine liquide sont frappées par le faisceau laser, elles émettent des signaux lumineux qui vont permettre l'analyse de différents paramètres :

a) La taille de la cellule ou FSC « Forward Scatter Channel »

La diffusion dépend des propriétés physiques de la cellule : taille et complexité de sa structure interne (membrane cellulaire, noyau, granulations). Une partie de la lumière est diffusée dans l'axe du laser, on parle de diffusion aux petits angles ou «FSC » qui est proportionnelle à la taille de la cellule

b) La structure de la cellule ou SSC « Side Scatter Channel »

Le faisceau laser traverse la cellule et subit des phénomènes de réflexion et de réfraction à chaque interface intracellulaire (membrane nucléaire, organites, ...). On parle de diffusion aux grands angles ou SSC. Le signal est proportionnel à la complexité du contenu cellulaire ou « granulosité ». Il donne des indications sur la structure interne des cellules analysées.

La taille et la structure de la cellule sont deux paramètres analysés liés aux propriétés optiques intrinsèques des cellules et sont indépendants des anticorps utilisés. Ils vont permettre de réaliser un fenêtrage sur la population cellulaire d'intérêt appelé « gating ».

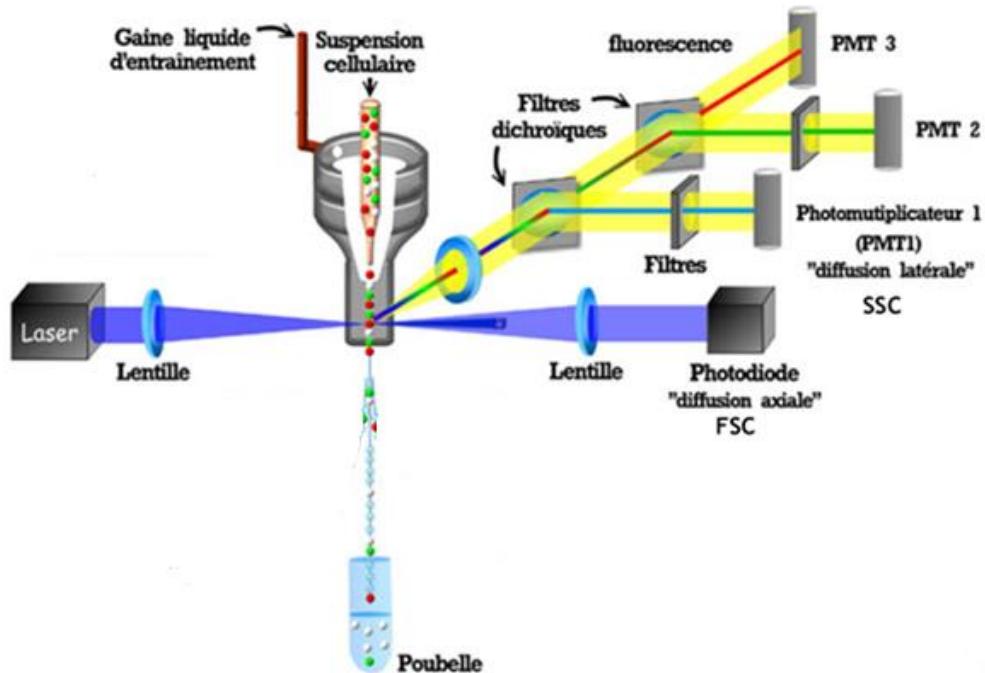


Figure 16 Représentation schématique d'un cytomètre d'après V. Fraisier Spencer Brown ISV.

c) La fluorescence

En cytométrie, le phénomène de fluorescence est utilisé pour distinguer les différentes sous-populations cellulaires. Ces populations sont caractérisées par des marqueurs antigéniques de surface ou intracellulaires, reconnus par des anticorps monoclonaux couplés à des fluorochromes. La quantité de fluorescence émise par la cellule est proportionnelle à la quantité de fluorochromes portée par la cellule analysée et donc du nombre de sites antigéniques. La fluorescence émise est mesurée perpendiculairement à l'axe du faisceau exciteur, comme le SSC.

Les fluorochromes sont des substances capables, quand elles reçoivent un rayonnement incident d'une certaine longueur d'onde (la longueur d'onde d'excitation), d'absorber cette lumière incidente (on parle de spectre d'absorption, propre à chaque molécule) et de réémettre une radiation de longueur d'onde supérieure (longueur d'onde d'émission) lors du retour à l'état de repos (état fondamental). C'est cette transition de niveau énergétique

qu'on appelle la fluorescence. Les différentes longueurs d'onde émises par un fluorochrome constituent son spectre d'émission.

Ainsi le fluorochrome est définis par sa longueur d'onde d'excitation qui doit correspondre à la longueur d'onde d'émission du laser et par son spectre d'émission qui doit pouvoir être détecté par les photomultiplicateurs. Il est donc possible d'utiliser simultanément plusieurs fluorochromes si les longueurs d'onde d'émission sont suffisamment différentes.

Méthode de détection

Les signaux lumineux émis sont collectés et convertis en signaux électriques par des photomultiplicateurs ou une photodiode. Le SSC et la fluorescence sont dirigés vers des photomultiplicateurs (PMT), perpendiculairement au faisceau exciteur, tandis qu'une photodiode collecte le FSC dans l'axe du faisceau. L'ensemble de ces signaux ont subi au préalable une sélection en étant dirigé vers les détecteurs appropriés via un système de miroirs dichroïques et de filtres optiques. La spécificité d'un détecteur pour un fluorochrome est ainsi obtenue via ces filtres, placés devant le PMT, qui n'autorisent le passage que d'une étroite bande de longueurs d'onde.

Lorsque les photons atteignent le PMT ils sont convertis en un nombre proportionnel d'électrons, qui sont multipliés pour générer un courant électrique plus important. Ce courant est ensuite amplifié de manière linéaire de façon à être compris entre 0 et 10V. Pour qu'il y ait traitement du signal par l'électronique, on définit un seuil ou « threshold », de manière à ce que seuls les signaux d'intensité suffisante (supérieure au seuil) soient analysés permettant ainsi d'éliminer les débris (53).

Les signaux électriques qui dépassent ce seuil de discrimination sont converties en valeurs numériques proportionnelles grâce au convertisseur analogique-digital. A chaque valeur numérique correspond un canal dont le compteur est incrémenté du nombre d'événements produisant un signal d'intensité identique. Le tracé du nombre d'événements par canal est appelé histogramme monoparamétrique.

Les histogrammes obtenus représentent l'ensemble des évènements acquis : les leucocytes mais aussi les débris, les plaquettes et les globules rouges mal lysés. Pour s'affranchir de ces derniers et ne considérer que les leucocytes, on réalise un conditionnement sur ces cellules en les entourant d'une fenêtre : on parle de fenêtrage ou «gating». Cela permet d'éliminer les autres populations et évite les interférences éventuelles. Il faut ensuite individualiser les différentes sous-populations leucocytaires à l'aide des paramètres taille, structure et fluorescence.

3.2.2. Applications à l'évaluation de la maladie résiduelle

La recherche de la maladie résiduelle en cytométrie en flux repose sur l'identification et la quantification de cellules qui vont présenter le même immunophénotype que les blastes du diagnostic. Il n'existe pas de marqueur antigénique spécifique des cellules leucémiques en revanche, elles expriment de façon aberrante certains marqueurs, créant ainsi un immunophénotype aberrant spécifique du clone leucémique. Ces immunophénotypes aberrants sont retrouvés dans la littérature sous le terme de « Leukemia-associated aberrant immunophenotypes » (LAIP) ou Leukemia-associated phenotypes » ou LAP (54). On distingue différents sous-types de LAIP :

- Le niveau d'intensité d'expression de marqueurs antigéniques peut différer par rapport à l'expression physiologique d'un antigène : par exemple, les CD10, CD58, CD123 peuvent être surexprimés par les lymphoblastes B et les CD45, CD38, CD81 peuvent avoir une expression diminuée.
- L'asynchronisme d'expression d'antigènes : certains marqueurs ne sont exprimés qu'à un stade de différenciation pendant le développement cellulaire normal. Exemple : co-expression du CD34 en tant que marqueur d'immaturité, avec le CD20, marqueur de maturité du lymphocyte.
- L'infidélité de lignée : elle correspond à l'expression concomitante de marqueurs associés physiologiquement à des lignées différentes par exemple, un blaste lymphoïde présentant des marqueurs myéloïdes tels que le CD13 ou le CD33.
- La perte d'expression totale d'un marqueur antigénique, on parle de trou phénotypique tel que la perte du CD33 sur les blastes myéloïdes

- La modification des paramètres morphométriques (graphe taille structure aberrant)

Pour déterminer ces LAIP, il faut recourir à une analyse multiparamétrique de la population blastique afin d'associer les anomalies rencontrées pour identifier avec une meilleure fiabilité la population blastique.

Utiliser cette approche pour suivre la MRD requiert la connaissance de l'expression des différents antigènes des cellules normales à chaque stade de maturation mais aussi pendant une chimiothérapie ou encore lors de la phase de régénération médullaire. D'autant plus, que ces LAIP peuvent être présent dans une moelle normale mais en quantité très faible. Il convient donc de définir des seuils pathologiques pour chaque type de LAIP.

La recherche de la maladie résiduelle repose donc sur l'identification d'un groupe de cellules présentant les mêmes LAIP que les blastes du diagnostic : elle consiste à définir le nombre de cellules résiduelles présentant le LAIP parmi les cellules totales (cellules CD45 positives). Sa sensibilité dépendra du nombre de cellules disponibles pour l'analyse, elle est en général aux alentours de 10^{-4} (55).

3.2.3. Limites de la technique

La CMF permet une analyse quantitative rapide pouvant analyser jusqu'à 10 000 cellules par seconde mais avec une moyenne de 2000 cellules par seconde soit un temps d'analyse moyen compris entre 15 à 20 minutes et avec une sensibilité aux alentours de 10^{-3} et 10^{-5} .

Il s'agit d'une analyse multiparamétrique qui doit faire face à différentes difficultés :

Identification : problème de spécificité

- Le choix des fluorochromes : ils doivent être sélectionnés individuellement sur la base de leurs caractéristiques propres, mais aussi de leur compatibilité avec les autres marqueurs et avec l'instrument utilisé (longueur d'onde d'émission du laser). En effet il faudra éviter au mieux le phénomène de chevauchement spectral car un chevauchement spectral se produit lorsque le signal lumineux émit par un fluorochrome déborde dans le canal de détection qui est sensé enregistrer le signal émis par un autre fluorochrome. Ceci produit parfois une fausse réponse positive. Bien qu'il soit possible d'éliminer de tels résultats en supprimant le signal électroniquement (selon un procédé appelé compensation), il est recommandé de l'éviter et/ou le minimiser. Cela implique un choix de fluorochromes ayant des spectres d'émission les plus fins possibles et les plus éloignés les uns des autres. L'autre élément important dans le choix des fluorochromes est l'indice de coloration (ou rendement quantique de fluorescence) : il est préférable d'utiliser un fluorochrome avec un indice de coloration faible pour mesurer des paramètres à concentration élevée et un fluorochrome avec un indice de coloration élevé pour mesurer des paramètres à concentration faible (56).
- LAIP insuffisamment informatifs : les blastes peuvent présenter un phénotype proche des hématogones. Si tel est le cas il sera très difficile de les différencier et donc de déterminer si le patient rechute ou s'il s'agit d'un processus physiologique.
- Modulations antigéniques : il est possible qu'une partie des blastes après un traitement d'induction par exemple, subissent une modification de leur immunophénotype initiale rendant le suivi plus difficile (switch phénotypique)(57).
- Hétérogénéité phénotypique/ clonale de la tumeur : la chimiothérapie peut provoquer l'émergence d'un sous-clon résistant au traitement et non visible au diagnostic initial.

Quantification : problème de sensibilité

- Qualité du prélèvement : la fiabilité de la réponse va être directement dépendante de la sensibilité obtenue et donc de la richesse du prélèvement. En effet lors de la réalisation du myélogramme, il est important de ne pas prélever une trop grande quantité car il y a un risque d'obtenir un prélèvement hémodilué et donc moins représentatif de la composition médullaire. L'autre point important va être le délai pré-analytique qui doit être le plus faible possible car l'analyse est réalisée sur des cellules dont le temps de viabilité dans le tube reste faible.
- Nombres d'évènements acquis peut être insuffisant : pour affirmer la présence d'une population, il faut un minimum de 20 évènements acquis, ce qui signifie que pour atteindre une sensibilité de 10^{-5} il faut analyser un minimum de 2 millions de cellules.

Réglages du cytomètre :

La qualité de l'analyse est directement dépendante des réglages de l'automate (exemple : voltages des PMT). Les lasers sont relativement fragiles et les systèmes fluidiques sont exposés au bouchage et à l'instabilité du flux : la maintenance de ces appareils est indispensable.

3.2. La biologie moléculaire

L'identification des cellules leucémiques en biologie moléculaire repose sur la mise en évidence d'une propriété intrinsèque au clone leucémique. Il s'agit d'une signature nucléotidique qui les différencie des cellules normales permettant ainsi de suivre en MRD ce clone. On distingue trois principales catégories :

- Le réarrangement clonal des gènes codant des récepteurs aux antigènes
- Les points de cassure des sites de translocation et les transcrits de ces gènes de fusion. Exemple : suivi des LA Phi+ avec le transcrit de fusion *BCR-ABL* par RQ-PCR
- Les gènes mutés ou exprimés de façon aberrante. Exemple : suivi par RQ-PCR du gène *NPM1* dans les LAM.

3.3.1 Evaluation de la MRD par étude des réarrangements des gènes codant pour les TCR et les immunoglobulines

Les gènes IGH et TCR sont constitués de groupes de segments V, D et J qui subiront des réarrangements lors de la phase précoce de différenciation lymphoïde comme nous l'avons vu précédemment. Ce phénomène de recombinaison aléatoire implique des délétions ou insertions de nucléotides, créant un segment génique unique, propre à une cellule lymphocytaire et à ses «descendants».

Les différentes combinaisons VDJ obtenues créent chez l'individu sain une population lymphocytaire polyclonale.

Les lymphoblastes retrouvés dans les LAL B dérivent de la transformation clonale d'un même précurseur lymphoïde, ainsi ils présenteront les mêmes réarrangements de gènes, permettant d'affirmer la clonalité de la population. Ainsi il est nécessaire de mettre en évidence la clonalité d'une population blastique et de caractériser les réarrangements pour pouvoir suivre ce clone aux différents points de traitement. Les réarrangements impliquant

les gènes IGH ou TCR surviennent chez plus de 90 % de patients atteints de LAL B (58) ce qui en fait une méthode applicable au plus grand nombre.

L'analyse par PCR des gènes codant les Ig et le TCR permet de détecter 1 cellule leucémique parmi 10 000 à 100 000 cellules normales, soit une sensibilité de 10^{-4} à 10^{-5} . L'amplification par PCR en temps réel des gènes des Ig et des TCR est une méthode fiable et précise pour mesurer la MRD. En effet, chaque cellule n'ayant qu'une copie du gène réarrangé, les produits de PCR sont donc directement proportionnels au nombre de cellules leucémiques. Ce système utilise une amorce et une sonde TaqMan situées sur les régions constantes des segments V et une amorce allèle spécifique (ASO) complémentaire de la région jonctionnelle des réarrangements V(D)J (région CDR3). La mesure de la fluorescence, proportionnelle à la quantité d'amplicons générés à chaque cycle de PCR, permet la quantification du nombre de cibles initiales dans l'échantillon. L'analyseur de fragment permet de visualiser les amplicons sous forme de pics d'intensité de fluorescence.

Une fois le réarrangement identifié, des amorces et une sonde spécifique du réarrangement sont « designées » pour le suivi de maladie résiduelle en PCR quantitative en temps Taqman. Le système Taqman « designé » est testé, toujours sur le prélèvement du diagnostic, pour voir s'il est bien spécifique de la LAL et testé également sur un témoin négatif qui est un pool de lymphocytes polyclonaux sanguins de sujets sains. Les résultats de quantification par PCR en temps réel des points de suivi sont interprétés en fonction d'une droite d'étalonnage établie à partir d'une gamme de dilutions d'ADN génomique extrait de la moelle du diagnostic contenant un nombre connu de copies de la cible clonée.

Le seuil de sensibilité est déterminé comme étant la dernière dilution qui donne un signal de fluorescence spécifique, il varie d'un patient à un autre en fonction de l'ADN de départ (59).

L'une des difficultés rencontrées peut être la présence de clones mineurs présents au diagnostic sans avoir été détectés et devenant prédominants au cours de l'évolution de la maladie. Ces clones émergents n'étant pas « designés », ils ne sont pas recherchés lors du suivi de la MRD, et des résultats faussement négatifs pourront être rendus. Pour ces raisons,

il est recommandé d'utiliser plusieurs sondes permettant la détection de plusieurs réarrangements au diagnostic (60). Outre le problème de sous-clone, il existe aussi le phénomène d'instabilité clonal, à savoir qu'un nouveau clone issue du clone initial se développe lors des rechutes et qui peut s'expliquer par l'influence de la chimiothérapie sur les régions de l'Ig ou du TCR.

4. Points de suivi de la MRD

Nous nous intéressons aux deux principaux protocoles thérapeutiques au moment de l'étude : le protocole FRALLE puis le protocole CAALL.

4.1. Protocole FRALLE

4.1.1. FRALLE A

Critères d'inclusion :

Sont incluables les enfants atteints de leucémie aiguë lymphoblastique *de novo*, de la lignée B appartenant au groupe de risque standard selon la définition du National Cancer Institute américain :

Age au diagnostic > 1 an et < 10 ans ET leucocytose < 50.000/mm³

Critères d'exclusion :

- LAL de Burkitt (type FAB L3)

- Présence d'un des critères de gravité suivants (un seul critère est suffisant) :

- Atteinte initiale du système nerveux central

- Présence d'une t(9;22), d'une t(4;11) ou d'une hypoploïdie ≤ 44 chromosomes

- Présence d'un transcript de fusion *BCR-ABL* ou *MLL-AF4*.

- LAL avec absence d'expression ou expression faible du CD10 et présence d'un réarrangement du gène *MLL* détecté par FISH ou par Southern blot.

- Trisomie 21 : ces patients auront un traitement adapté

- Corticothérapie supérieure à 8 jours avant le début de la prise en charge.

Figure 17 Critères d'inclusion/exclusion au protocole FRALLE A (2003)

Il n'y a pas d'indication de greffe dans ce sous-groupe, sauf en cas de chimiorésistance avérée. On distingue 3 sous-groupe A :

- Groupe A1 : patients bons répondeurs avec une moelle de type M1 (chimiosensible ou moins de 5% de blastes médullaires à J21)
- Groupe A2 : chimiorésistants avec une moelle de type M2 (entre 5 et 25% de blastes à J21) l'ajout d'anthracyclines lors de la fin de l'induction est alors systématique.
- Groupe A3 : chimiorésistants avec une moelle de type M3 (plus de 25% de blastes à J21) L'usage des anthracyclines est alors systématique pendant l'induction, et le traitement est intensifié.

Un patient avec une MRD1 en post induction entre J35 et J42 supérieur ou égale à 10^{-2} sera systématiquement rattaché secondairement au groupe A3 quel que soit son groupe d'origine. Les patients du groupe A2 dès le résultat connu de l'étude de la MRD1 sont secondairement rattachés : soit au groupe A1 en cas d'absence de MRD à J35-J42, soit au groupe A3 en cas de présence d'une MRD élevée à J35-J42 ($> 10^{-2}$).

Une seconde évaluation de la MRD (MRD2) sera effectuée à J21/29 de la consolidation seulement pour les patients du groupe A3, avant le VEDA (Vincristine, Etoposide, Dexaméthasone, Aracytine). Et un 3^{ème} point de suivi (MRD3) sera effectué à J1 de l'intensification.

Ces patients présentant une persistance de la MRD2 ou 3 ($>10^{-2}$) faisaient l'objet d'une discussion par le comité de pilotage du Protocole.

