HAL
open science

Rôle du CD81 dans les leucémies aigües myéloïdes : implications phénotypiques et clinico-biologiques

Thomas Boyer

To cite this version:

Thomas Boyer. Rôle du CD81 dans les leucémies aigües myéloïdes : implications phénotypiques et clinico-biologiques. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2016. Français. NNT : 2016LIL2S027 . tel-01504939v2

HAL Id: tel-01504939

https://theses.hal.science/tel-01504939v2

Submitted on 13 Apr 2017

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

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

UNIVERSITE DROIT ET SANTÉ DE LILLE 2

Ecole Doctorale Biologie-Santé

THÈSE

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Hématologie

Thomas Boyer

RÔLE DU CD81 DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES : IMPLICATIONS PHÉNOTYPIQUES ET CLINICO-BIOLOGIQUES

Soutenue publiquement le 15 décembre 2016 devant le jury composé de :

Professeur Bruno QUESNEL	**Président**
Professeur Valérie BARDET	**Rapporteur**
Professeur Loïc GARÇON	**Rapporteur**
Professeur Vahid ASNAFI	**Examinateur**
Professeur Claude PREUDHOMME	**Examinateur**
Docteur Meyling CHEOK	**Directeur de thèse**

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier chaleureusement les membres du jury de cette thèse :

En premier lieu, monsieur le **Pr Bruno Quesnel**, qui me fait l'honneur de présider cette thèse. Merci pour l'émulation scientifique que tu sais injecter au sein de l'équipe et pour tes avis toujours éclairés et instructifs. Sois assuré de mon profond respect.

Un très grand merci aux **Prs Valérie Bardet et Loïc Garçon**. Merci pour votre disponibilité, votre professionnalisme et la grande spontanéité avec laquelle vous avez répondu à ma sollicitation pour être rapporteurs de cette thèse. Je suis très honoré de votre présence dans ce jury.

Mes remerciements vont ensuite au **Pr Vahid Asnafi**. Merci pour votre présence à mes deux comités de suivi de thèse et merci pour vos conseils pertinents et avisés, qui ont contribué au déroulement de cette thèse.

Quant au **Pr Claude Preudhomme**, mes remerciements concernent aussi bien ce travail de thèse que la fonction de biologiste que j'exerce dans son laboratoire. Merci des opportunités que vous m'avez données et que vous continuez à me donner, j'aime la façon dont vous me laissez exercer la biologie médicale en cytologie et cytométrie en flux. Soyez assuré de ma sincère gratitude.

Enfin, je tiens à remercier le **Dr Meyling Cheok** pour son encadrement au cours de cette thèse. Merci pour la rigueur dont tu sais faire preuve et que tu inculques à ce travail, merci également pour ta disponibilité.

Je tiens à adresser de très chaleureux et sincères remerciements aux autres biologistes d'hématologie cellulaire du laboratoire d'hématologie du CHU de Lille (Valérie, Nathalie, Stéphanie, Aline, Alice, Martine, Florent, Lotfi, Olivier, Nicolas). Merci de m'avoir dégagé du temps pour la réalisation de cette thèse en parallèle de mon assistanat, merci de vos conseils et de votre amitié, qui m'est très importante. Un merci très particulier au **Dr Christophe Roumier** : tes conseils pertinents, ton aide, précieuse et multiple, ainsi que ta disponibilité m'ont permis d'aller jusqu'au bout de cette thèse.

Enfin, un grand merci à l'équipe technique de cytométrie en flux du laboratoire d'hématologie du CHU de Lille (Corinne, Aurélie, Juliette, Céline, Vicky, Jennifer, Vanessa, Jérémy, Jérôme) pour leur aide, leurs conseils et bien sûr, leur bonne humeur ! Merci également à Pauline Peyrouze pour son aide technique et sa disponibilité sans faille.

RESUME

Le CD81 est une protéine membranaire appartenant à la superfamille des tétraspanines. Son implication en pathologie a principalement été étudiée dans les hémopathies lymphoïdes B comme le myélome multiple, où son expression est corrélée à un pronostic péjoratif. A ce jour, le CD81 n'a pas été étudié dans les leucémies aigües myéloïdes (LAM). Au cours de ce travail, nous avons mesuré l'expression du CD81 sur des blastes de LAM au diagnostic, évalué son association avec les autres paramètres biologiques de la LAM et son impact sur la survie de 134 patients traités par chimiothérapie intensive. Le CD81 était exprimé chez 92 patients/134, soit 69% d'entre eux. Les patients dont les blastes exprimaient le CD81 présentaient une hyperleucocytose au diagnostic ($p=0.02$) et une cytogénétique intermédiaire ou défavorable ($p<0.001$). L'expression du CD81 conférait un impact négatif sur la survie des patients (survie sans évènements (EFS), survie globale (OS), survie sans rechute (RFS)) en analyse univariée ($p<0.001$) comme en analyse multivariée ($p=0.003$, $p=0.002$ et $p<0.001$ respectivement). De plus, le CD81 avait un impact négatif sur la survie globale des patients avec une mutation de NPM1 ($p=0.01$) et de risque favorable selon l'ELN ($p=0.002$).

Le CD81 ayant été décrit comme impliqué dans la quiescence, nous nous sommes intéressés à l'expression du Ki67, par cytométrie en flux, sur les blastes de LAM au diagnostic. Nous avons sélectionné 5 échantillons de moelle osseuse de notre série négatifs pour le CD81 (<20% des blastes) et 5 échantillons fortement positifs pour le CD81 (>90% des blastes). Nous n'avons pas trouvé de différence d'expression du Ki67 entre les blastes CD81 positifs et négatifs, ne suggérant donc pas un rôle de cette molécule dans le contrôle du cycle cellulaire. La présence du CD81 sur les blastes CD34+ CD38- n'influait pas non plus sur l'expression du Ki67 au sein de cette sous fraction blastique.