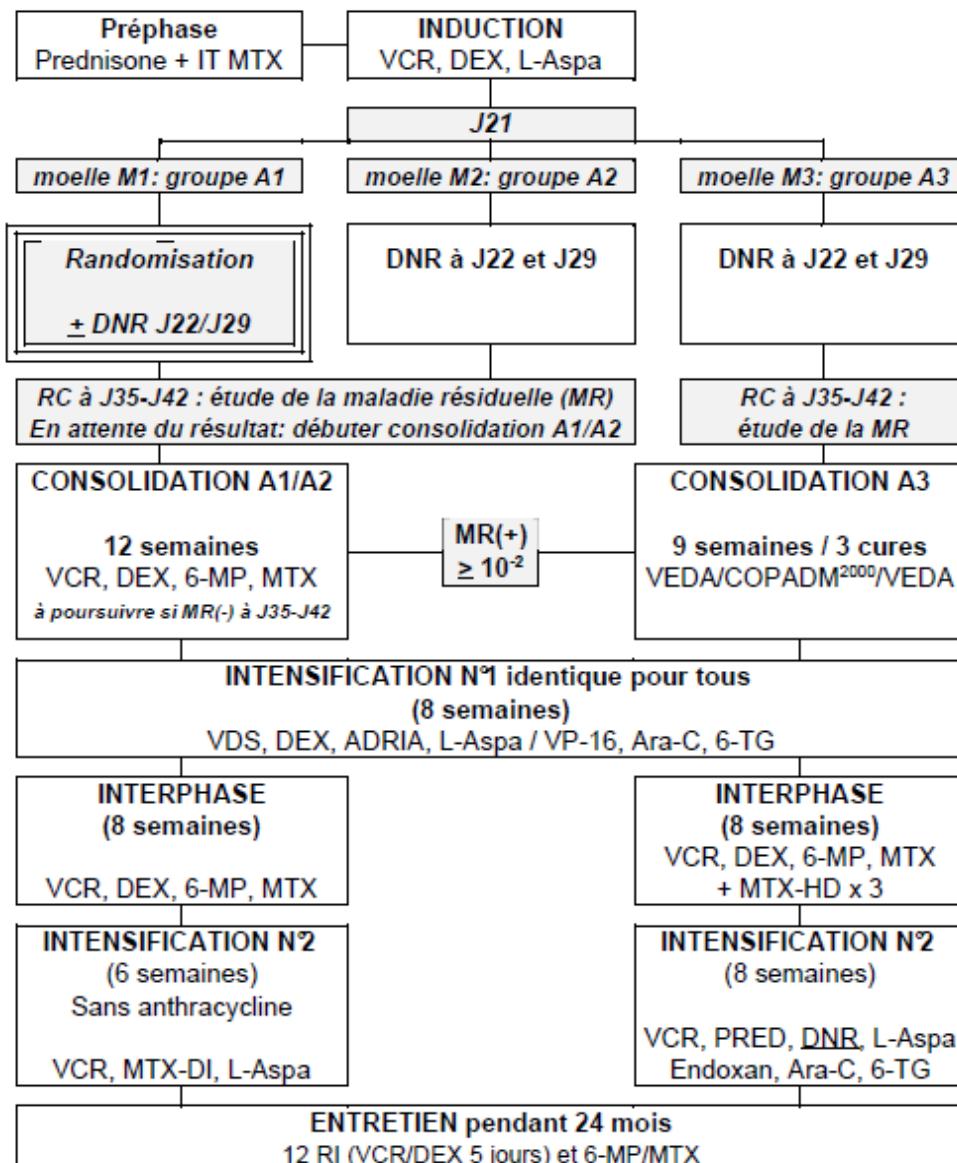


Figure 18 Protocole thérapeutique FRALLE A

4.1.2. FRALLE B

Groupe B

Critères d'inclusion : Leucémie aiguë lymphoblastique de *novo* de la lignée B présentant un des critères suivants :

- Age \geq 10 ans
- Atteinte du système nerveux central
- Leucocytose \geq 50.000/mm³
- Présence d'une t(9;22), d'une t(4;11) ou d'une hypoploïdie \leq 44 au caryotype
- Présence d'un transcrit BCR-ABL ou MLL-AF4
- Présence d'un réarrangement de MLL détecté par Southern blot ou par FISH pour une forme CD10(-)

Critères d'exclusion :

- Age < 1 an (*à traiter dans l'INTERFANT*)
- LAL de type FAB L3 (*à traiter dans les protocoles LMB*)
- Trisomie 21 constitutionnelle

Figure 19 Critères d'inclusion/exclusion au protocole FRALLE B (2003)

Il n'y a pas de subdivision du groupe B lors de l'induction qui est commune. Ce groupe se subdivisera à J21 en groupes B1 et B2 en fonction des critères présentés ci-dessous (Figure 20).

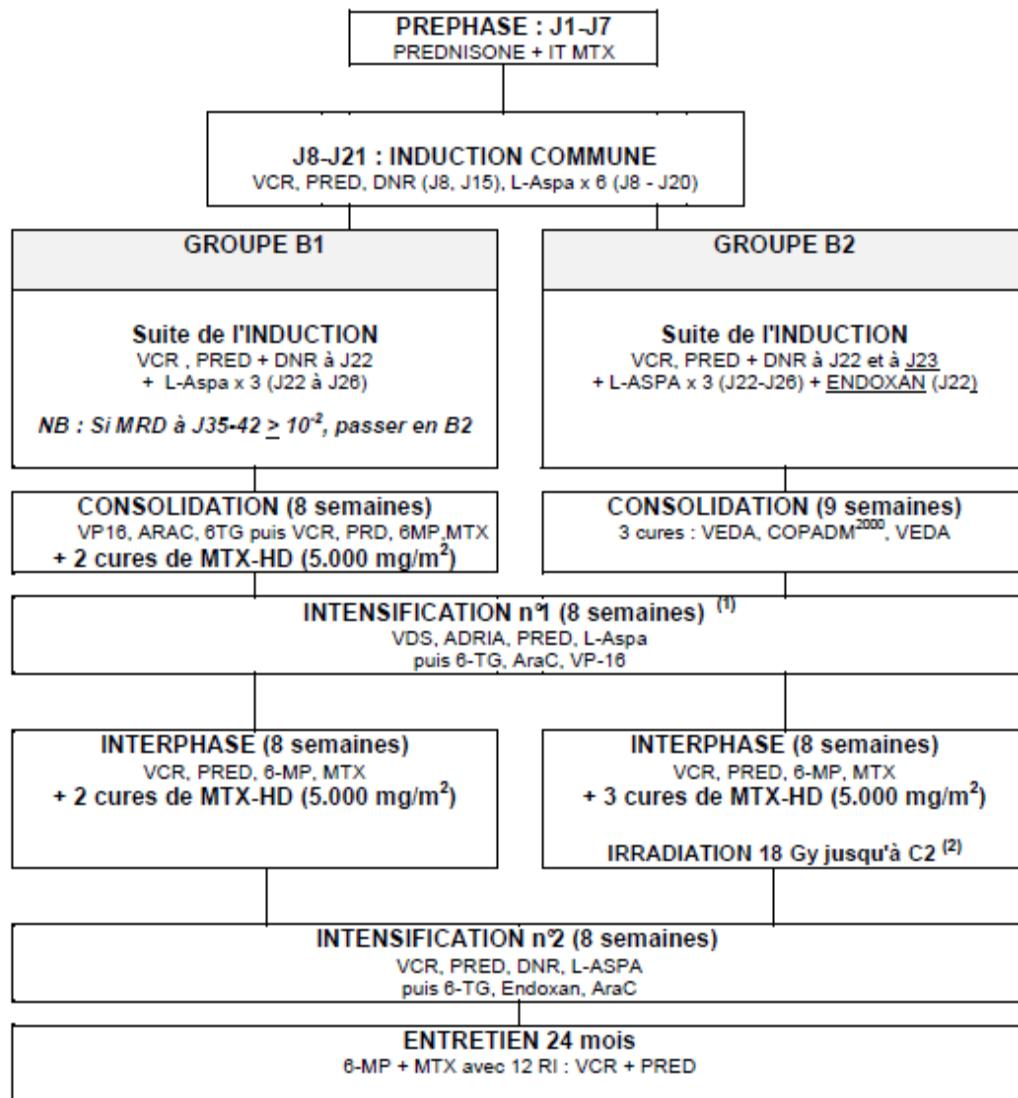
Groupe B1 (tous les critères doivent être réunis)	Groupe B2 (un seul critère est suffisant)
<ul style="list-style-type: none"> - ≤ 44, de <i>t(4;11)</i> ou de <i>t(9 ;22)</i> au caryotype - Absence de transcrit <i>MLL-AF4</i> ou <i>BCR-ABL</i> - Corticosensibilité à J8 - Chimiosensibilité à J21 ($\leq 5\%$ de blastes) 	<ul style="list-style-type: none"> - ≤ 44, d'une <i>t(4;11)</i> ou d'une <i>t(9;22)</i> au caryotype - Présence d'un transcrit <i>MLL-AF4</i> ou <i>BCR-ABL</i> - Corticorésistance à J8 - Chimiorésistance à J21 ($\geq 5\%$ de blastes)
<p>Les patients ayant une maladie résiduelle élevée à J35 ($\geq 10^{-2}$) seront secondairement rattachés au groupe B2.</p>	

Figure 20 Critères d'inclusion B1/B2 du protocole FRALLE B (2003)

Dans le protocole FRALLE B, les points de suivi sont les suivant :

- MRD1 en post induction entre J35 et J42 les patients ayant une maladie résiduelle élevée ($> 10^{-2}$) sont rattachés au groupe B2 secondairement
- MRD2 à J29 de la consolidation pour le groupe B1 : si $> 10^{-2}$: passage en groupe B2
- MRD3 au début de l'intensification n°1

Dans l'ensemble du groupe FRALLE, la MRD1 est décisionnelle pour inclure les patients dans les groupes A3 ou B2, qui bénéficieront d'une chimiothérapie plus agressive.



(1) : les patients du groupe B2 allogreffés le sont après la 1^{ère} partie de l'intensification n°1.

(2) : les patients du groupe B2 et âgés de moins de 4 ans ne sont pas irradiés sur le SNC en PROPHYLACTIQUE.

Figure 21 Protocole thérapeutique FRALLE B

4.2. Protocole CAALL

Celui-ci a remplacé le protocole FRALLE et les premiers patients au CHU de Rouen ont été inclus en 2016. Il se divise en 3 sous-groupes : standard risk (SR) , medium risk (MR), high ou very high risk (HR ou VHR). Les critères d'inclusion/exclusion comprennent davantage de données cytogénétiques et/ou moléculaires (Tableau 3).

Tableau 3 Critères inclusifs du protocole CAALL-F01

Groupe SR	Groupe MR	Groupe HR/VHR
<ul style="list-style-type: none"> • 1 à 10 ans et GB < 50 G/L 	<ul style="list-style-type: none"> • Corticosensibilité à J8 pour les patients du groupe HR • Corticorésistance à J8 pour les patients du groupe SR 	
<ul style="list-style-type: none"> • Sans : Ph1 ou <i>bcr-abl</i>, iAMP21, réarrangement MLL, hypodiploïdie (< 44CH), monosomie 7, t(1;19) ou <i>TCF3-PBX1</i>, t(17;19)/ <i>TCF3-HLF</i> 	<ul style="list-style-type: none"> • t(1 ; 19)/ <i>TCF3-PBX1</i> • Monosomie 7 	<ul style="list-style-type: none"> • Réarrangement du gène MLL • Hypodiploïde (<44 CH) • iAMP21 • t(17;19)/ <i>TCF3-HLF</i>
<ul style="list-style-type: none"> • Absence d'envahissement testiculaire du système nerveux central • Corticosensibilité à J8 	<ul style="list-style-type: none"> • Envahissement testiculaire • Absence d'envahissement du système nerveux central 	<ul style="list-style-type: none"> • Envahissement du système nerveux central

La stratification des groupes prend en compte 2 autres paramètres : la délétion ou non d'IKAROS ainsi que l'évaluation de la MRD au temps 1 (TP1) (entre J35 et J42 après induction) et au temps 2 (TP2) (entre J65 et J100 après consolidation, variable selon le groupe de risque).

	TP1		TP2
	IKZF1 No del	IKZF1 del	
B-SR	< 10 ⁻³ : SR	< 10 ⁻³ : MR	< 10 ⁻⁴ : stay in group defined after TP1
	≥ 10 ⁻³ < 10 ⁻² : MR	≥ 10 ⁻³ < 10 ⁻² : HR	≥ 10 ⁻⁴ < 10 ⁻³ : HR
	≥ 10 ⁻² : HR	≥ 10 ⁻² : HR	≥ 10 ⁻³ : VHR
B-MR	< 10 ⁻³ : MR	< 10 ⁻³ : MR	< 10 ⁻⁴ : stay MR
	≥ 10 ⁻³ : HR	≥ 10 ⁻³ : HR	≥ 10 ⁻⁴ < 10 ⁻³ : HR ≥ 10 ⁻³ : VHR
B-HR/VHR	HR/VHR	HR/VHR	< 10 ⁻³ : stay HR ≥ 10 ⁻³ : VHR

SR,HR,VHR: standard, high, very high risk groups; TP: Time Point
HSCT: hematopoietic stem cell transplantation (only VHR pts go to HSCT)

Figure 22 Stratification après traitement d'induction (TP1) et consolidation (TP2) selon le protocole CAALL-F01

Les patients MR/HR présentant un échec de l'induction confirmée par une MRD-TP1 $\geq 5 \times 10^{-2}$ passent en VHR.

Les indications à l'allogreffe sont les suivantes :

- Hypodiploïde < 40 chromosomes, t (17;19)/E2A-HLF, réarrangement MLL
- Groupe MR/HR avec échec de l'induction : MRD-TP1 $\geq 5 \times 10^{-2}$
- MRD-TP2 $\geq 10^{-3}$

V. OBJECTIFS DE L'ETUDE

L'évaluation de la maladie résiduelle est un outil devenu indispensable dans la prise en charge des hémopathies. C'est un facteur d'évaluation indépendant et prédictif de la réponse au traitement qui va impacter la décision thérapeutique de chaque patient. Les techniques mises en place doivent donc répondre à des exigences en termes de sensibilité, de spécificité et de rapidité de rendus de résultats.

Cette étude porte sur le suivi de la maladie résiduelle chez des enfants atteints de LAL B. Il s'agit d'une étude rétrospective regroupant les patients pris en charge au CHU de Rouen entre 2014 et 2018. Elle a pour but de comparer les résultats obtenus entre 2 méthodes : la cytométrie en flux d'une part et l'étude de réarrangement des gènes des Ig/TCR en biologie moléculaire d'autre part.

Cette étude est réalisée afin d'évaluer les performances de la technique de cytométrie en flux en la comparant avec la biologie moléculaire. Cette dernière étant considérée comme la méthode gold standard dans le suivi de MRD dans les essais thérapeutiques européens des LAL (61).

Dans un deuxième temps, seront présentés les cas de patients pour lesquels on observe une discordance dans les résultats de maladie résiduelle afin de les commenter et d'essayer d'en expliquer les raisons.

VI. MATERIEL ET METHODES

1. Population étudiée

Il s'agit d'une étude rétrospective réalisée à partir d'une extraction de données en sélectionnant les patients atteint de LAL B (au diagnostic ou la rechute), hospitalisés dans le service d'hémato-immuno-oncologie pédiatrique du CHU de Rouen entre avril 2014 et janvier 2018 soit une période totale de 45 mois et ayant eu au moins un immunophénotypage en cytométrie en flux. Puis pour chaque patient nous avons recueilli l'ensemble des résultats de MRD en cytométrie en flux à l'aide du logiciel Biocare. Les résultats de biologie moléculaire nous ont été transmis par le CHRU de Lille. Le recueil des données cliniques a été réalisé directement dans le service à l'aide des comptes rendus informatiques.

Au total, on recense 43 patients atteints de LAL B. Les patients d'avril 2014 à septembre 2016 étaient inclus dans le protocole FRALLE (29 patients). Les patients diagnostiqués après octobre 2016 ont été inclus dans le protocole CAALL (13 patients).

Le protocole IntReALL concernait des patients en rechute (2 patients) et le protocole INTERFANT06 était utilisé pour les enfants de moins de 1 an (un seul patient dans la cohorte).

Le recueil des données clinico-biologiques se trouve en annexe 1.

2. Prélèvements

Il s'agit de prélèvement de moelle osseuse prélevé sur tube EDTA avec toujours en parallèle des lames réalisées permettant notamment d'évaluer au microscope, la qualité et la richesse du prélèvement.

Sur les 43 patients de l'étude, 35 ont été prélevés pour une évaluation de la MRD par les 2 méthodes avec au minimum un point de suivi et au maximum huit points de suivis. Au total, on recense 76 points de comparaison de MRD.

3. Méthode en cytométrie en Flux

3.1. Cytomètre

Pour tous les prélèvements étudiés, un cytomètre Navios 10 couleurs de la société Beckman Coulter utilisant 3 lasers émettant à 405 nm, 488 nm et 638 nm (soit dans le violet, le bleu et le rouge) ce qui lui permet d'analyser 10 couleurs de fluorochromes. Nous utilisons les 10 fluorochromes suivants : FITC : Isothiocyanate de Fluorescéine, PE : Phycoérythrine, ECD : Phycoérythrine Texas Red , PC5.5 : Phycoérythrine-cyanine 5.5, PC7 : Phycoérythrine-cyanine 7, APC: Allophycocyanin, APC 700: Allophycocyanin Alexa Fluor 700, APC750: Allophycocyanin Alexa Fluor 750, PB: Pacific Blue et KO: Krome Orange.

3.2. Panels d'anticorps

Le choix des anticorps dépend de ses propriétés intrinsèques à savoir s'il possède une bonne spécificité vis-à-vis de l'antigène recherché mais aussi s'il participe de manière optimal à la caractérisation du phénotype de la cellule blastique (62).

Pour ce faire, il est important de rappeler les principaux antigènes de surfaces des leucocytes ou cluster de différenciation utilisés dans le diagnostic puis le suivi des LAL B.

CD45

Le CD45 est présent à la surface de tous les leucocytes humains, et il n'est pas exprimé par les hématies et les plaquettes. C'est un antigène dit « pan-leucocytaire » qui permet de faire un gating sur les leucocytes à partir d'un graphe CD45/SSC et d'éliminer les éléments des lignées érythroblastiques et mégacaryocytaires du fenêtrage. C'est sur ce premier histogramme que l'on va pouvoir fenêtrer la population blastique car elle se caractérise par une faible expression du CD45 (63) alors que les lymphocytes matures ont une forte expression du CD45.

CD34

L'antigène CD34 est exprimé sur les cellules souches hématopoïétiques. L'intensité d'expression du CD34 est la plus élevée sur les cellules souches pluripotentes et diminue peu à peu avec le processus de différenciation et de maturation des progéniteurs pour disparaître totalement des cellules matures. Il est souvent surexprimé par les blastes.

Antigènes de lignée lymphoïde B

Les marqueurs d'appartenance à la lignée B sont présents sur tous les lymphocytes B matures, ils peuvent être absents ou peu exprimés sur les précurseurs. Ce sont notamment les marqueurs CD19, CD20, CD22, CD79a et CD79b.

CD19

L'antigène CD19 est une glycoprotéine membranaire impliquée dans la régulation du développement, de l'activation et de la différenciation des lymphocytes B. Il est présent sur tous les lymphocytes B normaux, y compris les pro-lymphocytes B et les lymphoblastes. C'est un marqueur pan-B.

CD22

L'antigène CD22 est une glycoprotéine transmembranaire de la superfamille des immunoglobulines présent dès le premier stade de maturation en intracytoplasmique, puis progressivement en membranaire. Son expression disparaît après l'activation des lymphocytes B avant même qu'ils n'atteignent le stade de plasmocytes.

CD79

L'antigène CD79a est une glycoprotéine qui s'associe au CD79b et à une immunoglobuline de surface pour former le BCR. Ce récepteur est responsable de la signalisation des lymphocytes B. Il est spécifiquement et strictement exprimé par les cellules de la lignée lymphoïde B. Le CD79a est exprimé en intra-cytoplasmique dès le stade pro-B et persiste jusqu'au stade plasmocytaire. Le CD79b n'est présent qu'au stade B mature.

CD20

L'antigène CD20 est une protéine transmembranaire non glycosylée, elle apparaît à un stade intermédiaire de maturation et est présent sur tous les lymphocytes B mature (à partir de la cellule pré-B). Il est impliqué dans le transport calcique transmembranaire indispensable au fonctionnement de la cellule B normale.

CD24

L'antigène CD24 est une sialoglycoprotéine membranaire GPI ancrée présente sur les cellules B, à partir du stade de lymphocyte pré-B jusqu'au lymphocyte B mature. Cet antigène est impliqué dans la signalisation cellulaire et dans la régulation des interactions, la prolifération et l'adhésion cellulaire. Il est parfois sous-exprimé par les lymphoblastes, et il est fortement exprimé chez les hématogones de stade 1. Il n'est pas restreint à la lignée B (expression par les polynucléaires neutrophiles).

CD10

L'antigène CD10, anciennement appelé CALLA (Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen) correspond à une protéine membranaire possédant une activité d'endopeptidase que l'on retrouve dans plusieurs tissus. Il est exprimé sur les précurseurs engagés dans la lignée lymphoïde. Son expression diminue ensuite avec la maturation des lymphocytes, de manière précoce pour les cellules de la lignée T, plus tardivement sur les cellules de la lignée B (lors de l'expression d'une immunoglobuline de surface). Il est également exprimé sur les lymphocytes B activés et proliférant dans les centres germinatifs. Il est impliqué dans la rétrorégulation de la prolifération cellulaire.

CD38

L'antigène CD38 est une glycoprotéine membranaire possédant plusieurs activités enzymatiques. L'expression du CD38 dépend de la différenciation et de l'activation de la cellule. Il est exprimé aux premiers stades des cellules de la lignée B (hématogones) puis est perdu durant leur maturation. Les lymphocytes B et T les plus matures au repos n'expriment pas l'antigène CD38. L'activation des cellules B en plasmocytes et des lymphocytes T entraîne une expression forte du CD38. Il est souvent sous exprimé par les lymphoblastes, et de manière hétérogène.

Le choix de la combinaison des anticorps dépend de plusieurs paramètres :

- Ces anticorps doivent permettre de discriminer efficacement les cellules normales des cellules leucémiques. Le panel doit donc être composé d'antigènes de cellules matures physiologiques, d'antigènes spécifiques d'immaturité et d'antigènes aberrants permettant la détection de LAIP.
- Le panel doit également permettre la classification de la LAL B selon l'EGIL.
- La disponibilité des fluorochromes au sein du laboratoire en tenant compte de ses caractéristiques (longueurs d'onde d'émission, rendement quantique de fluorescence)

- Associer certains anticorps dans le même tube pour mettre en évidence des co-expressions. Exemple : 10/38 pour la recherche d'hématogones.

Ces panels ont été réalisés à partir des recommandations du Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL).

Tableau 4 Composition en anticorps/fluorochromes des tubes utilisés au CHU de Rouen.

Anticorps \ Fluorochromes	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	APC.AF700	APC.AF500	PB	KO
Tube 1	κ	λ	19	5	56	4	8	3	20	45
Tube 2	34	10	13	-	33	117	22	-	-	45
Tube 3	65	24	14	58*	64	123*	-	-	38	45
Tube intra 1	MPO	79a	13	-	-	IgM	22	3	-	45
Tube intra 2	κ	λ	19	-	-	-	-	-	-	-
Tube MRD	34	10	19	58*	33	123*	22	-	38	45

*Ces marqueurs ont été ajoutés au panel en cours d'étude : le CD 123 en octobre 2016 et le CD 58 à partir d'août 2017.

Le CD123 est un récepteur à l'interleukine 3 (IL3) exprimés par les progéniteurs hématopoïétiques et les cellules myéloïdes. Il est souvent surexprimés dans les LAM et LAL avec une rare modulation antigénique au cours de la maladie (64). L'autre avantage de ce marqueur tient au fait qu'il ne soit pas exprimé par les hématogones et en fait un marqueur discriminant et robuste. Enfin son expression semble associée à un taux de rechute plus important dans les LAL B (64).

Le CD58 est une glycoprotéine transmembranaire GPI ancrée qui se lie au CD2 et dont l'interaction induit diverses réponses immunitaires. Il est exprimé par de nombreuses cellules hématopoïétiques et non hématopoïétiques. Il a été démontré l'hyperexpression du CD58 par les lymphoblastes des LAL B par rapport aux hématogones (65).

3.3. Préparation des échantillons

Dans un premier temps, on réalise une numération de la moelle, pour évaluer la richesse. Une dilution est effectuée en ajustant le volume de diluant de façon à avoir un nombre de globules blancs inférieur à 30 G/L.

Etudes des marqueurs membranaires correspondant aux tubes 1, 2 et 3 (Tableau 4) :

On réalise une étape de lavage en utilisant 50uL du prélèvement mélangé avec 12mL de solution tampon isotonique (PBS-BSA). Il s'agit d'une solution tampon phosphate saline (PBS®, Eurobio) associé à une solution d'albumine bovine (BSA®, Dutscher) afin d'éliminer les immunoglobulines naturelles circulantes qui interfèrent avec l'étude des chaînes légères κ/λ ou des chaînes lourdes des immunoglobulines. Cette première étape de lavage est nécessaire uniquement pour les tubes 1 et intra2.

Puis on effectue l'étape de marquage des cellules par les anticorps monoclonaux couplé à des fluorochromes : pour cela on récupère 50 µL du culot qui est déposé dans le tube 1 (Tableau 4) préparé à l'avance. Le tube est incubé 15 min dans l'obscurité puis on ajoute 750µL de Versalyse® (Beckman Coulter) mis en contact pendant 15 min pour lyser les globules rouges. Pour finir, on réalise un lavage pour éliminer l'excès d'anticorps non fixés.

Etudes des marqueurs intracytoplasmiques correspondant aux tubes inta 1 et 2 (Tableau 4) :

On utilise le Kit intraprep® (Beckman Coulter) constitué de deux réactifs : un agent fixateur contenant 5.5% de formaldéhyde (R1) et un liquide de perméabilisation contenant de la saponine et de l'azoture de sodium (R2). Il faut mélanger 100 µL de réactif R1 avec la moelle et procéder ensuite aux étapes de rinçage, centrifugation. On ajoute ensuite 100 µL de réactif R2 pendant 5 min. Cette étape de perméabilisation de la membrane cellulaire va permettre le marquage des antigènes en intracytoplasmique. Il faut alors distribuer le culot dans le tube contenant les anticorps et incuber l'ensemble 15 min dans l'obscurité puis laver au PBS-BSA, centrifuger et reprendre le culot dans 0,5mL de PBS-BSA.

Les tubes une fois préparés sont analysés sur le cytomètre.

Une fois le diagnostic établi on teste un tube « MRD » adapté. Il servira de référence pour l'étude de la MRD sur les prélèvements post-traitement.

3.4. Stratégie d'analyse

Les données acquises par le cytomètre Navios sont intégrées par le logiciel Kaluza permettant une analyse des données.

On réalise l'analyse des cellules d'intérêt (blastes) au moyen de plusieurs histogrammes :

- Le graphique Time représentant le nombre d'évènements acquis en fonction du temps. Celui-ci permet de vérifier la régularité de l'acquisition et également de s'assurer que les événements retrouvés positifs sont répartis uniformément pendant l'acquisition.

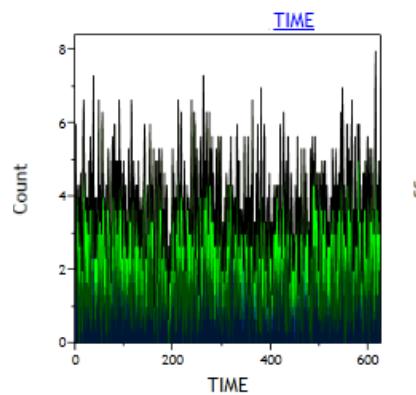


Figure 23 Exemple d'histogramme Time avec répartition homogène des évènements.

- L'histogramme taille/structure (FS/SS) permet de visualiser l'ensemble des événements acquis par l'automate et d'éliminer les éléments de petite taille (débris cellulaires, GR non lysés...) pour ainsi fenêtrer les cellules « vivantes ».

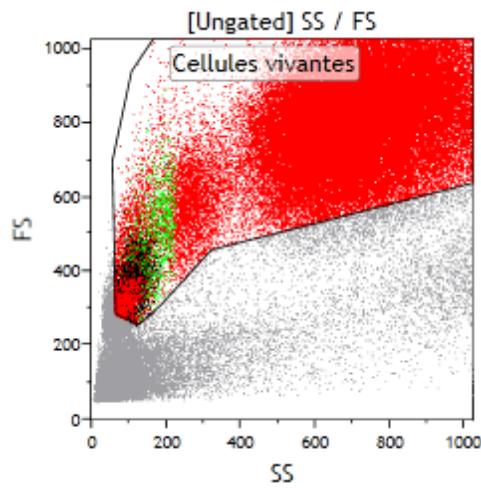


Figure 24 Exemple d'histogramme taille structure

- L'histogramme FS INT/FS PEAK, met en évidence les doublets que nous éliminerons pour ne garder que les singulets dans notre analyse.

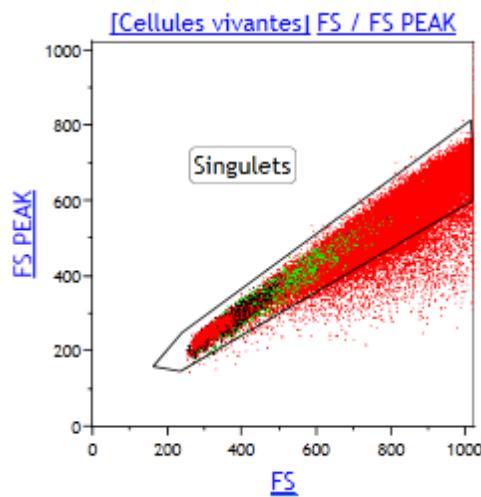


Figure 25 Exemple d'histogramme FS INT/FS PEAK

Les doublets correspondent au passage devant le laser de 2 cellules accolées. Le signal émis par une cellule lors de son passage devant le cytomètre est converti en un signal (impulsion) électrique défini par une hauteur, une largeur et une aire sous la courbe. Si 2 cellules passent simultanément devant le laser, créant un doublet, cela engendrera une augmentation de l'aire sous la courbe sans augmentation de la hauteur du pic. Les événements correspondants à des passages de cellules isolées seront donc observés dans la fenêtre singulet autour de la bissectrice de l'histogramme "FS peak/FS int".

- L'histogramme CD45/SSC permet de distinguer les différentes populations (lignée granuleuse, lymphocytes et monocytes) correspondant aux éléments CD45 positif des éléments CD45 négatif (globules rouges mal lysés). Ainsi l'histogramme permet le fenêtrage des différentes populations et notamment des blastes présentant un CD45 faible à négatif.

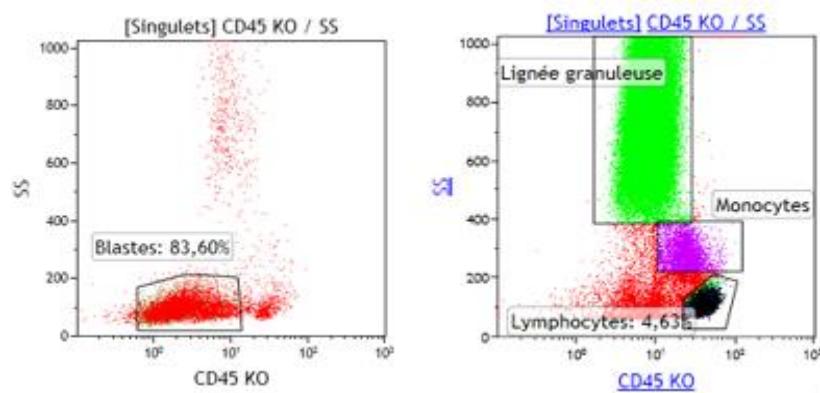


Figure 26 Exemple d'histogramme CD45/SSC d'une moelle présentant un envahissement blastique à gauche et d'une moelle normale à droite.

Pour chaque anticorps présent dans le panel, un graphique CD/SS est réalisé afin de voir avec quelle intensité la population blastique exprime le marqueur par rapport aux cellules normales. Ces graphiques nous permettent également de vérifier que tous les anticorps de la combinaison ont bien été distribués. Il est pour cela, important de réaliser un gating sur les autres populations leucocytaires pour vérifier l'intensité de marquage des anticorps. Ces différentes populations servent de témoins positifs ou négatifs.

Ensuite il faut sélectionner les blastes à l'aide de l'histogramme CD45/SSC (généralement CD45 faible) dans le but d'évaluer sur les différents histogrammes biparamétriques l'expression des antigènes et ainsi d'établir le profil phénotypique de ces blastes. L'objectif est également de repérer les différents LAIP qui pourront être utile dans le suivi de la MRD.

Ainsi lors de la demande de MRD, on réalise une combinaison d'anticorps spécifique de chaque patient et dépendant du phénotype initial. L'analyse des histogrammes se fait sur le même masque que celui issu du diagnostic. Les histogrammes des anticorps choisis sont fenêtrés sur les blastes et les curseurs d'intensité restent positionnés de manière identique. On établit un graphique d'intersection des zones blastiques (Cluster MRD) pour obtenir le nombre d'évènements ayant un phénotype identique à celui du diagnostic (Figure 32). Ce nombre d'événements est rapporté au nombre total de leucocytes (éléments CD45 positif) pour quantifier le nombre de cellules blastiques résiduelles.

Il est important de définir le nombre minimum de cellules qu'un cluster MRD doit contenir afin de pouvoir être quantifié de manière fiable. Bien qu'il n'existe pas de consensus concernant ce paramètre, la majorité des études fixe le seuil de cellules entre 10 et 30 (66) (67) (68). Avec l'augmentation du nombre de couleurs des cytomètres et l'amélioration du gating des blastes, nous avons fixé le seuil à 20 cellules.

4. Analyses statistiques

Les performances de la CMF ont été calculées par la sensibilité, spécificité, valeur prédictive négative et positive du test par rapport à la biologie moléculaire.

L'analyse qualitative de corrélation entre les deux techniques a été effectuée par le calcul de l'indice Kappa. L'analyse quantitative reprenant les résultats doublement positifs a été effectuée par le test de Spearman. La concordance quantitative a été estimée par la représentation de Bland-Altman.

Dans le but de pouvoir effectuer des comparaisons qualitatives de type présence ou absence de MRD, ainsi que des comparaisons quantitatives, deux types de résultats ont dû faire l'objet d'une interprétation :

- En cytométrie en flux : 10 prélèvements ont été rendus « MRD positive mais dont le phénotype peut correspondre à des cellules physiologiquement normales (hématogones) ». Ils ont été exclus de la comparaison.
- En biologie moléculaire : 8 prélèvements ont été rendus « MRD positive mais non quantifiable ». L'interprétation des résultats de PCR est plus difficile si les niveaux de MRD obtenus sont en dehors de la « gamme quantitative ». Dans ce cas, il n'est pas toujours clair de savoir si le signal observé est dû à une amplification spécifique de l'ADN des cellules leucémiques ou à une amplification non-spécifique de l'ADN normal. Ce phénomène est particulièrement visible en fin de traitement d'entretien où la régénération de la moelle implique une prolifération importante de cellules B immatures présentant des réarrangements complets du locus IgH. Cette augmentation d'amplification non spécifique de l'ADN normal est moins visible en fin d'induction car le réarrangement IgH reste partiel (69). D'autre part, la stratification thérapeutique en fonction des résultats de MRD ne se fait qu'à partir de 10^{-4} ces résultats n'ont donc pas d'impact dans la prise en charge. Ces MRD seront donc dans le cadre de la comparaison considérées comme négatives.

VII. RESULTATS

1. Caractéristiques de la population

1.1. Données démographiques

Entre avril 2014 et décembre 2017, on recense 43 patients atteint de LAL B dont 21 garçons et 22 filles avec un âge moyen au moment du diagnostic de 6 ans et 10 mois. Le plus jeune ayant 8 mois et le plus âgé 15 ans et demi.

1.2. Données biologiques

Tableau 5 Constantes biologiques présentés au diagnostic ou à la rechute.

	Moyenne	Minimum	Maximum
Leucocytose sanguine (G/L)	34.2	1.7	323
Blastose sanguine (%)	45.2	0	97
Blastose médullaire (%)	89.1	62	99

Ces résultats montrent l'hétérogénéité du tableau biologique pouvant être observés au diagnostic notamment concernant la leucocytose sanguine et le pourcentage de blastes dans le sang. En revanche, on observe un envahissement de la moelle significatif chez la totalité des patients.

1.3. Classification immunophénotypique

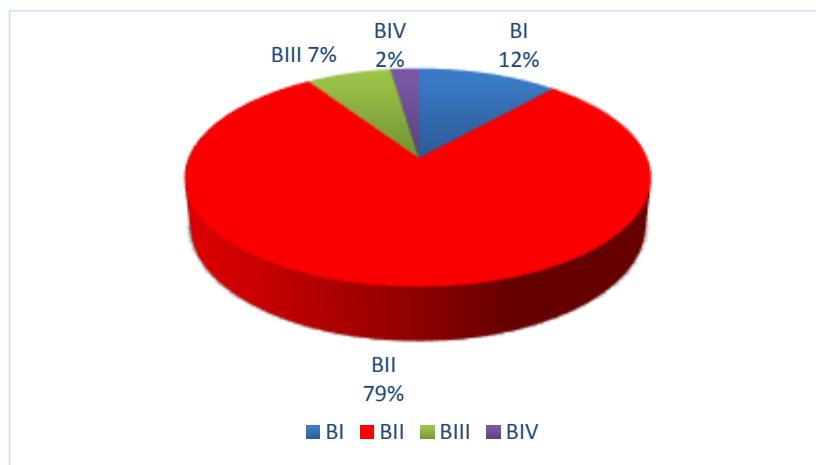


Figure 27 Répartition des LAL B diagnostiquées d'après la classification EGIL

La LAL dite commune (BII) représente la LAL B la plus fréquente de la cohorte avec une répartition des LAL B proche de celle rapportée dans la littérature.

1.4. Anomalies cytogénétiques et moléculaires

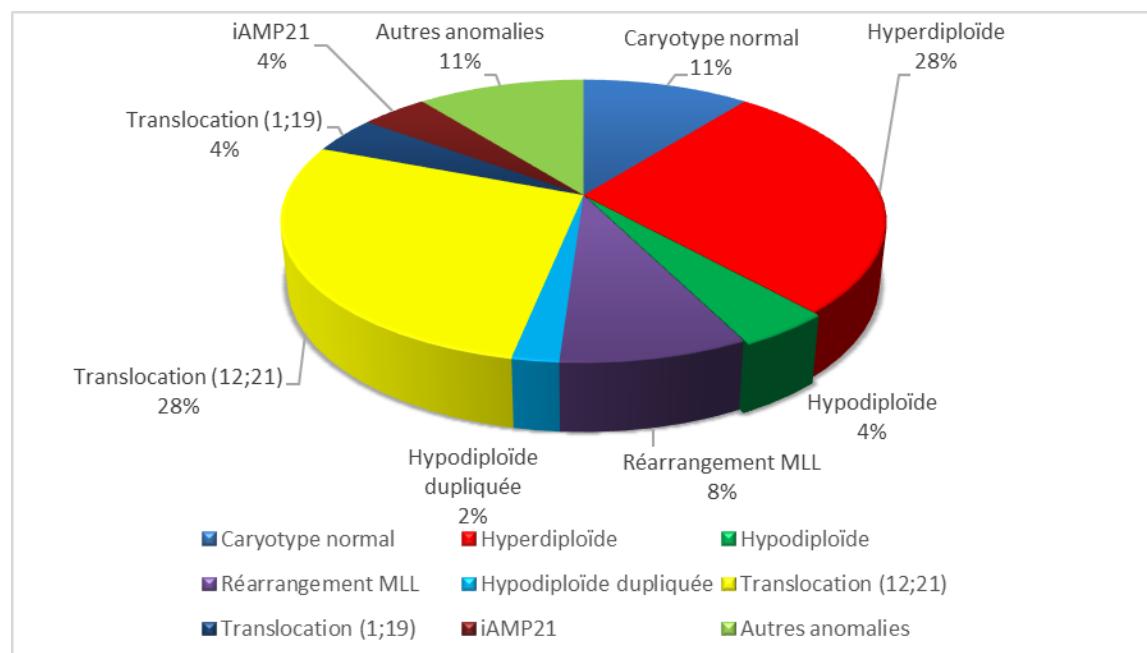


Figure 28 Répartition des différentes anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires présentes au diagnostic ou à la rechute.

Les deux principales anomalies représentées sont les translocations (12;21) et les hyperdiploïdies, toutes deux de bon pronostic. A noter l'absence de LAL Phi+ dans cette cohorte.

1.5. Protocoles thérapeutiques

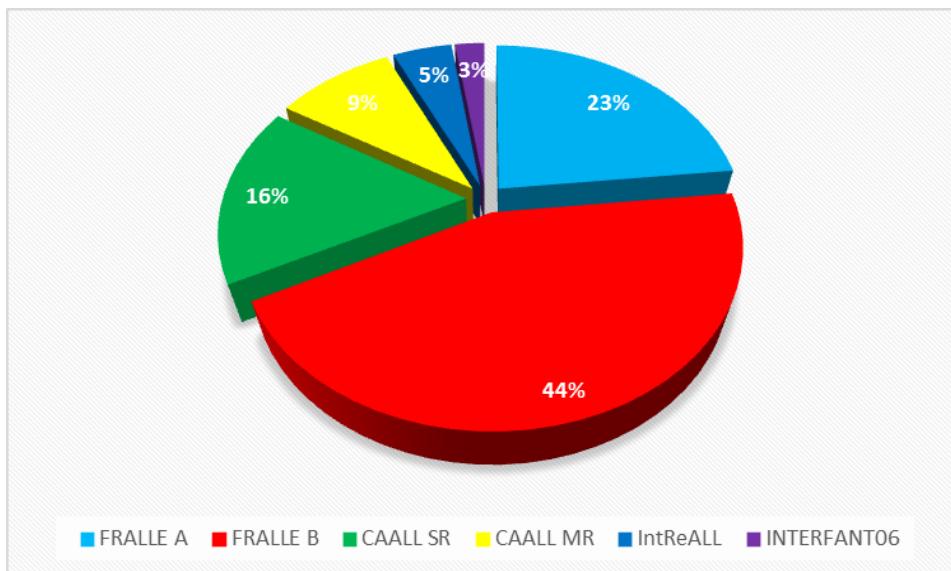


Figure 29 Répartition des patients selon les protocoles thérapeutiques

Les patients d'avril 2014 à septembre 2016 étaient inclus dans le protocole FRALLE (29 patients). Les patients diagnostiqués après octobre 2016 ont été inclus dans le protocole CAALL (13 patients).