Afin de préciser le rôle physiopathologique du CD81 sur les blastes de LAM, nous avons étudié le profil d'expression génique de 13 patients au diagnostic. Nous avons pu identifier une signature transcriptomique composée de 42 gènes. L'expression du CD81 sur les blastes de LAM est associée à des réseaux fonctionnels comme la réponse inflammatoire, le développement et la croissance cellulaire ou encore la signalisation cellulaire.

Dans une dernière partie, nous nous sommes interessé à l'hétérogénéité phénotypique des blastes de LAM en étudiant l'expression des marqueurs CD34, CD38, CD90, CD123 et CD81 sur les blastes. En combinant le CD123 et le CD81 sur les blastes CD34+CD38-CD90- nous arrivions à caractériser 80% des blastes de LAM. Seule la sous-fraction CD34+CD38-CD90-CD123+CD81+ avait un impact sur tous les paramètres de survie.

Notre étude a permis de mettre en évidence un rôle péjoratif du CD81 dans la survie des patients atteints de LAM. Cette molécule ne semble impliquée dans la quiescence cellulaire des blastes de LAM, contrairement à ce qui avait été décrit sur les cellules souches, et l'expression du CD81 est associée à une signature transcriptomique. Des études sont à présent nécessaires afin de mieux définir le rôle physiopathologique du CD81 dans les LAM, notamment au niveau des voies de signalisation cellulaires impliquées.

ABSTRACT

CD81 is a cell surface protein which belongs to the tetraspanin family. While in multiple myeloma its expression on plasma cells is associated with worse prognosis, this has not yet been explored in acute myeloid leukemia (AML). We measured membrane expression of CD81 on AML cells at diagnosis, evaluated its association with AML characteristics and its influence on patient outcome after intensive chemotherapy in a cohort of 134 patients. CD81 was detected in 92/134 (69%) patients. Patients with AML expressing CD81 had elevated leukocyte count (p=0.02) and were more likely classified as intermediate or adverse-risk by cytogenetics (p<0.001). CD81 expression had a negative impact on survival (event-free [EFS], overall [OS] and relapse-free survival [RFS]) in univariate (p<0.001) and in multivariate analyses (p=0.003, 0.002 and <0.001, respectively). CD81 has a negative impact on OS in patients with NPM1 mutation (p=0.01) and in favorable risk patients by European Leukemia Net (ELN) classification (p=0.002).

Since CD81 was first described in cellular quiescence, we measured Ki67 on primary blast cells from AML patients. We considered 5 bone marrow samples from AML patients with either weak CD81 expression (less than 20% of blast cells) or 5 bone marrow samples with strong CD81 expression on blasts. We did not found a significant difference in Ki67 expression on blast cells from CD81 positive patients compared with those from CD81 negative patients (p=0.93). Furthermore, CD81 expression on CD34+ CD38- cells dit not influence the expression of Ki67 on these cells.

To better understand the physiopathologic function of CD81 on blast cells, we performed gene expression profiling of 13 patients at diagnosis. A transcriptional signature with 42 genes was identified and correlated with inflammatory response, cellular development and growth or cell signaling.

Finally, we investigated phenotypic heterogeneity at AML diagnosis by studying CD34, CD38, CD90, CD123 and CD81 expression on blast cells. 80% of blast cells were stained when CD123 and CD81 were gated on the CD34+CD38-CD90- population. Sub population CD34+CD38-CD90-CD123+CD81+ was associated with poor outcome.

In conclusion, the tetraspanin CD81 is an adverse prognostic marker in AML. CD81 does not seem to be important for cell quiescence on blast cells, unlike in stem cells, and CD81 expression is associated with distinct molecular signature with gene expression profiling. Further studies are needed to better understand the physiopathologic function of CD81 on blast cells and the signaling pathways involved.

ABREVIATIONS

AA-700: Allophycocyanine – Alexa Fluor™ 700

ABL1 : Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1

ADN: Acide désoxyribonucléique

AlDH: Aldéhyde deshydrogénase

ALFA: Acute leukemia French association

APC: Allophycocyanin

ARN: Acide ribonucléique

ASXL1: Additional Sex Combs Like 1

ATRA: Acide tout-trans-rétinoïque

B-CLL/PLL: B-chronic lymphocytic leukemia/prolymphocytic leukemia

BCP-ALL: B cell precursor acute lymphoblastic leukemia

BCR : B-cell receptor

BL: Burkitt lymphoma

BM: Bone marrow

BMI-1 : B lymphoma Mo-MLV insertion region 1

BrdU: bromodésoxyuridine

CBF: Core-binding factor

CD : Cluster of differenciation

CEBPA : CCAAT/enhancer-binding protein alpha

CHRU: Centre Hospitalier Régional Universitaire

CIL : Cellules initiatrices de leucémie

CIVD : Coagulation intra-vasculaire disséminée

CLL-1 : C-type lectin like molecule-1

CMF : Cytométrie en flux

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CMP : Common Myeloid Precursor