2. Comparaison des résultats de MRD

2.1. Echantillons analysés

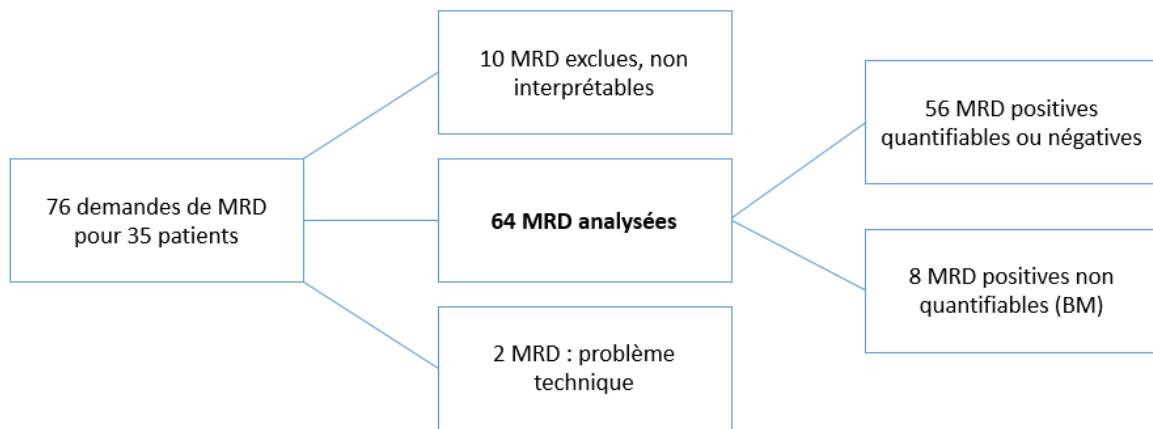


Figure 30 Répartition des échantillons de moelle concernés par l'étude.

Les 10 MRD exclues concernent les MRD rendus positives mais dont le phénotype peut correspondre à des cellules physiologiquement normales (hématogones).

Les 2 MRD non rendus pour problème technique concernent des prélèvements de BM : un pour lequel l'extraction d'ADN n'a pu être réalisée et un échec de séquençage pour l'autre.

2.2. Performance de la méthode CMF

La biologie moléculaire est considérée actuellement comme le « gold standard » pour le suivi de la MRD des LAL-B du fait de sa haute sensibilité, de sa standardisation et du nombre élevé d'études disponibles. Il s'agit donc de la méthode de référence.

Tableau 6 Tableau de contingence des résultats de MRD obtenus par les techniques de CMF avant relecture et de BM.

	BM -	BM+	Total
CMF-	41(VN)	7 (FN)	48 (TN)
CMF+	9 (FP)	7(VP)	16 (TP)
Total	50 (TS)	14 (TM)	64

VN : Vrai négatif FN : Faux négatif FP : Faux positif VP : Vrai positif

TN : Total test négatif TP : Total test positif TS : total « sain » TM : total « malade »

Ces résultats correspondent aux résultats initiaux du recueil de données sans relecture. Cependant, les résultats de CMF ont fait l'objet d'une réanalyse ce qui permet un meilleur reflet de la performance actuelle de la technique avec l'expérience de l'interprétation. Cette relecture a abouti à une modification du résultat pour 4 prélèvements dont voici les résultats :

Tableau 7 Tableau de contingence des résultats de MRD obtenus par les techniques de CMF avant relecture et BM.

	BM -	BM+	Total
CMF-	42(VN)	4 (FN)	46 (TN)
CMF+	8 (FP)	10 (VP)	18 (TP)
Total	50 (TS)	14 (TM)	64

La sensibilité (Se) d'un test est déterminée sur une population de patients dont on sait qu'elle est porteuse de la maladie M parce qu'elle a subi un test de référence. La maladie M correspondant dans notre étude à la mise en évidence d'une MRD positive et le test de référence étant la biologie moléculaire. Elle est définie par la proportion de patients qui ont une MRD positive et dont le résultat en cytométrie est positif. La sensibilité obtenue ($Se = VP/TM$) est de 71% (50% avant relecture), ce qui implique que 29% des patients avec une MRD positive ne seront pas détectés en CMF. Mais il est important de souligner que cette sensibilité est calculée sur un effectif faible (seulement 14 points de MRD en BM positive). Un calcul sur un effectif plus important serait un meilleur reflet de la sensibilité de l'analyse.

La **spécificité (Sp)** d'un test est déterminée sur une population de patients dont on sait qu'elle n'est pas porteuse de la maladie M parce qu'elle a subi un test de référence. Elle est définie par la proportion de patients qui ont une MRD négative et dont la cytométrie est négative. Nous avons obtenu une spécificité ($Sp = VN/TS$) de 84% (82% avant relecture), ce qui signifie que 16% des patients sains auraient une MRD faussement positive en CMF.

La **valeur prédictive positive (VPP)** représente la proportion de sujets réellement malades parmi ceux qui ont un test positif. Dans notre étude, la VPP représente la proportion de sujets ayant réellement une MRD positive parmi ceux qui ont un résultat de MRD positive en CMF. La VPP ($= VP/TP$) est de 55% (44% avant relecture), elle est impactée par le nombre important de faux positifs : 8 MRD dont 5 pour un seul patient.

La **valeur prédictive négative (VPN)** représente la proportion de sujets réellement non malade parmi ceux qui ont un test négatif. Dans notre étude, la VPN représente la proportion de sujets ayant réellement une MRD négative parmi ceux qui ont un résultat de MRD négative en CMF ($VPN = VN/TN$). Elle est de 93%, le patient a donc 7% de risque d'avoir une MRD positive lorsque le résultat de MRD en CMF est négatif.

Ces valeurs sont à titre expérimental et ne prennent pas en compte le fait que parmi ces discordances, l'une d'entre elle pouvait être attribuée à un résultat faussement négatif ou positif par la technique de biologie moléculaire comme cela sera vu dans l'analyse des discordances par la suite.

2.3. Concordance et corrélation entre les 2 méthodes

2.3.1. Analyse qualitative

La concordance qualitative est évaluée par le calcul de l'indice Kappa K à partir des résultats suivant (obtenues après relecture) :

Tableau 8 Répartition des résultats observés en BM et CMF

	BM +	BM -	Total
CMF +	10 (a)	8 (b)	18
CMF -	4 (c)	42 (d)	46
Total	14	50	64 (N)

On calcule la concordance observée p_0 : $p_0 = (a + d) / N = 0.81$

La **concordance observée** est de 81%.

On calcule ensuite la concordance aléatoire : $p_c = (a' + d') / N$

Il faut pour cela calculer les effectifs attendus a' et d' :

$$a' = [(a+c)(a+b)] / N = 3.94 \quad d' = [(d+c)(d+b)] / N = 37.5$$

$$p_c = (a' + d') / N = 0.65$$

La **concordance aléatoire** est de 65%.

$$K = (p_0 - p_c) / (1 - p_c) = 0.46$$

Le coefficient kappa s'utilise comme un indicateur descriptif de la concordance. Il varie entre 0 et 1. La concordance est d'autant plus importante que le coefficient est proche de 1.

On obtient un indice K à 0,46. D'après les valeurs de référence utilisées pour interpréter le coefficient kappa (valeurs de référence de Landis et Koch (70)), il s'agit d'un degré de concordance moyen car situé entre 0.41 et 0.60. La différence retrouvée entre la concordance observée p_0 élevée à 81% et l'indice K s'explique par la faible prévalence de MRD positive dans notre étude.

2.3.2. Analyse quantitative

Il s'agit ici de s'intéresser aux prélèvements positifs à la fois en CMF et en BM ($n = 7$) à partir des données initiales et de comparer quantitativement les résultats à l'aide du test de corrélation de Pearson.

Tableau 9 Valeurs de MRD obtenues pour les 7 patients présentant un MRD positive quantifiables en CMF et BM.

CMF	BM
5,30E-04	3,00E-04
1,40E-04	2,00E-03
3,00E-03	1,00E-02
3,30E-02	1,40E-02
5,00E-05	3,00E-04
1,00E-04	7,00E-04
4,40E-04	3,10E-04

On obtient un coefficient de corrélation $r^2 = 0.7$ ($P = 0,02$) avec un intervalle de confiance à 95% compris entre 0.22 et 0.97. La quantification de la MRD est donc significativement corrélée entre les 2 techniques.

On évalue la concordance qualitative par réalisation du graphique de Bland-Altman (Figure 32). Ce graphe représente la moyenne de chaque couple de valeurs de MRD (BM et CMF) en abscisse et le biais absolu de chaque couple en ordonnée après transformation logarithmique.

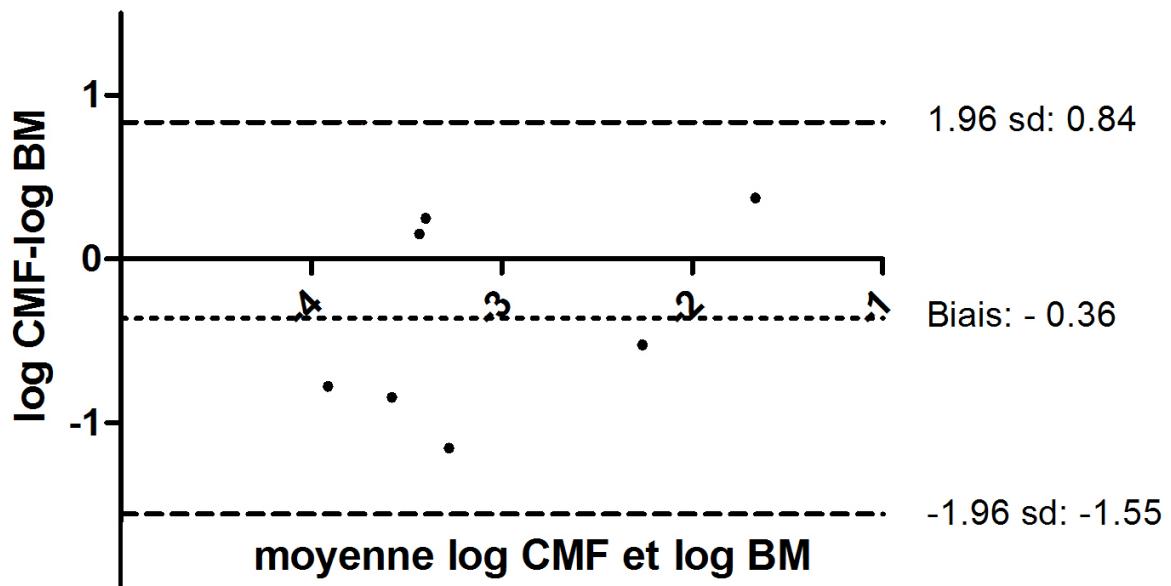


Figure 31 Analyse des prélèvements de MRD positive par la représentation de Bland-Altman.

Nous obtenons une moyenne des différences ou biais absolu moyen à -0.36 c'est-à-dire une valeur faible de biais montrant la bonne concordance quantitative. D'autre part, aucun point ne figure en dehors des limites de concordance ($+/- 1.96\text{sd}$). Le biais absolu moyen étant négatif, cela signifie que les taux de MRD obtenues en CMF sont légèrement plus faibles que ceux obtenus en BM.

2.4. Analyses des discordances

Cas n°3

Diagnostic le 08/11/2014 : LAL BII

- Caryotype : hyperdiploïde
- Biologie moléculaire : délétion du gène IKAROS
- Phénotype : positivité des marqueurs CD 19, 22, 79b faible intensité, 10 et 34. Néativité des marqueurs CD 20, 38, 13, 33
- Inclus dans le protocole FRALLE A
- Corticosensible et chimiosensible

Points de MRD concernés : fin d'induction (16/12/2014) = MRD 1, fin de consolidation (19/01/2015) = MRD 2, MRD du 10/09/2015 = MRD 3

MRD 1

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de 10^{-4}
- Résultat BM : MRD positive à 3.10^{-4} pour le marqueur JH3 et 4.10^{-4} pour le marqueur JH4.

La relecture des graphes en reciblant le fenêtrage du masque d'analyse à partir du diagnostic a permis de mettre en évidence la présence de 113 cellules blastiques et donc de montrer la positivité de la MRD sur ce prélèvement (Figure 32).

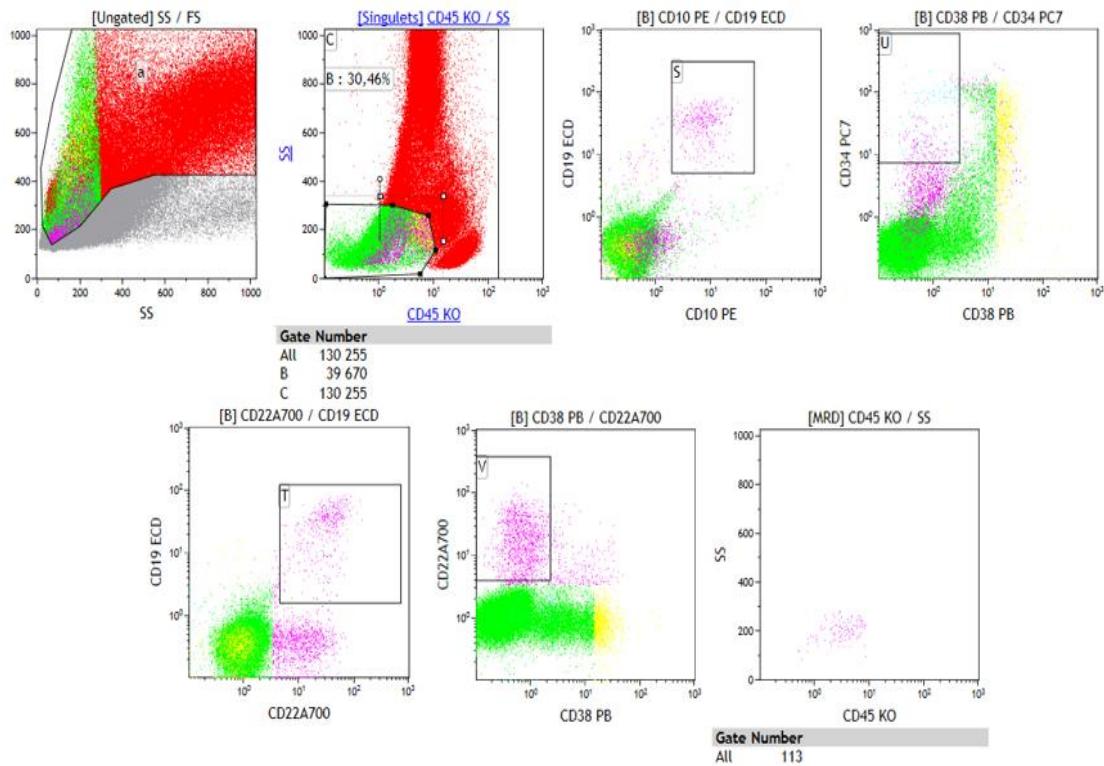


Figure 32 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/S/U/T/S/V), la représentation de 113 cellules blastiques résiduelles.

MRD 2

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de $6.8 \cdot 10^{-5}$
- Résultat BM : MRD positive à $7 \cdot 10^{-5}$ pour le marqueur JH3 et $9 \cdot 10^{-5}$ pour le marqueur JH4.

Ici la réanalyse des différents graphes en se calquant sur le masque paramétré précédemment n'a pas mise en évidence de cellule blastique résiduelle. On peut donc émettre l'hypothèse d'un problème de sensibilité pour expliquer une MRD faussement négative en CMF. D'autant plus, que l'examen cytologique de la moelle mettait en évidence une richesse diminuée avec un nombre de mégacaryocytes diminué, la moelle devant être partiellement hémodiluée.

MRD 3

- Résultat CMF : MRD positive à $4.99 \cdot 10^{-5}$ pour un seuil de sensibilité à $1.5 \cdot 10^{-5}$
- Résultat BM : MRD négative inférieur au seuil de $1 \cdot 10^{-5}$

La relecture a permis de montrer que le nombre de cellules blastiques résiduelles est inférieur au seuil de sensibilité, la MRD en CMF est donc négative.

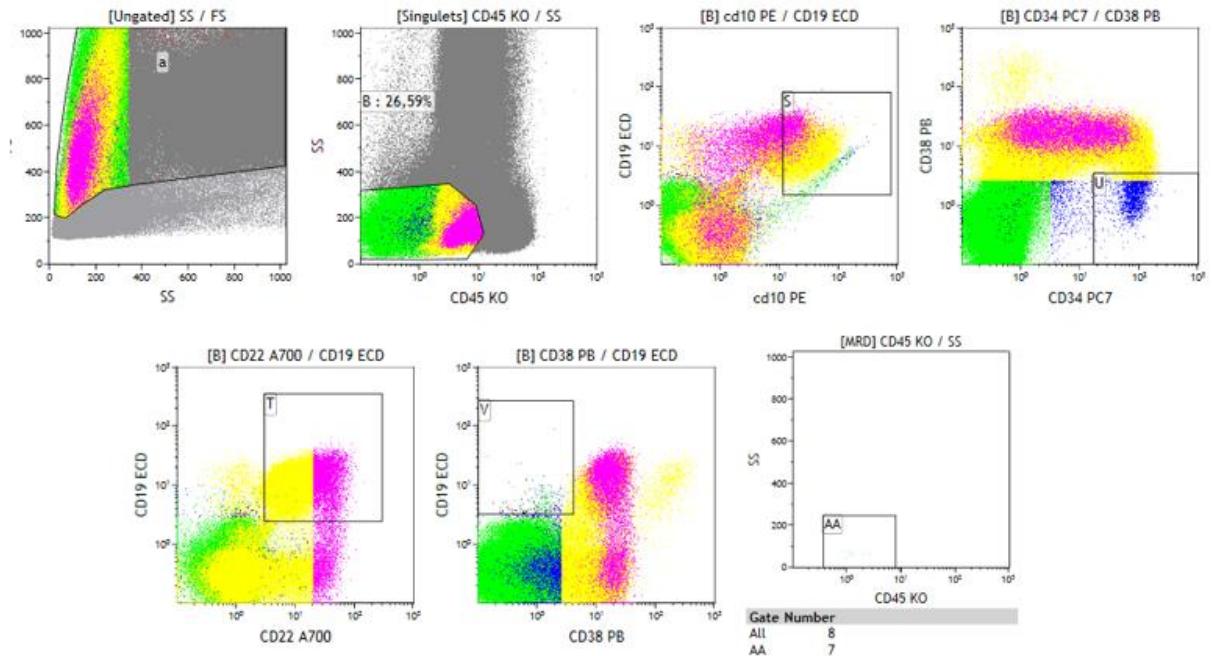


Figure 33 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/S/U/T/V), la représentation de 7 cellules blastiques résiduelles

Cas n°2

Diagnostic initiale en 2010, rechute le 28/08/2014 : LAL BII

- Caryotype : normal
- Biologie moléculaire : délétion IKAROS transcrit *JAK2-ETV6*
- Phénotype : positivité des marqueurs CD 19, 22faible, 10, 34 et 79a.ic Négativité du marqueur CD 38. Présence d'un marqueur myéloïde aberrant : CD36
- Inclus dans le protocole FRALLE B (groupe B1) puis inclus dans le protocole Coopral (groupe S2) devant la rechute méningée en fin de traitement d'entretien (dg le 30/09/2015) → allogreffe en mars 2016
- Corticosensible et chimiosensible

Points de MRD concernés : après schéma d'intensification

Technique Date	MRD CMF	MRD BM
23/03/2015	+ (1.10 ⁻³)	-
20/07/2015	+ (8.9.10 ⁻³)	-
08/03/2016	+ (8.10 ⁻⁴)	-
06/06/2016	+ (4.10 ⁻⁵)	-
04/10/2016	+ (4.10 ⁻⁵)	-

Il s'agit d'un LAIP informatif différent des hématogones, ce qui exclut ici la possibilité de rendre une MRD faussement positive par présence de précurseurs B lymphoïdes physiologiques. On peut donc légitimement se demander s'il n'y pas eu l'émergence d'un sous clone sans modification du phénotype mais avec évolution du marqueur en biologie

moléculaire (suivi avec le marqueur Ja26). Ce patient présente une MRD positive stable en CMF et va rechuter en juin 2017 pour la 3^{ème} fois. Ainsi l'évolution clinique du patient conforte la positivité de la MRD d'autant plus que l'utilisation cumulée et répétée de chimiothérapie lors des différentes rechutes, a pu faciliter l'émergence d'un sous clone.