CN-LOH : Copy neutral loss of heterozygoty

CSH : cellules souches hématopoïétiques

CSM : Cellules souches mésenchymateuses

Ct : Cycle threshold

CXCL-12 : C-X-C motif chemokine 12

CXCR4 : C-X-C chemokine receptor type 4

DLBCL : Diffuse large B cell lymphoma

ECD : R-Phycoerythrin-Texas Red™-X

ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group

EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique

EFS: Event-free survival

ELN: European Leukemia Net

ETV6: ETS variant 6

FAB : French American British

FC : Facteur de croissance

FISH : Fluorescence in situ hybridization

FITC : fluorescein isothiocyanate

FL : Follicular lymphoma

FLT3 : Fms-like tyrosine kinase 3

FT : Facteur de transcription

G-CSF : Granulocyte Colony-Stimulating Factor

GM-CSF : Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor

GEP: Gene Expression Profiling

GMP: Granulocyte Macrophage Progenitor

GOELAMS : Groupe Ouest-Est des Leucémies Aigües et Maladies du Sang

GVL : Graft versus leukemia

HCL : Hairy cell leukemia

HOVON : Hemato-Oncologie voor Volwassenen Nederland

IDH: Isocitrate dehydrogenase

IFN: Interféron

IL : Interleukine

IPSS: International Prognostic Scoring System

IT-HSC: Intermediate Term Hematopoietic Stem Cell

JAK: Janus kinase

KO: Krom orange

LAIP: Leukemia Associated Immunophenotype

LAL: Leucémie Aiguë Lymphoïde

LAM: Leucémie Aiguë Myéloïde

LAM-CN: LAM à caryotype normal

LDH: Lactate deshydrogénase

LLC : Leucémie lymphoïde chronique

LMC: Leucémie Myéloïde Chronique

LPL : Leucémie prolymphocytaire

LT-HSC: Long Term Hematopoietic Stem Cell

LT-SL-IC : Long Term SCID-Leukemia Initiating Cells

M-CSF: Macrophage Colony-Stimulating Factor

MAPK: Mitogen-Activated Protein Kinases

MCL: Mantle cell lymphoma

MGG: May-Grünwald-Giemsa

MGUS: Monoclonal gammapathy of undetermined signification

MLL : Mixed-lineage leukemia

MM: Myélome multiple

MPO : Myeloperoxydase

MRD : Minimal residual disease

MTT : 3-4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyl tetrazolium bromide

MW : Macroglobulinémie de Waldenström

MYH11 : Myosin heavy chain 11

MZL : Marginal zone lymphoma

NOD-SCID : Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency

NOS-AML: Non other specified acute myeloid leukemia

NPM1: Nucleophosmin 1

OMS: Organisation mondiale de la santé

OS: Overall survival

PB: Pacific Blue

PBS: Phosphate-buffered saline

PC: Phycoerythrine-cyanin

PE: Phycoerythrin

PFS: Progression free survival

PI3K : Phosphoinositides-3 Kinases

PKC : Protéine Kinase C

PKC α: Protéine kinase C alpha

PML: Promyelocytic leukemia protein

PMT: Photomultiplicateur

RAR-α: Retinoic acid receptor alpha

RC: Rémission complète

RC1: Première rémission complète

RLN: Reactive lymph node

RFS: Relapse-free survival

RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium

RQ-PCR: Real time quantitative polymerase chain reaction

RR: Risque relatif

RUNX1: Runt-related transcription factor 1

RUNXT1: RUNX1 translocation partner 1

SCF: Stem Cell Factor

SCID : Severe Combined Immunodeficiency

SM: Smoldering myeloma

SMD: Syndrome myélodysplasique

SMP: Syndrome myéloprolifératif

ST-HSC: Short Term Hematopoietic Stem Cell

ST-SL-IC : Short Term SCID-Leukemia Initiating Cells

STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription

SVF: Sérum de veau foetal

TEM: Tetraspanin-enriched microdomain

TET-2: Ten-eleven translocation 2

TIM-3: T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3

TGF-β: Transforming Growth Factor β

VCAM-1: Vascular cell adhesion protein 1

WT-1: Wilms tumor 1

REMERCIEMENTS

RESUME

ABSTRACT

ABREVIATIONS

INTRODUCTION 1

1. L'HEMATOPOÏESE 1
A. L'HEMATOPOÏESE PHYSIOLOGIQUE 1
i. Propriétés des CSH 1
ii. Régulation des CSH 3
iii. La niche hématopoïétique 5
B. L'HEMATOPOÏESE LEUCEMIQUE 7
i. Leucémogénèse et CIL 8
ii. Marqueurs de CIL 10
1. Les marqueurs historiques : CD34, CD38, CD90 10
2. CD123, chaîne α du récepteur de l'IL-3 10
3. Nouveaux marqueurs de CIL : CLL-1, TIM-3 et BMI-1 11
4. CD81 13
2. LES LEUCEMIES AIGÜES MYELOÏDES (LAM) 16
A. DEFINITION ET EPIDEMIOLOGIE DES LAM 16
B. ETIOLOGIES DES LAM 17
C. DIAGNOSTIC DES LAM 18
i. Signes cliniques 18
ii. Diagnostic biologique des LAM 19
1. Hémogramme 19
2. Myélogramme 19
a. Examen cytologique 19
b. Immunophénotypage par cytométrie en flux 20
c. Examen cytogénétique de la moelle 21
d. Biologie moléculaire 22
iii. Classification des LAM 23
1. Classification FAB 23
2. Classification OMS (2008 puis 2016) 24
C. FACTEURS PRONOSTIQUES DES LAM 27
i. L'âge 27
ii. Statut de performance OMS 27
iii. Paramètres biologiques 27
iv. Facteurs liés à la LAM 28
1. Cytogénétique 28
2. Biologie moléculaire 29
3. Caractère secondaire de la LAM 31
4. Fréquence des CIL 32
5. Maladie résiduelle (MRD) 32
a. Expression aberrante d'antigènes associée à la LAM (LAIP) 32
b. MRD en biologie moléculaire 32
D. TRAITEMENT DES LAM DU SUJET JEUNE 33
i. Chimiothérapie d'induction 33
ii. Chimiothérapie de consolidation 34

E. TRAITEMENT DES LAM DU SUJET AGE 35
F. PROTOCOLES DE TRAITEMENT DES LAM 35
i. Le protocole ALFA-0701 35
ii. Le protocole ALFA-0702 (CLARA) 36
iii. Le protocole CBF-2006 37
3. TETRASPANINES ET ONCO-HEMATOLOGIE 39
A. PATHOLOGIE LYMPHOÏDE 39
B. PATHOLOGIE MYELOÏDE 43

OBJECTIFS 45

MATERIELS ET METHODES 46

1. PATIENTS 46
2. CYTOMETRIE EN FLUX MULTIPARAMETRIQUE 46
A. PRINCIPE 46
B. ANTICORPS ET FLUOROCHROMES 48
C. IMMUNOPHENOTYPAGE DES LAM AU DIAGNOSTIC 52
D. ETUDE DE LA PROLIFERATION CELLULAIRE : EXPRESSION DU KI67 54
3. BIOLOGIE MOLECULAIRE 55
A. ISOLEMENTS CELLULAIRES 55
B. EXTRACTION D'ARN 55
C. RETROTRANSCRIPTION (RT) 55
D. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL TAQMAN™ (RQ-PCR) 56
E. PROFILS D'EXPRESSION GENIQUE : UTILISATION DES PUCES GENECHIP™ HUMAN GENOME U133 PLUS 2.0 ARRAY 57
4. ANALYSE STATISTIQUE 59

RESULTATS 61

1. LE CD81 EST UN MARQUEUR DE MAUVAIS PRONOSTIC DANS LES LAM 61
A. EXPRESSION DU CD81 SUR LES BLASTES PHYSIOLOGIQUES ET LES BLASTES DE LAM 61
B. CD81 ET FACTEURS PRONOSTIQUES CLASSIQUES DES LAM 62
C. ROLE DU CD81 DANS LE PRONOSTIC DES LAM 64
2. ROLE DU CD81 SUR LA PROLIFERATION CELLULAIRE DANS LES LAM 66
3. ANALYSE DU PROFIL TRANSCRIPTOMIQUE SELON L'EXPRESSION DU CD81 69
4. HETEROGENEITE PHENOTYPIQUE AU DIAGNOSTIC ET CD81 72

DISCUSSION 79

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 85

BIBLIOGRAPHIE 86

ANNEXE 103

TETRASPANIN CD81 IS AN ADVERSE PROGNOSTIC MARKER IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA 104

INTRODUCTION

1. L'hématopoïèse

a. L'hématopoïèse physiologique

L'hématopoïèse est un processus physiologique hiérarchisé qui assure la production continue et régulée des éléments figurés du sang, à savoir les hématies, leucocytes (polynucléaires, lymphocytes, monocytes) et plaquettes, à travers différentes étapes de différenciation et d'expansion. Le fonctionnement pérenne du système hématopoïétique est maintenu par un petit contingent de cellules multipotentes résidentes de la moelle osseuse, les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Les CSH régulent et maintiennent à un taux relativement constant le nombre et la proportion de cellules sanguines malgré les variations de consommation liées à des conditions pathologiques comme les hémorragies.

i. Propriétés des CSH

Depuis plusieurs années, de nombreux groupes ont mis en évidence l'existence de cellules souches dans différents organes ; cependant, les CSH ont été les premières cellules souches clairement caractérisées (1).

Les CSH possèdent trois propriétés fondamentales :

- l'auto-renouvellement : la capacité de se diviser à l'identique sans se différencier et ainsi, maintenir et amplifier le pool de CSH.
- La multipotence ou potentiel de différenciation multi-lignées : la capacité à se différencier en n'importe quelle cellule mature du sang, de façon à assurer le maintien de l'homéostasie hématopoïétique tout au long de la vie de l'individu.
- La capacité de reconstitution *in vivo* d'une hématopoïèse myéloïde et lymphoïde après injection dans des souris immunodéficientes SCID (*Severe Combined ImmunoDeficiency*) ou NOD-SCID (*Non Obese Diabetic-Severe Combined Immunodeficiency*).

La division asymétrique d'une CSH génère deux cellules filles au devenir différent : une CSH identique à la cellule mère et un progéniteur capable de se différencier, de proliférer, mais incapable d'auto-renouvellement (2).

Les CSH représentent 0.01 à 0.05% des cellules de la moelle osseuse et les études chez la souris ont permis de déterminer 3 sous-populations selon la capacité de repeuplement :

- les LT-HSC (ou CSH avec renouvellement à long terme) de phénotype CD34-, CD150+, CD48-, CD41- (3).
- Les IT-HSC de phénotype CD49b+, CD34-, CD48-, CD41-, permettant de reconstituer une hématopoïèse physiologique pendant une durée de 6 à 12 mois (4)
- Les ST-HSC (ou CSH avec renouvellement à court terme) de phénotype CD34+, CD150+, CD41-, capables de reconstituer une hématopoïèse physiologique pendant une durée limitée d'environ 8 semaines (5).

Les progéniteurs multipotents constituent le stade suivant. Ces cellules ont perdu la capacité de s'auto-renouveler mais possèdent des capacités mitotiques et de différenciation importantes, aboutissant *in fine* au progéniteur myéloïde commun de phénotype CD34+, CD38+, HLA-DR+, CD33+ et au progéniteur lymphoïde commun CD34+, CD38+, HLA-DR+ (6).