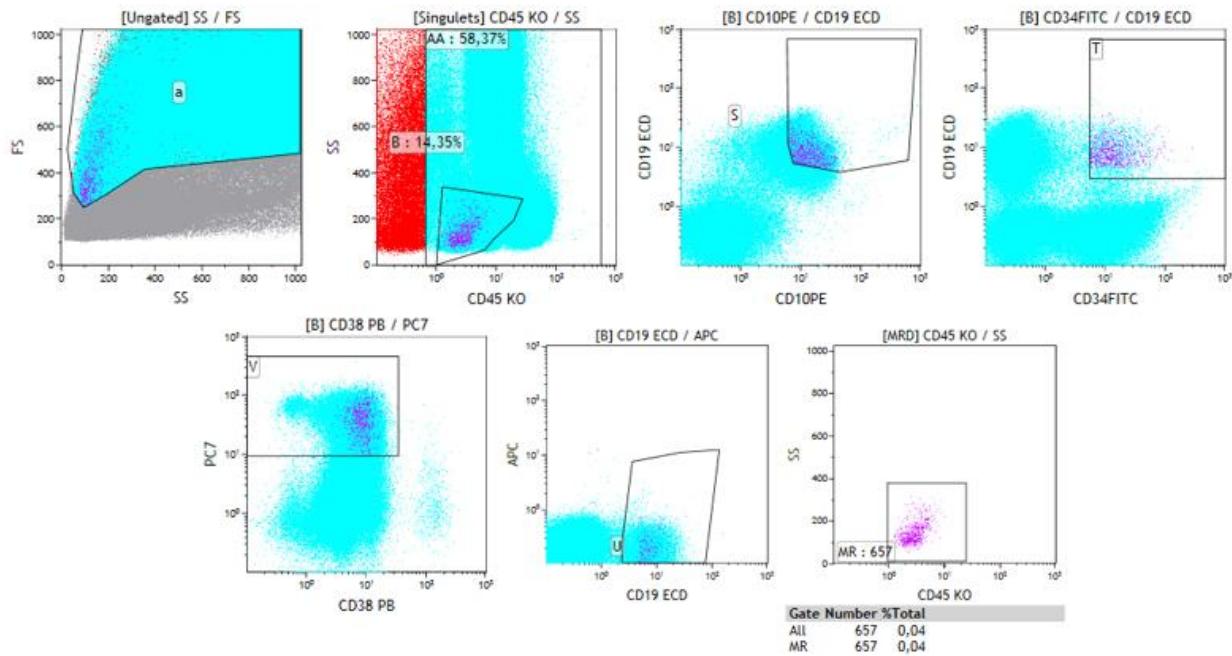


Figure 34 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/S/U/T/V), la représentation de 657 cellules blastiques résiduelles (MRD du 08/03/2016).

Cas n°5

Diagnostic initiale en 2010, rechute le 08/09/2014 : LAL BI (initialement BIII)

- Caryotype : chromosome dycentrique (9;20) + trisomie 8
- Biologie moléculaire : absence de données disponibles au diagnostic.
- Phénotype : positivité des marqueurs CD 19, 22, 79a.ic, 34, 38. Négativité du marqueur CD 10.
- Inclus dans le protocole FRALLE B (groupe B1)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : J15 post induction (13/10/2014)

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de 5.10^{-5}
- Résultat BM : MRD positive pour 2 marqueurs à 3.10^{-3} et $2.7.10^{-3}$

Ici la relecture montre la présence de 240 blastes résiduelles. Le fenêtrage du masque sur l'histogramme biparamétrique CD22/19 a été modifié (décalage vers la gauche) permettant d'englober également les cellules CD22 faible car l'immunophénotype de départ montre bien la faible expression de ce marqueur. La MRD est donc positive.

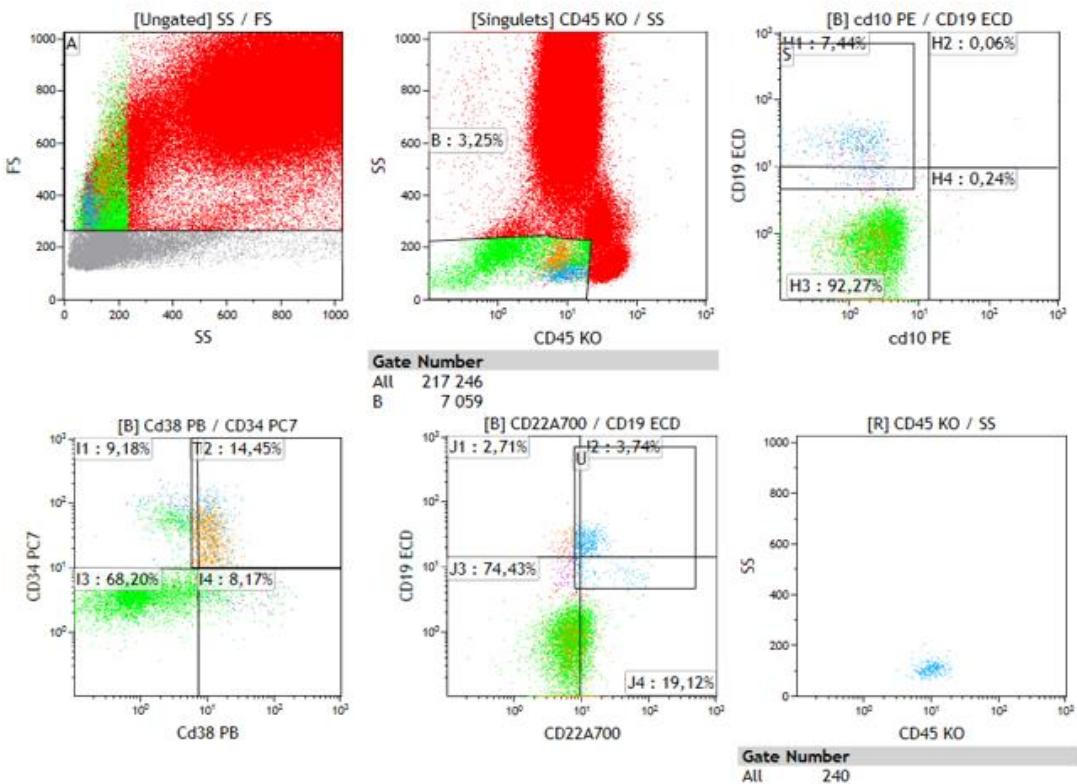


Figure 35 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/S/T2/U), la représentation de 240 cellules blastiques résiduelles

Cas n°7

Diagnostic le 03/12/2015 : LAL BII

- Caryotype : hypodiploïde (44,XX) avec translocation (6 ;14) (fusion IGH/ID4 en FISH)
- Phénotype : positivité des marqueurs CD 19, 20, 22, 24, 79a.ic, 10, 34, 38
- Inclus dans le protocole FRALLE B (groupe B1)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : J35 post induction (13/01/2016)

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de 4.10^{-5}
- Résultat BM : MRD positive pour le marqueur Kde à $1.27.10^{-2}$

La MRD après relecture reste négative (inférieur au seuil de 4.10^{-5}). L'hypothèse pouvant expliquer ce résultat est un glissement phénotypique, d'autant plus que le patient a rechuté le 15.12.2016 avec 86% de blastes au myélogramme. L'immunophénotypage à la rechute a mis en évidence une perte du CD20 et le gain du marqueur CD117 par rapport au diagnostic initial.

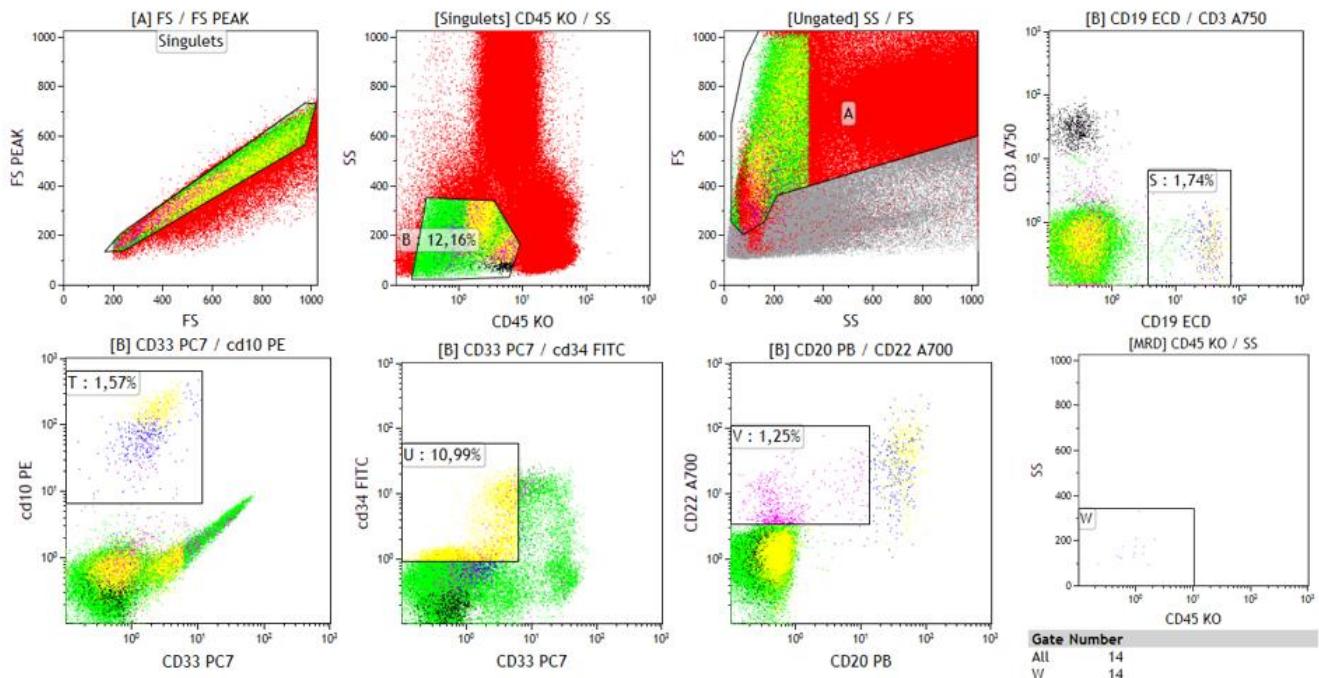


Figure 36 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/S/U/T/V), la représentation de 14 cellules blastiques résiduelles.

Cas n°15

Diagnostic le 17/10/2012 : LAL BI

- Caryotype : translocation t(4;11)
- Biologie moléculaire : réarrangement MLL (transcrit de fusion AF4-MLL)
- Phénotype : Positivité des marqueurs CD19, 22, 24, 79a.ic. Négativité des marqueurs CD10, 34. Présence d'un marqueur myéloïde aberrant CD65
- Inclus dans le protocole FRALLE B (groupe B1)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : 28.09.15

- Résultat CMF : MRD positive à $1.7 \cdot 10^{-4}$
- Résultat BM : MRD négative au seuil de 10^{-4}

Dans ce cas, la relecture montre que le LAIP n'est pas suffisamment informatif car même si le phénotype du diagnostic met en évidence la présence du CD65 celui-ci n'est pas exprimé par l'ensemble de la population blastique, on ne peut exclure les cellules CD65 négative. Le phénotype du cluster MRD peut correspondre à celui d'hématogones, la répartition hétérogène du nuage de points dans le cluster MRD conforte cette hypothèse. L'évolution clinique du patient a été favorable (sans rechute).

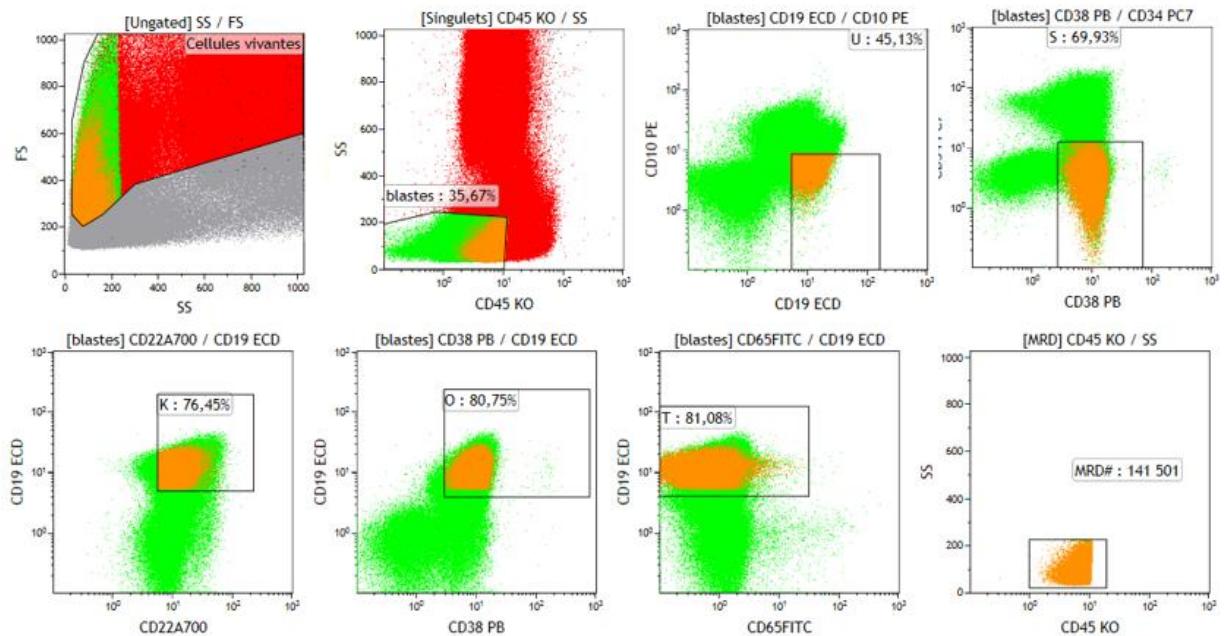


Figure 37 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre U/S/K/O/T), la représentation de 141 501 cellules résiduelles.

Cas n°24

Diagnostic le 14/11/2016 : LAL BII

- Caryotype : Hyperdiploïde
- FISH : iAMP21
- Phénotype : Positivité des marqueurs CD19, 22, 24, 10, 34, 38. Négativité du marqueur CD20.
- Inclus dans le protocole CAALL (groupe SR)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : 26.01.17

- Résultat CMF : MRD positive à 1.10^{-4} à la limite du seuil de 9.10^{-5}
- Résultat BM : MRD négative pour le marqueur JH6 et Kde au seuil de 10^{-5}

Après relecture, on retrouve toujours la persistance d'une MRD positive à la limite du seuil de quantification, on peut cependant interpréter avec prudence ce résultat pour deux raisons. Tout d'abord ce phénotype est très proche des hématogones et ne possèdent pas de marqueurs à fort pouvoir discriminant. Seules les intensités de fluorescence permettent de les différencier avec notamment le CD34 faible mais on peut quand même émettre l'hypothèse que ces cellules soient des hématogones précoces (stade 1). D'autre part, le nuage de points obtenu dans le cluster MRD est hétérogène et donc peu en faveur d'un profil clonal. Il doit donc s'agir d'un faux positif en CMF. Le patient n'a pas rechuté et est actuellement en rémission.

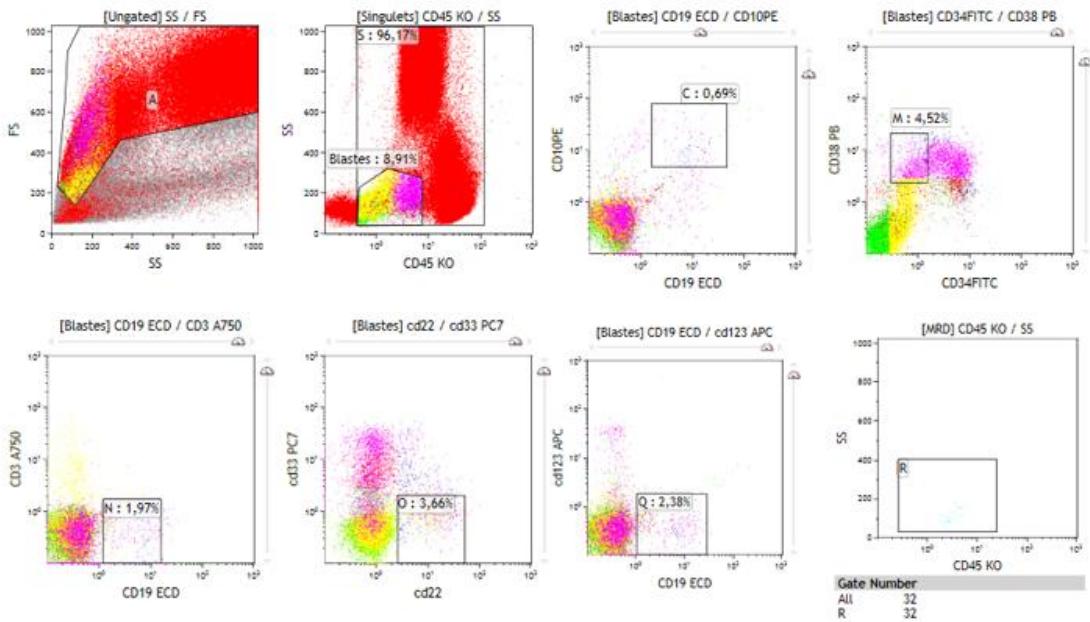


Figure 38 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre Blastes/C/M/N/O/Q), la représentation de 32 cellules blastiques résiduelles

Cas n°40

Diagnostic le 17/10/2017 : LAL BII

- Caryotype : Normal
- Phénotype : Positivité des marqueurs CD19, 22, 10, 34, 38faible, 79a.ic, 58.
- Inclus dans le protocole CAALL (groupe SR)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : J35 post induction (23.11.2017)

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de $1.3 \cdot 10^{-4}$
- Résultat BM : MRD positive à $2.5 \cdot 10^{-3}$ pour le marqueur Dd3 et négative pour le marqueur Kde au seuil de 10^{-3}

La réanalyse n'a pas pu mettre en évidence de MRD positive. On peut donc se demander s'il s'agit d'un faux négatif en CMF à savoir une modulation antigénique induite par la chimiothérapie aboutissant à la négativation d'un marqueur. L'autre possibilité étant la présence d'un faux positif en BM par amplification non spécifique. La richesse évaluée au myélogramme était normale et écarte un défaut de sensibilité.

Ce patient est passé du groupe standard risk (SR) au medium risk (MR) par la suite et n'a pas rechuté.

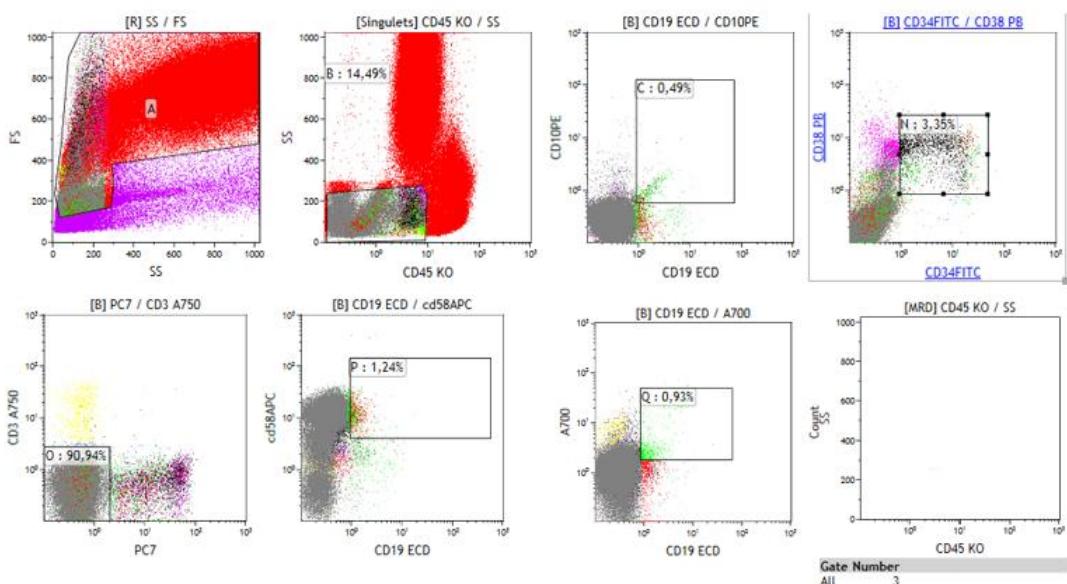


Figure 39 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/C/N/O/P/Q), la représentation de 3 cellules blastiques résiduelles (inférieur au seuil).

Cas n°43

Diagnostic le 21/12/2017 : LAL BII hyperleucocytaire

- Caryotype : del7p associé à un remaniement complexe des CH 12 et 13 impliquant ETV6
- Phénotype : Positivité des marqueurs CD19, 22, 10, 34, 58, 123faible, 79a.ic. Négativité du marqueur CD38
- Inclus dans le protocole CAALL (groupe MR)
- Corticosensible et chimiosensible

Point de MRD concerné : J35 post induction (30.01.2018)

- Résultat CMF : MRD négative au seuil de $2.4 \cdot 10^{-5}$
- Résultat BM : MRD positive à $4.9 \cdot 10^{-4}$ pour le marqueur jh6.

La relecture a permis de mettre en évidence une MRD positive en CMF après recadrage du masque C sur le graphe CD19/10 (décalage vers la gauche), les blastes étant CD19faible.

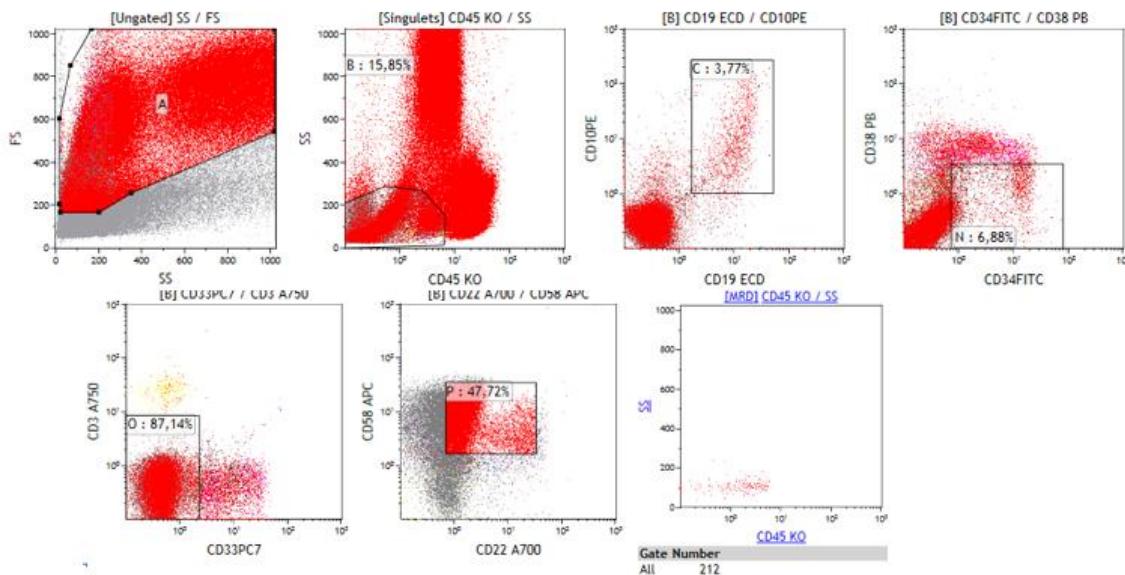


Figure 40 Masque d'analyse avec en graphique d'intersection CD45/SS (fenêtre B/C/N/O/P), la représentation de 212 cellules blastiques résiduelles

VIII. DISCUSSION

1. Corrélation des résultats

L'étude de comparaison des résultats de CMF par rapport à la BM a donné une concordance qualitative de 81%. Les études publiées récemment montrent une concordance globale similaire entre 80 et 84% (66) (71) (72).

Il est en revanche difficile de comparer les différentes études entre elles pour plusieurs raisons. Tout d'abord, les seuils utilisés pour affirmer la positivité d'une MRD sont différents. Le seuil de positivité était fixé à 10^{-4} dans l'étude publiée par Garand et al et à 10^{-3} dans l'étude de Thorn et al ce qui limite le nombre de faux négatifs en CMF en lien avec un défaut de sensibilité. Notre choix de ne pas fixer de seuil de positivité (en dehors du seuil imposé par la technique) a été décidé dans le but de pouvoir comparer davantage de MRD quantifiables et d'obtenir des effectifs suffisants. D'autres paramètres diffèrent selon les études : les techniques de CMF sur certains aspects (panels d'anticorps, nombre de couleurs du cytomètre...), inclusion des patients (uniquement les hauts risques dans l'étude de Garand et al), effectifs (essais multicentriques vs monocentriques).

L'autre problème imputable à notre étude étant le fait que l'analyse en CMF et BM soit réalisée sur deux aspirations de moelle distinctes et donc avec des degrés d'hémodilution potentiellement différent. En effet, on connaît l'impact de l'hémodilution sur la justesse du résultat augmentant ainsi le risque de discordance.

L'analyse quantitative a montré une corrélation entre les résultats de MRD positifs en CMF et en BM bien qu'il faut quand même souligner l'effectif faible utilisé dans notre étude. La représentation de Bland-Altman a montré une concordance satisfaisante avec un biais

négatif (-0.36) montrant des taux de MRD en BM légèrement plus élevés par rapport à ceux de CMF. L'analyse en BM ne permet pas de distinguer les cellules leucémiques viables des cellules non-viables alors que l'analyse en CMF ne travaille que sur des cellules vivantes. Il est donc possible de quantifier des réarrangements d'IGH et/ou du TCR de cellules en apoptose pouvant éventuellement expliquer cette majoration.

1.1. Discordance CMF négative/ BM positive

6% des prélèvements (soit 4 MRD) ont été retrouvés négatifs en CMF et positif en BM. Pour 2 d'entre eux, l'hypothèse évoquée pour expliquer cette discordance était un défaut de sensibilité. La technique de CMF a besoin de 20 cellules pour définir un cluster MRD comme positif, là où une seule cellule peut suffire en BM pour détecter une MRD positive. De plus, la technique de BM peut travailler sur de l'ADN issue de cellules non viables (en apoptose), ce qui n'est pas le cas de la technique de CMF. Les MRD positives de BM sont donc généralement basses comme c'est le cas pour le patient n°30 avec une MRD positive en BM à 2.10^{-5} pour le marqueur JH4 alors que le seuil de sensibilité de la technique en CMF est de 5.10^{-5} . Ainsi la technique de biologie moléculaire détecte un signal juste en dessous de la limite de sensibilité de la technique de CMF.

Ce défaut de sensibilité de la CMF peut s'expliquer en partie par la qualité du prélèvement lorsque le prélèvement est partiellement hémodiluée. C'était le cas pour 2 prélèvements où l'examen cytologique mettait en évidence une richesse cellulaire diminuée avec un nombre de mégacaryocytes diminué. Ces 2 faux négatifs n'ont en revanche pas d'impact clinique puisque les MRD sont inférieurs à 10^{-4} .

Pour le cas n°7, il s'agit ici probablement d'un phénomène de glissement antigénique, à savoir que le LAIP établit au diagnostic a changé (ex : perte d'expression d'un marqueur et/ou gain d'expression d'un autre), le cluster MRD établit ne permettra plus la détection des cellules blastiques.

Enfin, l'autre possibilité, pour un résultat négatif en CMF et positif en BM est un résultat faux positif en BM. Dans des situations de régénération médullaire post chimiothérapie où les

hématogones prolifèrent massivement, certains réarrangement de gènes Ig/TCR, bien que spécifiques à un patient donné, présentent de telles similitudes avec les réarrangements du répertoire Ig /TCR physiologique qu'une amplification non spécifique peut se produire à partir de lymphocytes normaux. Par conséquent, il se peut qu'une partie des cas discordants ne soient pas des faux négatifs en CMF, mais plutôt des faux positifs en PCR.

1.2. Discordance CMF positive / BM négative

12.5% des MRD (8/64) sont positives en CMF et négatives en BM. Parmi les huit MRD, cinq concernent le même patient (cas n°2) et l'évolution clinique ainsi que l'interprétation des résultats ont montré que le résultat était en faveur d'un résultat faussement négatif en BM et non d'un résultat faussement positif en CMF.

En revanche, les 3 autres MRD (cas n° 15, 24, 39) semblent être des faux positifs en CMF, en effet les blastes ne présentaient pas de LAIP suffisamment discriminant pour les différencier des hématogones. L'évolution clinique favorable (sans rechute) de ces patients corrobore cette hypothèse.

2. Avantages et inconvénients des deux techniques.

2.1. Rapidité d'analyse

La rapidité de rendu de résultat est particulièrement intéressante d'un point de vue clinique. La découverte d'une MRD positive peut faire changer de groupe de risque le patient et ainsi modifier la stratégie thérapeutique du patient (allogreffe, intensification de la chimiothérapie...). Il est donc important d'obtenir un résultat rapidement afin de permettre une prise en charge rapide et optimale particulièrement dans les points de suivi précoce de la réponse au traitement. La CMF ne nécessite pas de "design" d'amorces propres au patient contrairement à la BM par réarrangements Ig/TCR. La technique de CMF est plus intéressante car elle permet de rendre un résultat de MRD aux cliniciens plus rapidement (en 3 à 4h) alors que la BM nécessite environ 2 semaines.

2.2. Faisabilité de la technique

La technique de CMF a pour inconvénient de devoir être réalisée sur des cellules vivantes, ainsi le délai pré-analytique doit être le plus faible possible afin de pouvoir analyser un maximum de cellules. Mais son avantage est que la technique est applicable à la quasi-totalité des patients. Ainsi dans notre étude l'ensemble des MRD prescrites ont pu être analysés en CMF. En BM, la technique est applicable à la grande majorité des cas (90 à 95% des cas). On constate un problème analytique pour 2 patients seulement à savoir un échec de l'extraction de l'ADN pour le cas n°4 et un échec de séquençage pour le cas n°11.

L'autre avantage de la CMF est la possibilité de quantifier la MRD dans la mesure du possible, même si le phénotype du diagnostic n'est pas disponible (pas le cas de la technique de BM). En effet, même si dans des conditions optimales la comparaison de l'immunophénotype du blaste au point de suivi à celui au diagnostic est préférable, une

comparaison systématique de l'échantillon à une base de données de moelles de références permet d'identifier et quantifier les cellules leucémiques.

2.3. Sensibilité

Comme vu précédemment, la sensibilité va dépendre en grande partie de la qualité du prélèvement. Pour atteindre un seuil de sensibilité de 10^{-5} en CMF (cluster de 20 cellules), il va falloir analyser 2.10^6 cellules ce qui n'est pas toujours réalisable notamment à cause de l'hémodilution du prélèvement. La technique de BM présente donc une sensibilité globalement supérieure à la technique de CMF. Les seuils décisionnels pour la stratification thérapeutique ne nécessite pas de descendre en dessous de 10^{-4} , l'impact clinique actuel est donc limité. De par sa plus grande capacité à détecter de faibles niveaux de MRD, la PCR reste préférable pour révéler des résultats faux négatifs rendus en CMF. Cela pourrait être particulièrement utile dans le but d'identifier les patients à faible risque pour lesquels une désescalade thérapeutique pourrait être envisagée (73).

2.4. Spécificité

La spécificité de la technique de CMF dépend de la capacité de discrimination des blastes avec progéniteurs hématopoïétiques. Cette spécificité tend à s'améliorer avec l'augmentation du nombre de fluorochromes disponibles pour détecter les LAIP et l'apport de nouveaux marqueurs. En on observe que sur les 8 « faux positifs » recensés seulement un, a été observé après ajout des marqueurs CD58 et CD123.

La principale difficulté en CMF ressortant de cette étude correspond à la difficulté de différencier les hématogones des blastes pathologiques. Il a été impossible de rendre une MRD positive ou négative pour 10 prélèvements s'expliquant par la similitude du phénotype des blastes mis en évidence au diagnostic avec le phénotype des hématogones. On peut cependant observer qu'aucune MRD n'a posé de problème de discrimination après octobre 2016.

Différentes améliorations de la technique ont été mises au point pour expliquer cela :

➤ Amélioration des connaissances de l'hématogone et de son évolution phénotypique :

Ce sont des cellules présentes à l'état normal dans la moelle osseuse, et le reflet de la maturation cellulaire lymphoïde B. Ils sont plus particulièrement présents dans les moelles d'enfants et dans les moelles en phase de régénération post-aplasie ou postgreffe de CSH. Ils sont caractérisés par un continuum de maturation des premiers précurseurs de la lignée B vers les lymphocytes B matures.

Plusieurs stades de maturation sont décrits dans la littérature, mais il s'agit là d'un découpage évolutif, car il n'existe pas un phénotype figé mais plutôt une évolution dynamique des antigènes de manière continue (74) (Figure 41).

- **Hématogone de stade 1 (stade précoce)** : ils expriment les marqueurs d'immaturité TdT et le CD34. De plus, ils expriment le CD19, CD22 faible, un CD10 fort et un CD45 faible. Le CD20 n'est pas exprimé.
- **Hématogone de stade 2 (intermédiaire)** : augmentation progressive de l'expression du CD45, du CD19, CD20 et du CD22 et perte d'expression des marqueurs TdT et CD34. Le CD 10 diminue progressivement et le CD38 est un peu moins fort.
- **Hématogone de stade 3 (tardif)** : le CD10 diminue et sa négativité signera le passage en lymphocyte mature, le CD 38 est faiblement exprimé (sauf pour les plasmocytes). Le CD20 et 22 sont fortement exprimés. Apparition progressive des immunoglobulines exprimées à la surface.

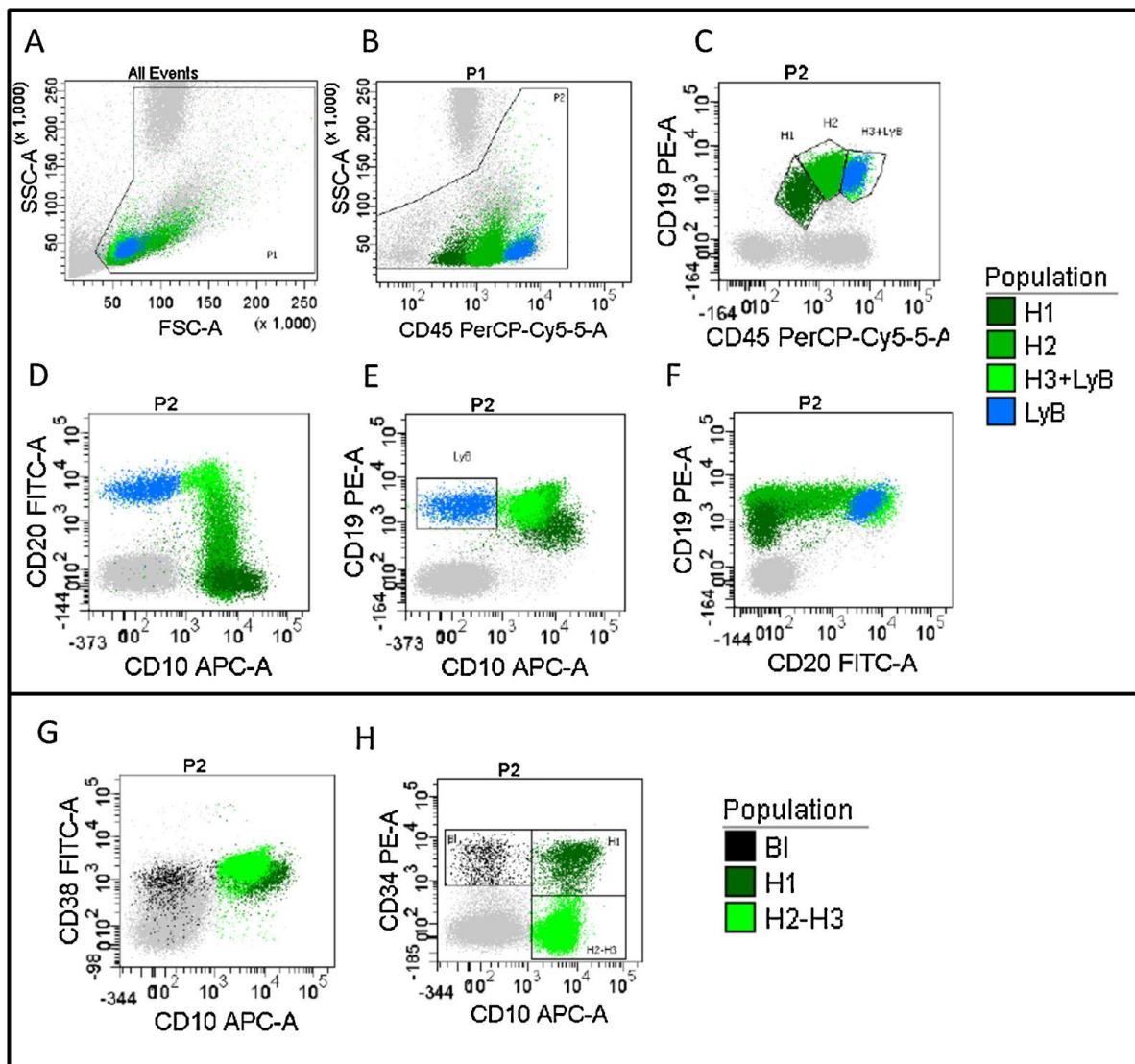


Figure 41 Exemple d'analyse en CMF de moelle osseuse montrant l'évolution phénotypique de l'hématogone (74)
H1 en vert foncé : stade 1 H2 et H3 en vert clair : stade 2 et 3 LyB en bleu : Lymphocytes matures

➤ Le merging :

Il s'agit d'une fonctionnalité du logiciel Kaluza permettant de fusionner les données issues de plusieurs moelles dites normales (dont les moelles post-chimiothérapies en phase de régénération) afin de disposer d'une banque de données servant de référentiel. On obtient ainsi une moelle virtuelle unique constitué d'un panel complet de marqueurs illustrant la voie de maturation des cellules lymphoïdes (notamment l'évolution de l'hématogone) que l'on confronte à notre moelle d'intérêt. Cela permet une meilleure discrimination entre l'hématogone de régénération et le blaste. Enfin, on peut constater des

variations dans l'intensité d'expression des LAIP entre le diagnostic et le suivi de la MRD (parfois chimio-induit) pouvant rendre l'identification des cellules blastiques moins évidente, si on se réfère au profil de base des blastes du diagnostic. Ainsi la superposition du phénotype d'intérêt aux moelles non pathologiques permet de mieux déceler ces phénomènes de modulation antigénique et d'éviter de rendre un faux négatif.

➤ Ajouts des marqueurs CD58 et CD123

Ces marqueurs dont l'utilité a été démontrée (65) (64) participent à une meilleure discrimination entre blastes et hématogones en augmentant la spécificité des LAIP. Ils participent à une meilleur caractérisation du phénotype du blaste ainsi on peut voir dans notre étude, qu'après ajout de ces deux marqueurs aucun résultat n'a été rendu « ininterprétable en raison de la non distinction entre le profil phénotypique du blaste et de l'hématogone ».

IX. PERSPECTIVES

1. Axes d'amélioration de la technique

1.1. Standardisation

Il existe un manque de standardisation sur de nombreux aspects : préparation des échantillons, types de cytomètres, choix des panels d'anticorps utilisés, seuils de quantification, stratégie d'analyse. L'innovation et la complexité croissantes des cytomètres avec l'analyse possible en 10 couleurs (bientôt 13 couleurs) et la diversité des réactifs disponibles rendent nécessaire la définition de stratégies pour aboutir à une bonne reproductibilité inter-laboratoires.

Ainsi il existe déjà un certain nombre d'études ayant réalisé des essais multicentriques dans le but de standardiser l'analyse (75) (76) (77). Ces études confirment la capacité à obtenir des résultats satisfaisants en termes de sensibilité et reproductibilité.

En France le Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies (GEIL) travaille sur l'harmonisation des centres Français à travers les réglages et le suivi des performances des cytomètres avec notamment des procédures concernant le passage des billes Flow-Set Pro pour une standardisation des systèmes, l'utilisation de contrôle de qualité ou encore l'uniformisation du traitement des échantillons avant analyse.

Le consortium EuroFlow est un réseau européen créé dans le but d'optimiser et standardiser les analyses en CMF. Il travaille sur la standardisation des paramétrages des automates de cytométrie, la préparation des échantillons, les procédures d'immunomarquage, ainsi que l'analyse automatisée des données. L'équipe de Theunissen et *al* en collaboration avec Euroflow a réalisé une étude en deux phases. La première phase a permis d'établir un

protocole visant à comparer les différents panels d'anticorps afin de choisir les anticorps les plus adaptés dans la discrimination des blastes de LAL B et les précurseurs hématopoïétiques de régénération. Une fois ce panel défini, il a été utilisé dans une étude de comparaison de la MRD entre les techniques de CMF et BM. Le taux de concordance obtenu est de 93% avec une sensibilité similaire entre les deux techniques (proche de 10^{-5}) et l'acquisition de plus de 4.10^6 de cellules (77).