La suite de l'hématopoïèse voit les progéniteurs multipotents se différencier en précurseurs hématopoïétiques, qui se différencient eux-mêmes pour donner naissance aux cellules matures fonctionnelles, peu proliférantes, incapables d'auto-renouvellement, mais majoritaires au sein de la moelle osseuse (plus de 99% des cellules médullaires).

Outre ces propriétés, les CSH possèdent plusieurs caractéristiques : la quiescence mitotique (phase G0 du cycle cellulaire)(7), la résistance au stress liée à la forte expression de l'aldéhyde deshydrogénase 1 (AlDH1) (8) et l'activité télomérase (enzyme restreinte aux CSH et rajoutant des motifs télomériques TTAGGG à l'extrémité des chromosomes afin de prévenir le raccourcissement télomérique lié à l'âge ou à la sénescence).

Néanmoins, ce modèle d'hématopoïèse est actuellement remis en question, suite à plusieurs études utilisant une approche unicellulaire et allant dans le sens d'un engagement de lignée plus précoce (9).

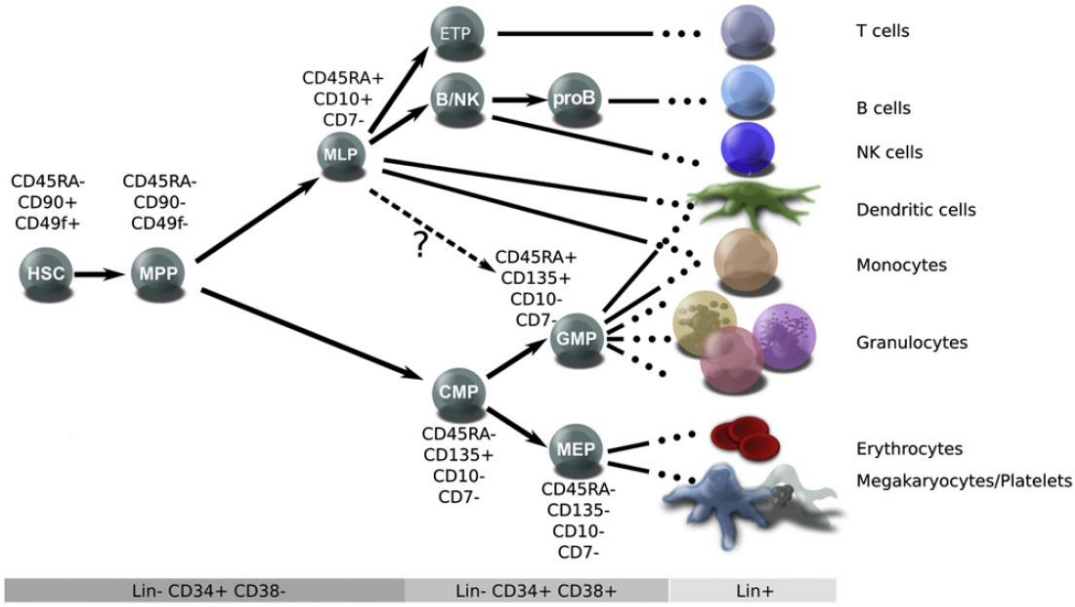


Figure 1 : représentation de l'hématopoïèse physiologique chez l'homme (3)

Abréviations : HSC : cellule souche hématopoïétique, MPP : progéniteurs multipotents, MLP : progéniteurs lymphoïdes immatures, CMP : progéniteurs myéloïdes communs, GMP : progéniteur des granulocytes et macrophages, MEP : progéniteur des mégacaryocytes et érythrocytes.

ii. Régulation des CSH

Auto-renouvellement : bien que le mécanisme reste encore aujourd'hui mal connu, il a été décrit un rôle des voies morphogènes Wnt, Notch et Hedgehog ainsi que des facteurs de transcription (FT) de la famille HOX (notamment HoxB4) (10)(11).

Facteurs de croissance (FC) et cytokines : l'hématopoïèse est un processus finement régulé, de façon négative ou positive, au niveau de la différenciation, de la prolifération ou encore de la survie des CSH. Les FC sont classés selon la population cellulaire qu'ils régulent :

- Les FC « synergiques » comme les SCF, le LIF, FLT3-ligand, l'IL-1, l'IL-6 et l'IL-11. Ces FC permettent d'augmenter le nombre de CSH en cycle (à partir du pool de cellules quiescentes) et sensibilisent les cellules aux autres FC par induction de récepteurs membranaires.
- Les FC « multipotents » tels que l'IL-3 et le GM-CSF pour les progéniteurs myéloïdes ou l'IL-7 pour les progéniteurs lymphoïdes. Ces FC agissent sur les

progéniteurs en cycle et les CSH en stimulant leur survie, leur prolifération et leur différenciation.

- Les FC « restreints » comme le G-CSF (granulocytes), le M-CSF (monocytes), l'érythropoïétine (hématies) ou l'IL-5 (lignée éosinophile) agissent sur la différenciation terminale des progéniteurs engagés dans une lignée particulière. Ils sont également nécessaires à la maturation.

La fixation des FC ou des cytokines sur leurs récepteurs induit l'activation de diverses voies de signalisation intracellulaires (Mitogen-Activated Protein Kinases (MAPK), Signal Transducer and Activator of Transcription (STAT), Phosphoinositides-3 Kinases (PI3K)…) qui vont agir sur le cycle cellulaire, la différenciation ou encore l'apoptose (12).