La standardisation de la technique devient de plus en plus importante pour assurer la reproductibilité des résultats entre différents laboratoires afin d'intégrer la mesure de la MRD par CMF dans les essais cliniques. La poursuite de cette collaboration entre différents réseaux reste donc indispensable.

1.2. Apport de nouveaux marqueurs

Les marqueurs CD123 et CD58 ont considérablement amélioré la caractérisation des cellules blastiques par rapport aux hématogones en obtenant des LAIP plus spécifique.

L'antigène CD81 est une molécule de surface qui régule l'expression du CD19 et forme un complexe moléculaire CD19-CD21-CD81 impliqué dans la transduction du signal des cellules B (78). Il est classiquement fortement exprimé par les hématogones de stade 1 et son expression diminue avec la maturation. Muzzafar et *al* a mis en évidence la sous-expression du CD81 dans les lymphoblastes des LALB en particulier pour les cas CD34 positif (78).

Il est important de prendre en compte également l'intensité de fluorescence des marqueurs comme le montre l'étude de Nagant et *al*. Elle propose l'utilisation d'un ratio de l'intensité moyenne de fluorescence CD81/CD58. Une sous expression du CD81 associée à une hyperexpression du CD58 serait en faveur d'un profil pathologique. Le ratio CD81/58 étant proche de 0.2 pour des lymphoblastes de LAL B et très élevé (>300) pour les hématogones. Cette approche constitue un outil supplémentaire pour discriminer ces deux populations (79).

Le CD66c est un marqueur de cellules myéloïdes, dont l'expression augmente après l'activation cellulaire. Son expression dans les LAL B est associée à la présence de BCR-ABL1 ou d'une hyperdiploïdie bien que non spécifique d'une anomalie moléculaire (80). Il s'agit d'un marqueur myéloïde fréquemment exprimé par les lymphoblastes dans les LAL B de l'enfant (81).

1.3. Fonctionnalités des logiciels de traitement de données.

La cytométrie en flux a connu une forte évolution technologique à la fois au niveau des cytomètres mais aussi de la variété des fluorochromes disponibles. L'analyse s'est donc complexifiée rendant les données plus difficiles à interpréter. Les nouveaux logiciels permettent de prendre en compte ces nouveaux éléments. Ainsi le logiciel Kaluza® intègre de nouvelles fonctionnalités pas encore utilisées en routine car l'exploitation de ces données reste complexe et requiert une formation bio-informatique approfondie. En voici deux exemples :

1.3.1. Radar plot

Le radar plot permet d'afficher en 2 dimensions les évènements présents dans un espace à N dimensions, chaque dimension correspondant à un paramètre mesuré pour chaque cellule (SSC, FSC, CD). Cela facilite la visualisation des résultats d'un immunophénotypage complexe en rassemblant un maximum de marqueurs sur un même graphique alors que classiquement cela requiert l'analyse de nombreux histogrammes biparamétriques. Cela peut également favoriser la séparation des différentes populations, l'opérateur pouvant lui-même modifier le nombre d'axes et leur positionnement.

On peut également réaliser des fenêtres sur ce Radar Plot (Figure 42) : cela permet alors de visualiser les populations d'intérêt sur les autres histogrammes. En faisant bouger une fenêtre sur le Radar Plot, on peut suivre l'évolution des différents marqueurs. Ainsi pour une population cellulaire donnée on pourrait étudier l'évolution de ses marqueurs. Dans le cadre de recherche de MRD cela paraît intéressant pour étudier la voie de maturation des

lymphoblastes. Mais cette technique demande du temps supplémentaire et une expérience suffisante pour pouvoir l'exploiter pleinement.

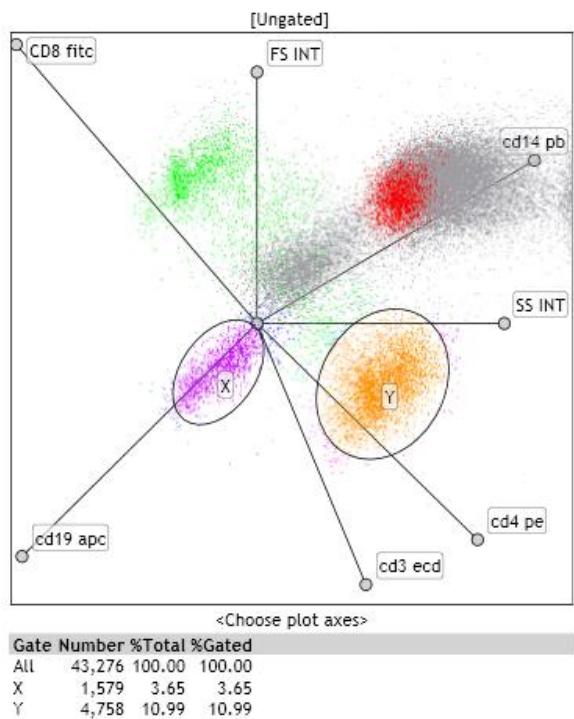


Figure 42 Exemple de radar plot avec fenêtrage sur les populations X et Y (Instructions for use Kaluza Flow Cytometry Analysis Software)

1.3.2. SPADE

SPADE (Spanning-tree Progression Analysis of Density-normalized Events) est une nouvelle approche dans l'analyse des nuages de points sous forme d'arbre en plusieurs dimensions. Il s'agit de la représentation de l'intensité d'expression d'un marqueur sur les cellules analysées, reflet de l'hétérogénéité cellulaire dans le but de comparer ce profil à un profil témoin. Dans le cadre des LAL B, cet outil pourrait être intéressant pour différencier une cellule leucémique d'un hématogone.

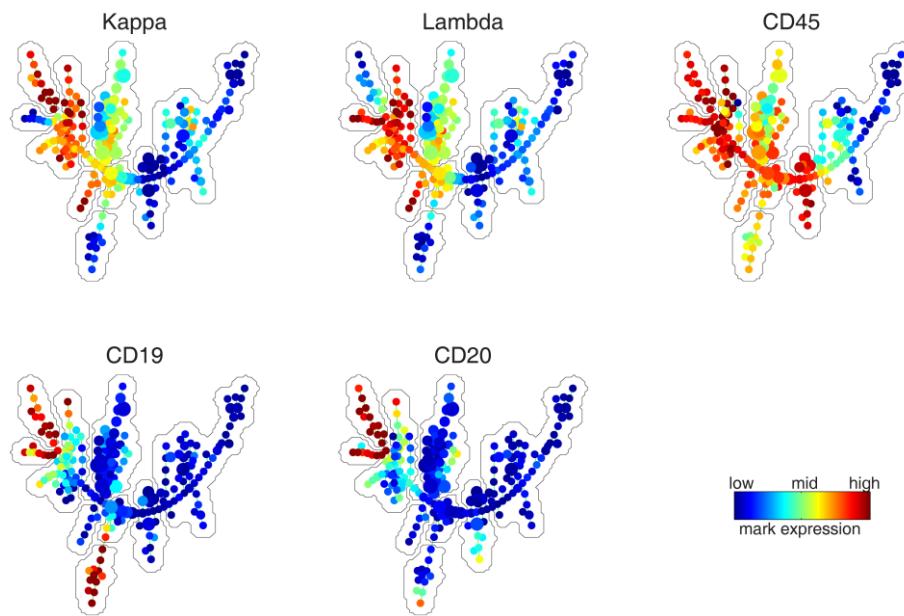


Figure 43 Exemple de représentation SPADE (82)

Dans cette exemple on peut visualiser les populations de cellules B matures au niveau des deux branches à l'extrême nord-ouest, exprimant à la fois le CD20 et le CD19 et de manière exclusive, la chaîne Kappa ou Lambda. La branche la plus au sud exprimant le CD19 mais pas les marqueurs K/λ et CD20, représente les cellules B immatures.

2. Apport du Next generation sequencing (NGS)

Le NGS ou séquençage haut débit, est une technique qui permet le séquençage rapide de gènes entiers (exon + intron) et d'augmenter la sensibilité de détection des mutations.

Actuellement, le NGS peut être utilisé dans diverses approches : séquençage du génome complet, de l'exome, analyses de transcriptome et du méthylome, étude de la variabilité génétique et des polymorphismes, ou enfin reséquençage ciblé d'un panel de gènes ou de régions spécifiques d'un panel de gènes (83).

Son utilisation en hématologie a permis de découvrir de nouvelles mutations (ex : mutation IDH1 dans les LAM) et de montrer l'importante hétérogénéité clonale puisque la technique permet une quantification précise du pourcentage d'allèles mutés et une estimation des populations clonales tumorales (83).

En caractérisant le répertoire des séquences d'IgH dans cinquante et un échantillons diagnostiques de LAL-B pédiatriques, Gawad et *al* ont pu montrer que les cellules B précurseurs continuaient leur recombinaison du gène IgH après la transformation leucémique. Cette évolution des séquences d'IgH suit un modèle d'exclusion allélique puisqu'un seul des deux loci d'IgH réarrangés montre une recombinaison en cours. La majorité de ces sous-clones évolués sont retrouvés à une faible fréquence et sont donc indétectables par les techniques standard de diagnostic (84).

Les différentes études ont montré une forte corrélation quantitative et qualitative entre les résultats obtenus en NGS en comparaison avec la CMF avec une meilleure sensibilité (85) (86). Cette technique émergente et prometteuse présente plusieurs inconvénients : analyse bioinformatique complexe, couteuse et peu accessible actuellement. Enfin, il reste encore à préciser dans de nouvelles études si la recherche et quantification de très faibles fréquences alléliques constituent un réel intérêt dans la prise en charge clinique du patient.

X. CONCLUSION

L'évaluation de la maladie résiduelle dans les LAL B et plus généralement dans les hémopathies malignes tient une place importante dans l'évaluation du risque de rechute et la stratification thérapeutique. Ainsi, des seuils décisionnels de MRD sont établis dans les protocoles thérapeutiques et reposent actuellement sur les résultats obtenus en biologie moléculaire. Celle-ci est la technique de référence mais cette technique possède quelques limites : le délai de rendu de résultats, le coût, elle n'est pas applicable à l'ensemble des patients les risques de faux positif par amplification non spécifique ou encore de faux négatif par évolution clonale.

C'est pourquoi le développement et l'amélioration de la technique de cytométrie en flux reste indispensable comme le montre les résultats de notre étude comparative. En effet, avec une concordance observée de 81% entre les deux, et après analyse des discordances, il apparaît que ses deux techniques s'avèrent complémentaires. Tout d'abord la technique de CMF permet de pallier une absence de marqueurs identifiables en biologie moléculaire dès le diagnostic ou lors d'un phénomène d'évolution clonale des cibles IGH/TCR. La BM peut également être mise à défaut lors d'un problème analytique (échec d'extraction d'ADN ou de séquençage par exemple). De l'autre côté la technique de BM est plus sensible notamment parce qu'elle a besoin de moins de cellules clonales pour obtenir une MRD positive (20 cellules nécessaires en CMF) et cela s'avère utile en cas d'hémodilution partielle du prélèvement. La BM n'est également pas confronté à un défaut de spécificité lorsque l'immunophénotype du blaste est similaire à celui des hématogones.

Ces deux techniques présentent donc des spécificités et leur complémentarité paraît intéressante dans le but d'obtenir une maladie résiduelle la plus fiable possible afin de permettre une prise en charge optimale du patient.

Annexe 1 Recueil des données clinico-biologiques de l'étude (simplifié)

Patients	Date de naissance	Sexe	Date découverte	Classification EGIL	Maladie résiduelle		Sensibilité		Sensibilité		
					Date CMF	Résultats CMF	Résultats BM	M1	M2	M1	M2
1	29/04/2006	M	28/08/2014	BII	13/10/2014 Négative	3,00E-04 Positive	5,10E-04			1,00E-05	5,00E-04
					10/11/2014 Négative	3,00E-05 Négative				1,00E-05	1,00E-04
					04/12/2014 Négative	6,00E-05 Négative				1,00E-05	1,00E-04
					29/12/2014 Négative	3,50E-05 Négative				1,00E-05	1,00E-04
					26/03/2015 Négative	4,00E-05 Négative				1,00E-05	5,00E-04
					18/05/2017 Non interprétable	Négative				5,00E-04	1,00E-05
2	10/06/2013	M	27/10/2014	BII	27/11/2014 Positive	6,00E-04	5,00E-05 NF				
					18/12/2014 Positive	1,00E-04	9,00E-06 Positive	5,00E-04	7,00E-04		
					12/01/2015 Positive	4,37E-04	6,28E-05 Positive	3,10E-04 Négative		1,00E-03	
					23/03/2015 Positive	1,00E-03	Positive non quantifiable	Négative		5,00E-04	1,00E-05
					20/07/2015 Positive	8,90E-03	Négative			1,00E-05	
					08/03/2016 Positive	8,00E-04	Négative			1,00E-04	
					06/06/2016 Positive	4,00E-05	3,00E-05 Négative			1,00E-04	1,00E-05
					04/10/2016 Positive	4,00E-05	3,00E-05 Négative			1,00E-05	1,00E-05
					22/11/2016 Négative	6,00E-05	Négative			1,00E-05	1,00E-05
3	27/01/2012	F	08/11/2014	BII	16/12/2014 Négative	1,00E-04 Positive	3,00E-04	4,00E-04			
					19/01/2015 Négative	6,80E-05 Positive	7,00E-05	9,00E-05			
					16/03/2015 Négative	2,00E-05	Négative			1,00E-05	
					21/05/2015 Négative	4,80E-05	négative			1,00E-05	1,00E-05
					18/06/2015 Négative	2,00E-05	négative			1,00E-04	1,00E-05
					16/07/2015 Négative	5,00E-05	Négative			1,00E-05	
					10/09/2015 Positive	4,99E-04	1,50E-05 Négative			1,00E-05	
							20				
4	19/04/2009	M	01/12/2014	BII	12/01/2015 Négative	6,00E-05	Négative			5,00E-04	
					24/10/2017 Négative	1,40E-04	Echec extraction ADN				
5	04/07/1998	F	08/09/2014	BII							

		rechute			
6	09/09/2010 M	27/08/2015 BII	08/10/2015 Négative	5,00E-05 Positive	3,00E-03 2,70E-03
		06/11/2014 Positive	5,00E-05	2,00E-05 Positive	3,00E-04 2,00E-04
7	11/10/2000 F	03/12/2015 BII	13/01/2016 Negative	9,00E-05 Négative	5,00E-04
8	29/09/2007 F	06/08/2015 BIII	15/12/2016	2,70E-05 Négative	1,00E-04
		31/08/2015 Negative	2,50E-04		1,00E-05
9	29/07/2012 F	25/08/2014 BII	16/09/2015 Négative	7,70E-05 Négative	5,00E-04
		22/09/2015 Négative	9,00E-05 NF		5,00E-04
10	01/10/2004 F	29/10/2014 BII	07/10/2014 Négative	4,00E-04 Positive non quantifiable	5,00E-04
		29/02/2016 Non interpré	5,90E-04	Négative	1,00E-05
11	10/12/2003 M	09/07/2014 BII	25/02/2015 Non interpré	2,00E-04	1,00E-04
		06/07/2015 Non interpré	1,00E-02	Négative	1,00E-05
12	27/03/2005 M	rechute	15/10/2014 Négative	1,70E-04 échec de séquençage	
		28/11/2015 BII	14/01/2016 Positive	2,90E-05 2,40E-05 Négative	1,00E-05
13	06/10/2000 F	08/12/2015 BI	29/02/2016 Non interpré	3,10E-03 6,90E-04 Négative	1,00E-04 1,00E-05
		24/11/2016 Positive	6,49E-03	3,50E-05 NF	
14	24/06/2008 F	02/02/2015 BII	19/01/2016 Négative	8,00E-05 Négative	1,00E-05
15	05/01/2011 F	16/10/2012 BI	16/03/2015 Négative	Négative	1,00E-05 1,00E-02
16	20/04/1998 M	16/04/2012 BII	28/09/2015 Positive	1,70E-04	1,00E-04
		15/04/2015 Non interpré	7,00E-05	2,30E-05 Négative	1,00E-05

17	11/11/2002 F	20/04/2015 BII	08/06/2015 Non interprétable	Positive	9,60E-02	1,36E-01
29/06/2015 Négative		2,20E-04 positive non quantifiable				
17/08/2015 Négative		6,00E-05 négative				
18	21/08/2011 F	19/05/2014 BII	19/05/2014 pas de MRD à J35	Négative	1,00E-02	1,00E-04
19	20/03/2005 M	01/10/2015 BII	Rechute de LAL Commune B 11/10/2010	26/10/2015 Positive	3,30E-02	Positive
						1,40E-02
				12/11/2015 Positive	3,00E-03	Positive
				17/11/2015 Positive	1,40E-04	Positive
				14/12/2015 NF		Négative
				04/01/2016 Négative	3,20E-04	Négative
				03/03/2016 Négative	1,10E-04	négative
				27/04/2016 Négative	3,20E-05	négative
				16/06/2017 Non interpré	2,50E-04	1,70E-04 NF
20	13/01/2008 F	14/04/2015 BII	J35 induction	NF		
21	22/04/2012 M	09/11/2015 BII			Négative	5,00E-04
				21/12/2015 Négative	4,90E-05	Négative
				16/02/2016 Négative	3,00E-05	Négative
22	03/10/2009 M	06/11/2014 BII	Rechute méninée précoce	06/11/2014 Négative	6,00E-05	Négative
23	17/12/2007 M	12/12/2015 BIV				1,00E-05
24	19/08/2008 F	18/11/2016 BII				
				26/12/2016 Négative	6,30E-05	Positive non quantifiable
				29/12/2016 Négative	1,00E-04	Positive non quantifiable
				26/01/2017 Positive	1,00E-04	Négative
25	13/03/2001 M	24/08/2016 BI				
26	12/10/2010 F	26/01/2016 BII				
				11/03/2016 Négative	3,00E-05	Négative
27	09/09/2011 F	19/07/2016 BII				
28	11/08/2015 F	28/04/2016 BI				

29	25/09/2001 F	22/09/2016 BII	17/05/2016 Positive	5,30E-04	Positive	3,00E-04	1,00E-05
30	12/08/2011 M	17/06/2016 BII	07/06/2016 Non interpré	3,30E-05	3,00E-05 Négative		
31	08/05/2005 M	27/05/2016 BII	03/11/2016 Négative	3,80E-05	Négative	1,00E-04	3,00E-05
32	14/04/2004 F	19/10/2016 BII	03/01/2017 Négative	2,60E-05	Négative		
33	31/03/2015 F	02/06/2016 BII	27/07/2016 Négative	7,50E-05	Positive non quantifiable	1,20E-04	1,00E-04
34	11/04/2016 M	08/11/2017 BII	25/08/2016 Négative	5,00E-05	Positive	2,00E-05	Négatif
35	24/04/2013 M	26/05/2017 BII	18/10/2016 Négative	8,00E-05	Positive non quantifiable		1,00E-04
36	05/09/2012 M	28/02/2017 BII	28/11/2016 Négative	5,00E-05	Négative	3,40E-04	NF
37	15/06/2013 M	16/08/2017 BII	19/06/2017 Négative	6,00E-05	Négative	1,00E-04	1,00E-04
38	14/01/2011 M	BII	12/07/2016 Non interpré	3,00E-03	Négative		5,00E-04
39	20/07/2015 M	21/03/2017 BII	20/11/2017 0,35%	0,35%	NF		
40	14/06/2015 F	17/10/2017 BII	17/01/2018 NEGATIVE	4,40E-05	Négative	1,00E-04	1,00E-04
			14/09/2017 NEGATIVE	1,20E-04	Négative	1,00E-04	1,00E-05
			06/03/2017 POSITIVE	75%	NF		
			10/03/2007 POSITIVE	47,50%	NF		
			25/08/2017 NEGATIVE	3,00E-05	NF		
			26/09/2017 NEGATIVE	7,00E-05	Négative	1,00E-04	1,00E-04
			02/05/2017 NEGATIVE	5,00E-05	Négative	1,00E-04	1,00E-04
			24/07/2017 POSITIVE	3,00E-03	Positive non quantifiable		
			23/11/2017 Négative	1,30E-04	Positive	2,50E-01	
			10/01/2018 Négative	1,20E-04	Négative	5,00E-04	1,00E-04

41	18/06/2010	M	20/06/2017	BI				
			27/07/2017	NEGATIVE	2.00E-04	Négative	1.00E-03	1.00E-04
			25/08/2017	NEGATIVE	7.00E-05	Négative	1.00E-04	1.00E-05
			04/12/2017	NEGATIVE	5.00E-04	NF	5.00E-04	5.00E-04
42	17/12/2015	M	14/09/2017	BI				
			04/01/2018	NEGATIVE	1.10E-04	Négative	1.00E-04	5.00E-04
			NEGATIVE		4.35E-04	NF		
43	29/06/2015	F	21/12/2017	BI				
			30/01/2018	NEGATIVE	2.40E-05	Positive	4.90E-04	

BIBLIOGRAPHIE

1. Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol*. janv 2007;18 Suppl 1.
2. Fernandes A. Hématopoïèse - Knoow [Internet]. [cité 15 juin 2018]. Disponible sur: <http://knoow.net/fr/sciences-terre-vie/biologie/hematopoiese/>
3. Schroeder HW, Cavacini L. Structure and Function of Immunoglobulins. *J Allergy Clin Immunol*. févr 2010;125(2 0 2):S41-52.
4. Ruiz M. IMGT, the international ImMunoGeneTics database. *Nucleic Acids Res*. 1 janv 2000;28(1):219-21.
5. Rizzo D. Étude des paramètres biologiques influençant l'histoire naturelle de la leucémie lymphoïde chronique : expression du CD45, sécrétion d'une IgM monoclonale et dérégulation de ZAP70 [Internet]. Limoges; 2014. Disponible sur: <http://www.theses.fr/2014LIMO310A>
6. Michael J.H. Ratcliffe. *Encyclopedia of Immunobiology*. Academic Press; 2016. 3161 p.
7. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, Revised 4th Edition. Vol. 2. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, Thiele J;
8. Linet MS, Ries LA, Smith MA, Tarone RE, Devesa SS. Cancer surveillance series: recent trends in childhood cancer incidence and mortality in the United States. *J Natl Cancer Inst*. 16 juin 1999;91(12):1051-8.
9. Alain Monnereau, Laurent Remontet, Marc Maynadié, Florence Binder-Foucard, Aurélien Belot, Xavier Troussard, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 [Internet]. [cité 16 mars 2018]. Disponible sur: <http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/hemopathies-malignes-cancers-du-sang/leucemies-aigues/maladie/avant-propos.html>

10. Brigitte LACOUR, Emmanuel DESANDES, Sandra GUISOU. Registre national des tumeurs solides de l'enfant [Internet]. Disponible sur: <http://www.chu-nancy.fr/rntse/resultats.html>
11. Sermage-Faure C. Incidence des leucémies de l'enfant en fonction de la proximité et des caractéristiques générales de diverses sources d'expositions environnementales [Internet] [phdthesis]. Université Paris Sud - Paris XI; 2012 [cité 7 sept 2018]. Disponible sur: <https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00779494/document>
12. Maynadié M, Troussard X. Épidémiologie des leucémies aiguës. [/data/revues/1773035X/v2015i471/S1773035X1530071X/](http://data/revues/1773035X/v2015i471/S1773035X1530071X/) [Internet]. 8 avr 2015; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/en/article/968285>
13. Stiller CA. Epidemiology and genetics of childhood cancer. *Oncogene*. 23 août 2004;23(38):6429-44.
14. Dame C. Pediatric Hematology, Third Edition. In Robert J. Arceci Ian M. Hann Owen P. Smith; 2007. p. 548-61.
15. Levato L, Molica S. Rituximab in the management of acute lymphoblastic leukemia. *Expert Opin Biol Ther*. févr 2018;18(2):221-6.
16. Cernan M, Szotkowski T, Pikalova Z. Mixed-phenotype acute leukemia: state-of-the-art of the diagnosis, classification and treatment. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czechoslov*. sept 2017;161(3):234-41.
17. Bene M, Castoldi G, Knapp W, Ludwig W-D, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK*. 1 nov 1995;9:1783-6.
18. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Beau MML, 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.
19. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, Risk Stratification, and Therapy of Pediatric Acute Leukemias: An Update. *J Clin Oncol*. 10 févr 2011;29(5):551-65.
20. Crist W, Pullen J, Boyett J, Falletta J, Eys J van, Borowitz M, et al. Clinical and biologic features predict a poor prognosis in acute lymphoid leukemias in infants: a Pediatric Oncology Group Study. *Blood*. 1 janv 1986;67(1):135-40.

21. Sather HN. Age at diagnosis in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1986;14(3):166-72.
22. Chilcote RR, Coccia P, Sather HN, Robison LL, Baehner RL, Nesbit ME, et al. Mediastinal mass in acute lymphoblastic leukemia. *Med Pediatr Oncol.* 1984;12(1):9-16.
23. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* janv 1996;14(1):18-24.
24. Goldberg JM, Silverman LB, Levy DE, Dalton VK, Gelber RD, Lehmann L, et al. Childhood T-cell acute lymphoblastic leukemia: the Dana-Farber Cancer Institute acute lymphoblastic leukemia consortium experience. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 1 oct 2003;21(19):3616-22.
25. Consolini R, Legitimo A, Rondelli R, Gugelmi C, Barisone E, Lippi A, et al. Clinical relevance of CD10 expression in childhood ALL. The Italian Association for Pediatric Hematology and Oncology (AIEOP). *Haematologica.* nov 1998;83(11):967-73.
26. Gleissner B, Goekbuget N, Rieder H, Arnold R, Schwartz S, Diedrich H, et al. CD10-pre-B acute lymphoblastic leukemia (ALL) is a distinct high-risk subgroup of adult ALL associated with a high frequency of MLL aberrations: results of the German Multicenter Trials for Adult ALL (GMALL). *Blood.* 15 déc 2005;106(13):4054-6.
27. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* avr 2016;101(4):407-16.
28. Baranger L, Cuccuini W, Lefebvre C, Luquet I, Perot C, Radford I, et al. Place de la cytogénétique dans la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) de l'enfant et de l'adulte : actualisation par le Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris).* 1 sept 2016;74(5):547-60.
29. André Delannoy. John Libbey Eurotext - Hématologie - Leucémie lymphoblastique aiguë Philadelphie-positive. 2006;12:26-31.
30. Jaso J, Thomas DA, Cunningham K, Jorgensen JL, Kantarjian HM, Medeiros LJ, et al. Prognostic Significance of Immunophenotypic and Karyotypic Features of Philadelphia positive B-Lymphoblastic Leukemia in the Era of Tyrosine Kinase Inhibitors. *Cancer.* 1 sept 2011;117(17):4009-17.

31. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol.* sept 2012;13(9):936-45.
32. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* nov 2013;27(11):2165-76.
33. C. Preudhomme, L. Llopis c, N. Boissel d. Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës. EM-Consulte [Internet]. 31 janv 2012; Disponible sur: <http://www.em-consulte.com/article/688039/classification-et-facteurs-pronostiques-des-leucem>
34. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BES, Kinsey SE, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood.* 15 mars 2007;109(6):2327-30.
35. Marke R, van Leeuwen FN, Scheijen B. The many faces of IKZF1 in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* avr 2018;103(4):565-74.
36. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, et al. Targetable Kinase-Activating Lesions in Ph-like Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 11 sept 2014;371(11):1005-15.
37. Roberts KG, Pei D, Campana D, Payne-Turner D, Li Y, Cheng C, et al. Outcomes of Children With BCR-ABL1-Like Acute Lymphoblastic Leukemia Treated With Risk-Directed Therapy Based on the Levels of Minimal Residual Disease. *J Clin Oncol.* 20 sept 2014;32(27):3012-20.
38. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 28 août 2014;124(9):1434-44.
39. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz H-J, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet.* sept 2015;47(9):1020-9.
40. Dastugue N, Suciu S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood.* 28 mars 2013;121(13):2415-23.

41. Nachman JB, Heerema NA, Sather H, Camitta B, Forestier E, Harrison CJ, et al. Outcome of treatment in children with hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 août 2007;110(4):1112-5.
42. Brüggemann M, Raff T, Kneba M. Has MRD monitoring superseded other prognostic factors in adult ALL? *Blood*. 29 nov 2012;120(23):4470-81.
43. Ravandi F, Jorgensen JL, O'Brien SM, Jabbour E, Thomas DA, Borthakur G, et al. Minimal residual disease assessed by multi-parameter flow cytometry is highly prognostic in adult patients with acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. févr 2016;172(3):392-400.
44. Borowitz MJ, Devidas M, Hunger SP, Bowman WP, Carroll AJ, Carroll WL, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia and its relationship to other prognostic factors: a Children's Oncology Group study. *Blood*. 15 juin 2008;111(12):5477-85.
45. Kern W, Schnittger S. Monitoring of acute myeloid leukemia by flow cytometry. *Curr Oncol Rep*. sept 2003;5(5):405-12.
46. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2691-6.
47. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciu S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 27 août 1998;339(9):591-8.
48. van Dongen JJ, Seriu T, Panzer-Grümayer ER, Biondi A, Pongers-Willemse MJ, Corral L, et al. Prognostic value of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia in childhood. *Lancet Lond Engl*. 28 nov 1998;352(9142):1731-8.
49. Coustan-Smith E, Sancho J, Hancock ML, Boyett JM, Behm FG, Raimondi SC, et al. Clinical importance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 oct 2000;96(8):2691-6.
50. Pui C-H, Pei D, Coustan-Smith E, Jeha S, Cheng C, Bowman WP, et al. Clinical utility of sequential minimal residual disease measurements in the context of risk-based therapy in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a prospective study. *Lancet Oncol*. avr 2015;16(4):465-74.

51. Bader P, Kreyenberg H, Henze GHR, Eckert C, Reising M, Willasch A, et al. Prognostic value of minimal residual disease quantification before allogeneic stem-cell transplantation in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia: the ALL-REZ BFM Study Group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 janv 2009;27(3):377-84.
52. Bader P, Hancock J, Kreyenberg H, Goulden NJ, Niethammer D, Oakhill A, et al. Minimal residual disease (MRD) status prior to allogeneic stem cell transplantation is a powerful predictor for post-transplant outcome in children with ALL. *Leukemia*. sept 2002;16(9):1668-72.
53. X.Ronot, D. Grunwald, JF Mayol, J Boutonnat. *La Cytométrie en Flux*. Lavoisier; 2006. (TEC & DOC).
54. Vosková D, Váleková L, Fedorová J, Hudecek J, Kubisz P. Leukemic cells and aberrant phenotypes in acute leukemia patients: a flow cytometry analysis. *Neoplasma*. 2003;50(6):422-7.
55. Béné M-C, Lacombe F. Place de la cytométrie en flux dans le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab*. avr 2015;2015(471):35-41.
57. Roshal M, Fromm JR, Winter S, Dunsmore K, Wood BL. Immaturity associated antigens are lost during induction for T cell lymphoblastic leukemia: implications for minimal residual disease detection. *Cytometry B Clin Cytom*. mai 2010;78(3):139-46.
58. Campana D. ROLE OF MINIMAL RESIDUAL DISEASE MONITORING IN ADULT AND PEDIATRIC ACUTE LYMPHOBLASTIC LEUKEMIA. *Hematol Oncol Clin North Am*. oct 2009;23(5):1083-98.
59. Velden VHJ van der, Cazzaniga G, Schrauder A, Hancock J, Bader P, Panzer-Grumayer ER, et al. Analysis of minimal residual disease by Ig/TCR gene rearrangements: guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. avr 2007;21(4):604-11.
60. Baruchel A, Cayuela JM, MacIntyre E, Berger R, Sigaux F. Assessment of clonal evolution at Ig/TCR loci in acute lymphoblastic leukaemia by single-strand conformation polymorphism studies and highly resolute PCR derived methods: implication for a general strategy of minimal residual disease detection. *Br J Haematol*. mai 1995;90(1):85-93.
61. Brüggemann M, Schrauder A, Raff T, Pfeifer H, Dworzak M, Ottmann OG, et al. Standardized MRD quantification in European ALL trials: proceedings of the Second

- International Symposium on MRD assessment in Kiel, Germany, 18-20 September 2008. Leukemia. mars 2010;24(3):521-35.
62. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, Neale GA, Mihara K, Pui CH, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1 avr 2001;97(7):2115-20.
 63. Drénou B, Fardel O, Fauchet R, Amiot L. La cytométrie en flux : intérêt dans le diagnostic phénotypique et le suivi des hémopathies malignes. *Ann Biol Clin (Paris)*. 25 nov 2002;60(6):663-72.
 64. Mekkaoui L, Rassart C, Rozen L, Janssens A, Bron D, Ferster A, et al. Use of CD 123 Expression on Blasts from AML, ALL and RAEB As Minimal Residual Disease Marker. *Blood*. 3 déc 2015;126(23):5402-5402.
 65. Veltroni M, De Zen L, Sanzari MC, Maglia O, Dworzak MN, Ratei R, et al. Expression of CD58 in normal, regenerating and leukemic bone marrow B cells: implications for the detection of minimal residual disease in acute lymphocytic leukemia. *Haematologica*. nov 2003;88(11):1245-52.
 66. Garand R, Beldjord K, Cavé H, Fossat C, Arnoux I, Asnafi V, et al. Flow cytometry and Ig/TCR quantitative PCR for minimal residual disease quantitation in acute lymphoblastic leukemia: a French multicenter prospective study on behalf of the FRALLE, EORTC and GRAALL. *Leukemia*. févr 2013;27(2):370-6.
 67. Fossat C, Roussel M, Arnoux I, Asnafi V, Brouzes C, Garnache-Ottou F, et al. Methodological aspects of minimal residual disease assessment by flow cytometry in acute lymphoblastic leukemia: A french multicenter study: MRD Assessment by Flow Cytometry in All. *Cytometry B Clin Cytom*. janv 2015;88(1):21-9.
 68. Denys B, Sluijs-Gelling AJ van der, Homburg C, Schoot CE van der, Haas V de, Philippé J, et al. Improved flow cytometric detection of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. mars 2013;27(3):635-41.
 69. Velden VHJ van der, Wijkhuijs JM, Dongen JJM van. Non-specific amplification of patient-specific Ig/TCR gene rearrangements depends on the time point during therapy: implications for minimal residual disease monitoring. *Leukemia*. mars 2008;22(3):641-4.
 70. Elie C, Colombet I. Methods of evaluation of reproducibility. *Sang Thromb Vaiss*. mars 2011;(3):138-145.

71. Gaipa G, Cazzaniga G, Valsecchi MG, Panzer-Grümayer R, Buldini B, Silvestri D, et al. Time point-dependent concordance of flow cytometry and real-time quantitative polymerase chain reaction for minimal residual disease detection in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. oct 2012;97(10):1582-93.
72. Thörn I, Forestier E, Botling J, Thuresson B, Wasslavik C, Björklund E, et al. Minimal residual disease assessment in childhood acute lymphoblastic leukaemia: a Swedish multi-centre study comparing real-time polymerase chain reaction and multicolour flow cytometry. *Br J Haematol*. 1 mars 2011;152(6):743-53.
73. van Dongen JJM, van der Velden VHJ, Brüggemann M, Orfao A. Minimal residual disease diagnostics in acute lymphoblastic leukemia: need for sensitive, fast, and standardized technologies. *Blood*. 25 juin 2015;125(26):3996-4009.
74. Chantepie SP, Cornet E, Salaün V, Reman O. Hematogones: an overview. *Leuk Res*. nov 2013;37(11):1404-11.
75. Dworzak MN, Gaipa G, Ratei R, Veltroni M, Schumich A, Maglia O, et al. Standardization of flow cytometric minimal residual disease evaluation in acute lymphoblastic leukemia: Multicentric assessment is feasible. *Cytometry B Clin Cytom*. nov 2008;74(6):331-40.
76. Ikoma MRV, Beltrame MP, Ferreira SIACP, Souto EX, Malvezzi M, Yamamoto M. Proposal for the standardization of flow cytometry protocols to detect minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Rev Bras Hematol E Hemoter*. 2015;37(6):406-13.
77. Theunissen P, Mejstrikova E, Sedek L, van der Sluijs-Gelling AJ, Gaipa G, Bartels M, et al. Standardized flow cytometry for highly sensitive MRD measurements in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 19 janv 2017;129(3):347-57.
78. Muzzafar T, Medeiros LJ, Wang SA, Brahmandam A, Thomas DA, Jorgensen JL. Aberrant underexpression of CD81 in precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia: utility in detection of minimal residual disease by flow cytometry. *Am J Clin Pathol*. nov 2009;132(5):692-8.
79. Nagant C, Casula D, Janssens A, Nguyen VTP, Cantinieaux B. Easy discrimination of hematogones from lymphoblasts in B-cell progenitor acute lymphoblastic leukemia patients using CD81/CD58 expression ratio. *Int J Lab Hematol* [Internet]. [cité 7 sept 2018];0(0). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/ijlh.12912>

80. Kiyokawa N, Iijima K, Tomita O, Miharu M, Hasegawa D, Kobayashi K, et al. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res.* janv 2014;38(1):42-8.
81. Kalina T, Vaskova M, Mejstrikova E, Madzo J, Trka J, Stary J, et al. Myeloid antigens in childhood lymphoblastic leukemia: clinical data point to regulation of CD66c distinct from other myeloid antigens. *BMC Cancer.* 12 avr 2005;5:38.
82. P Qiu. Inferring phenotypic properties from single-cell characteristics. 25 mai 2012; Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22662133>
83. Marceau-Renaut A, Renneville A, Nibourel O, Jardin-Mathé O, Demay C, Villenet C, et al. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a-t-il déjà sa place dans nos laboratoires d'oncohématologie ? *Hématologie.* 1 mars 2013;19(2):112-22.
84. Gawad C, Pepin F, Carlton VEH, Klinger M, Logan AC, Miklos DB, et al. Massive evolution of the immunoglobulin heavy chain locus in children with B precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 22 nov 2012;120(22):4407-17.
85. Shin S, Hwang IS, Kim J, Lee KA, Lee ST, Choi JR. Detection of Immunoglobulin Heavy Chain Gene Clonality by Next-Generation Sequencing for Minimal Residual Disease Monitoring in B-Lymphoblastic Leukemia. *Ann Lab Med.* juill 2017;37(4):331-5.
86. Sala Torra O, Othus M, Williamson DW, Wood B, Kirsch I, Robins H, et al. Next-Generation Sequencing in Adult B Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* avr 2017;23(4):691-6.

SERMENT DE GALIEN

Je jure 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 ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les moeurs et favoriser les actes criminels.

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

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.

BASSOT Louis

Evaluation de la cytométrie en flux pour le suivi de la maladie résiduelle des leucémies aiguës lymphoblastiques B de l'enfant au CHU de Rouen.

Th. D. Pharm., Rouen, 2018, 152p.

RESUME

INTRODUCTION : La quantification de la maladie résiduelle (MRD) est un outil devenu indispensable dans la prise en charge des hémopathies. Elle permet d'évaluer l'efficacité du traitement mis en place, de prédire le risque de rechute et est ainsi utilisée dans la stratification thérapeutique. Les techniques mises en place doivent donc répondre à des exigences en termes de sensibilité, de spécificité et de rapidité de rendu de résultats. La biologie moléculaire est la méthode de référence par son très bonne sensibilité et un bon niveau de standardisation cependant, elle reste une technique complexe, coûteuse et peu adaptée à une prise de décision rapide. Ceci justifie le besoin d'envisager d'autres techniques comme la cytométrie en flux. Ses performances se sont améliorées par le développement de nouveaux automates multiparamétriques et les logiciels d'analyses.

MATERIELS ET METHODES : Notre étude consistait à comparer les résultats de maladie résiduelle obtenus en cytométrie en flux au laboratoire d'hématologie du CHU de Rouen à ceux obtenus en biologie moléculaire (Recherche et quantification des réarrangements des gènes IGH/TCR) au laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille. Nous avons analysés 76 MRD pour 35 patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique B hospitalisés entre avril 2014 et janvier 2018 dans le service d'hémato-immuno-oncologie pédiatrique du CHU de Rouen.

RESULTATS : Après analyse qualitative des résultats, on obtient une concordance observée de 84% avec un indice Kappa à 0,46. L'analyse quantitative des MRD positives montre une corrélation significative entre la CMF et la BM. L'analyse des discordances a permis de mettre en évidence des résultats faux négatifs en CMF par défaut de sensibilité ou des faux positifs en CMF par défaut de spécificité du LAIP. Une partie des discordances sont en faveur de faux négatifs en BM dont l'origine probable concerne l'émergence d'un sous clone différent du profil initial.

CONCLUSION : Ces deux techniques présentent donc des spécificités et leur complémentarité paraît intéressante dans le but d'obtenir une maladie résiduelle la plus fiable possible afin de permettre une prise en charge optimale du patient.

MOTS CLES : Hématologie – Maladie résiduelle – Leucémie aiguë lymphoblastique – Cytométrie en flux – Biologie moléculaire

JURY

Président : Pr FAVENNEC Loïc, PU-PH

Membres : Pr SCHNEIDER Pascale, PU-PH

Dr BUCHONNET Gérard, MCU-PH

Dr BERA Elsa, PH

Dr BOBEE Victor, AHU

DATE DE SOUTENANCE : 15 octobre 2018