Outre des rôles positifs, certains FC (TGF-β, IFN-γ…) inhibent l'hématopoïèse, dans des conditions pathologiques et/ou physiologiques (13).

<u>Rôles des facteurs de transcription :</u> multiples. Les FT, suite à une régulation génétique, modulent l'hématopoïèse en terme d'auto-renouvellement, de différenciation, de prolifération, d'apoptose, de sénescence, de capacités de migration ou bien d'adhésion. L'expression des FT est assignée à un stade de maturation particulier et son influence s'exerce sur une lignée spécifique (14). Par exemple, le rôle de *PU-1* dans la régulation des CSH est primordial pour la différenciation myéloïde, dans la mesure où les CSH *PU-1*$^{-/-}$ présentent une altération de l'auto-renouvellement et de la différenciation initiale vers les progéniteurs les plus immatures (14). Le FT *CEBPA*, retrouvé inactivé dans environ 10% des leucémies aigues myéloïdes (LAM) à caryotype normal (15), est aussi clairement impliqué dans la différenciation granulocytaire : en effet, les souris *CEBPA*$^{-/-}$ présentent un défaut de production de progéniteurs GMP ainsi que de granulocytes, du fait d'une absence de transition du CMP vers le GMP ainsi que d'une augmentation de cellules myéloïdes immatures et une augmentation du nombre de CSH actives (16).

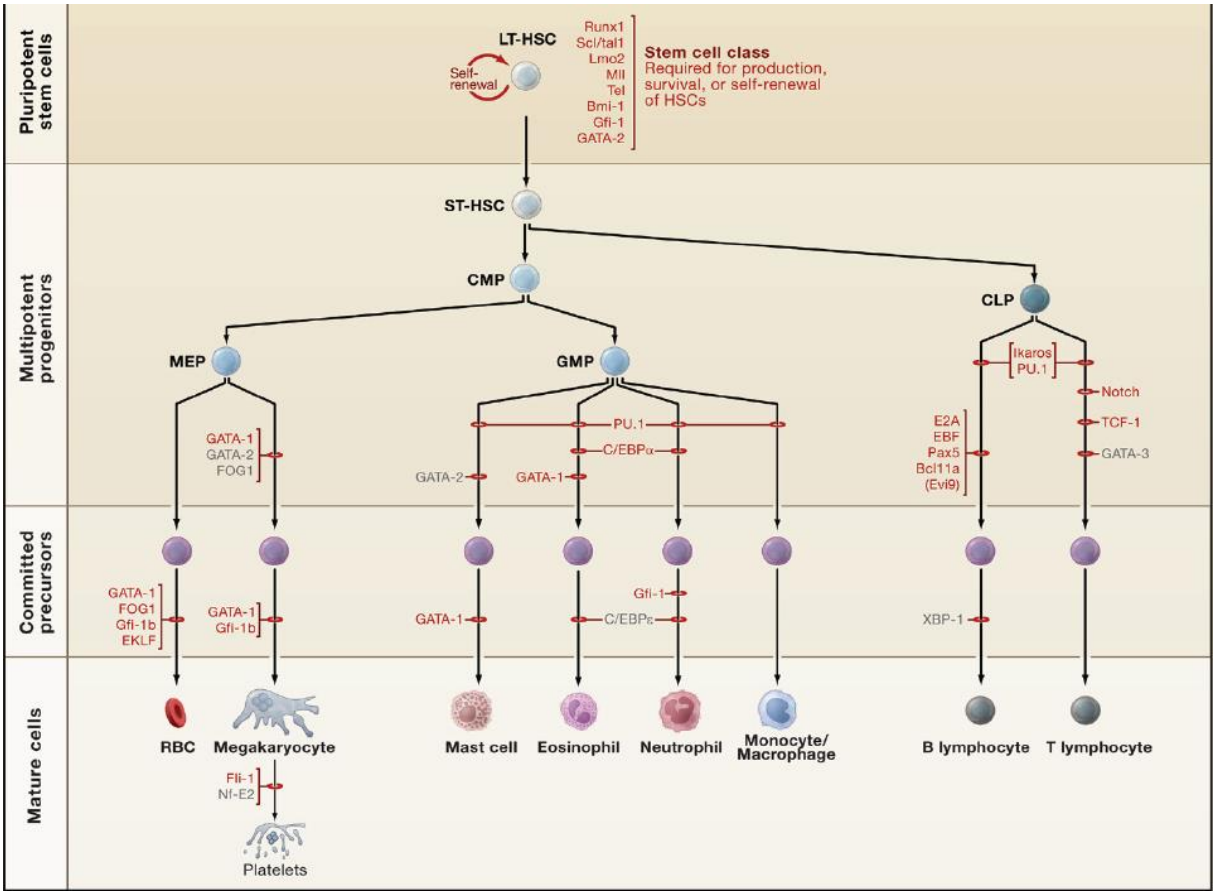


Figure 2 : rôle des facteurs de transcription au cours de l'hématopoïèse physiologique chez les Mammifères (17)

iii. La niche hématopoïétique

La production des CSH est d'une part assurée par la division asymétrique des CSH, générant une cellule fille identique à la cellule mère et un progéniteur incapable d'auto-renouvellement (18). Depuis quelques années, le rôle prépondérant de la niche hématopoïétique dans l'hématopoïèse a été mis en évidence notamment par sa proximité immédiate avec les CSH.

La niche hématopoïétique désigne un site anatomique contenant un ensemble de cellules souches, de l'état de quiescence ou non dépend de signaux provenant du microenvironnement immédiat, constitué par les autres cellules de la niche ainsi que par des facteurs systémiques (19). La proportion de CSH quiescentes est précisément régulée au cours de l'existence. De très nombreux facteurs ont démontré leur implication mais les données les plus solides indiquent un rôle majeur du microenvironnement dans cette

régulation (18) notamment grâce à l'architecture spécifique de la niche hématopoïétique. La niche est constituée de cellules spécifiques sécrétant des molécules de surface interagissant avec les CSH, modulant leurs divisions asymétriques, leur quiescence et leur mobilisation.

Deux types de niches ont été identifiées : la niche ostéoblastique et la niche vasculaire.

Les ostéoblastes, situés dans la région trabéculaire, semblent jouer un rôle essentiel dans l'hématopoïèse : ce rôle prépondérant n'a été envisagé qu'après mise en évidence des protéines d'adhésion N-cadhérines à leur surface ainsi qu'à celle des CSH (19). Ces cellules produisent des facteurs ayant la capacité de réguler la quiescence et la persistance des CSH tels que l'angiopoïétine, l'ostéopontine, la thrombopoïétine et la chimiokine CXCL-12.

La nécessité d'une vascularisation solide afin d'intégrer les signaux systémiques de régulation de l'hématopoïèse a imposé l'hypothèse d'une niche assurant une vascularisation importante (ou niche vasculaire) par le biais de la paroi des sinusoïdes médullaires (20). Parmi les constituants de la niche vasculaire, les cellules réticulaires (via la sécrétion de grandes quantités de CXCL-12) et les cellules endothéliales (capables de favoriser la culture des CSH *in vitro* (21)) jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'hématopoïèse (23) .

La régulation des CSH dans la niche obéit à de très nombreux signaux, délivrés par une grande variété de facteurs (parathormone, systèmes Notch et Wnt/β caténine, Bone Morphologic Protein 4, hypoxie…). Récemment, une catégorie de cellules souches mésenchymateuses (CSM), exprimant la nestine, a été identifiée comme spécifiquement associé aux CSH (24). La nestine est une protéine de la famille des filaments intermédiaires. Ces cellules nestine + sont strictement périvasculaires et sont principalement localisées en zone centromédullaire ; elles sécrètent abondamment du CXCL-12, du SCF, de l'angiopoïétine-1, de l'IL-7 ou encore VCAM-1. Il a été démontré que l'efficacité de transplantation des CSH chez un hôte déplété en CSM nestine + est réduite de 90%.

Enfin, parmi les constituants essentiels de la niche hématopoïétique, les macrophages ont montré un rôle important dans la mobilisation des CSH par le G-CSF (25) .

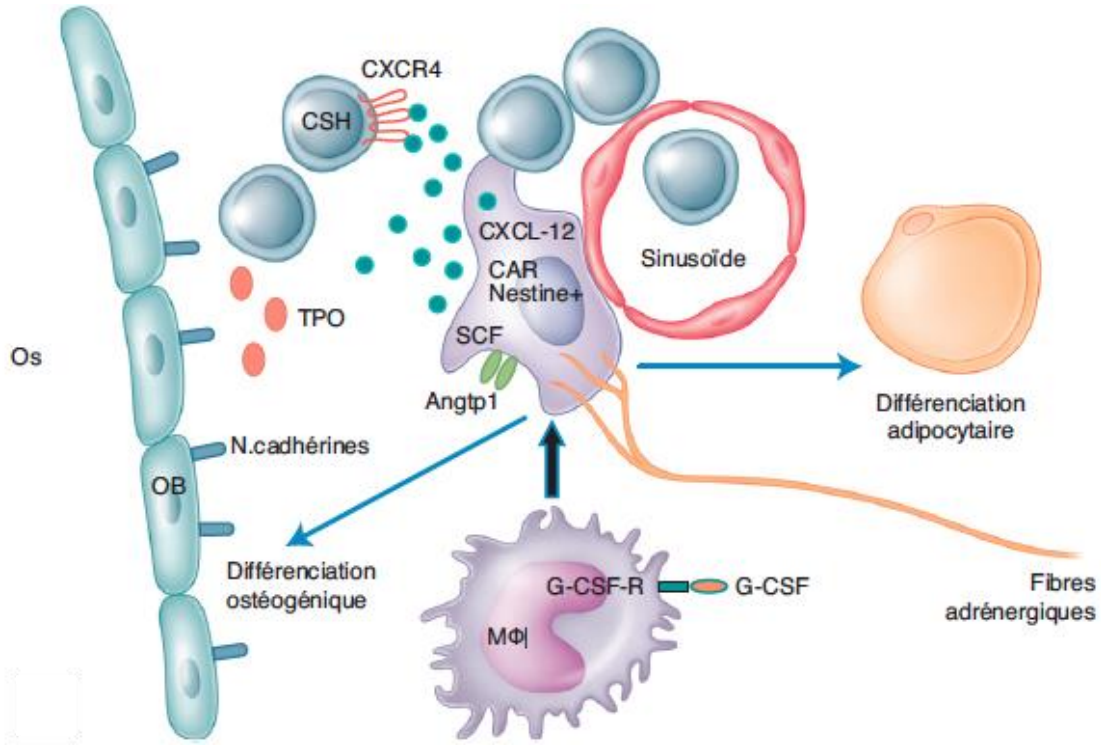


Figure 3 : représentation de la niche hématopoïétique (26)

Abréviations : OB : ostéoblastes, Mϕ : macrophage, CAR : cellule réticulaire, TPO : thrombopoïétine

b. L'hématopoïèse leucémique

L'hématopoïèse leucémique peut être expliquée par deux modèles (27) (figure 4). Dans le modèle stochastique, la combinaison aléatoire de facteurs intrinsèques et extrinsèques détermine l'émergence d'une cellule leucémique. Ce caractère aléatoire rend la prédiction impossible. Dans ce cas, l'enrichissement en fractions contenant des cellules initiatrices de leucémies (CIL) serait difficilement réalisable et reproductible par tri cellulaire.

Le modèle hiérarchique implique une leucémogénèse mimant l'hématopoïèse physiologique. La présence de CIL est implicitement obligatoire, ces cellules étant à l'origine de la leucémogénèse. Les CIL partagent beaucoup de similitudes avec les CSH physiologiques comme les propriétés d'auto-renouvellement, la quiescence, le potentiel différenciatif ou encore la capacité à initier la maladie lors d'expériences de xéno-transplantations sériées chez la souris NOD-SCID (28). De façon similaire aux CSH, les CIL peuvent être ciblées par leur immunophénotype.

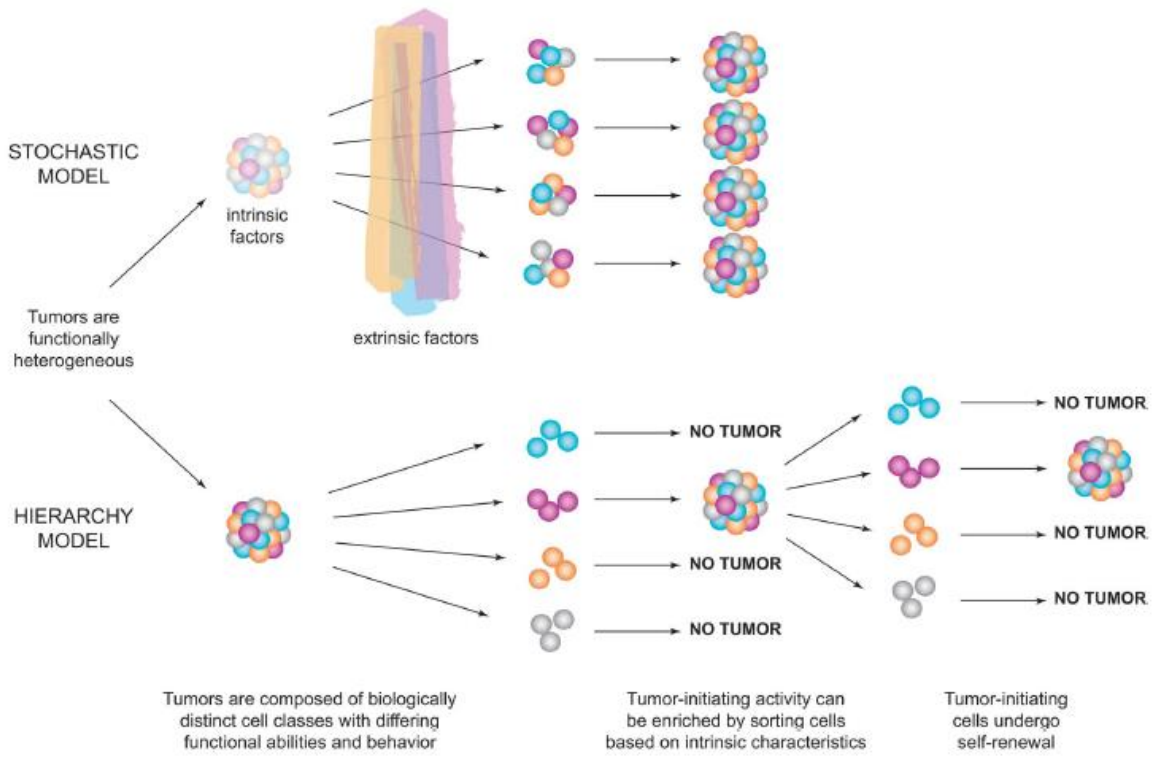


Figure 4 : modèles hiérarchique et stochastique de leucémogénèse (29)

i. Leucémogénèse et CIL

Les cellules initiatrices de tumeur sont connues et caractérisées dans d'autres pathologies tumorales, telles que les cancers du sein, du colon ou encore les tumeurs cérébrales (30). La fréquence estimée des CIL varie entre 0.28% et 0.00002% de la population leucémique totale selon le modèle utilisé (31).

L'identification des CIL reste actuellement un enjeu majeur, mais l'absence de marqueur phénotypique spécifique, et le caractère indifférencié de ces cellules, rendent leur caractérisation complexe. Néanmoins, des évaluations fonctionnelles de la présence des CIL *in vivo* sont aujourd'hui utilisées, le but étant de reproduire la leucémogénèse à partir d'un modèle de transplantations sériées de cellules de moelle osseuse de LAM chez des souris immunodéprimées (NOD-SCID par exemple). Ces expériences ont permis d'isoler trois populations cellulaires capables d'initier une leucémie : i) les « Short Term SCID-Leukemia Initiating Cells » (ST-SL-IC) pouvant initier la pathologie lors d'une première xéno-transplantation mais pas en transplantations sériées ; ii) les « Long Term SCID-Leukemia Initiating Cells » (LT-SL-IC) capables d'induire une leucémie en transplantations sériées et

pouvant engendrer des populations cellulaires ST-SL-IC ; iii) les LT-SL-IC quiescentes capables initier la leucémie lors d'une deuxième greffe après être restées quiescentes lors de la première xéno-transplantation (figure 5) (29).

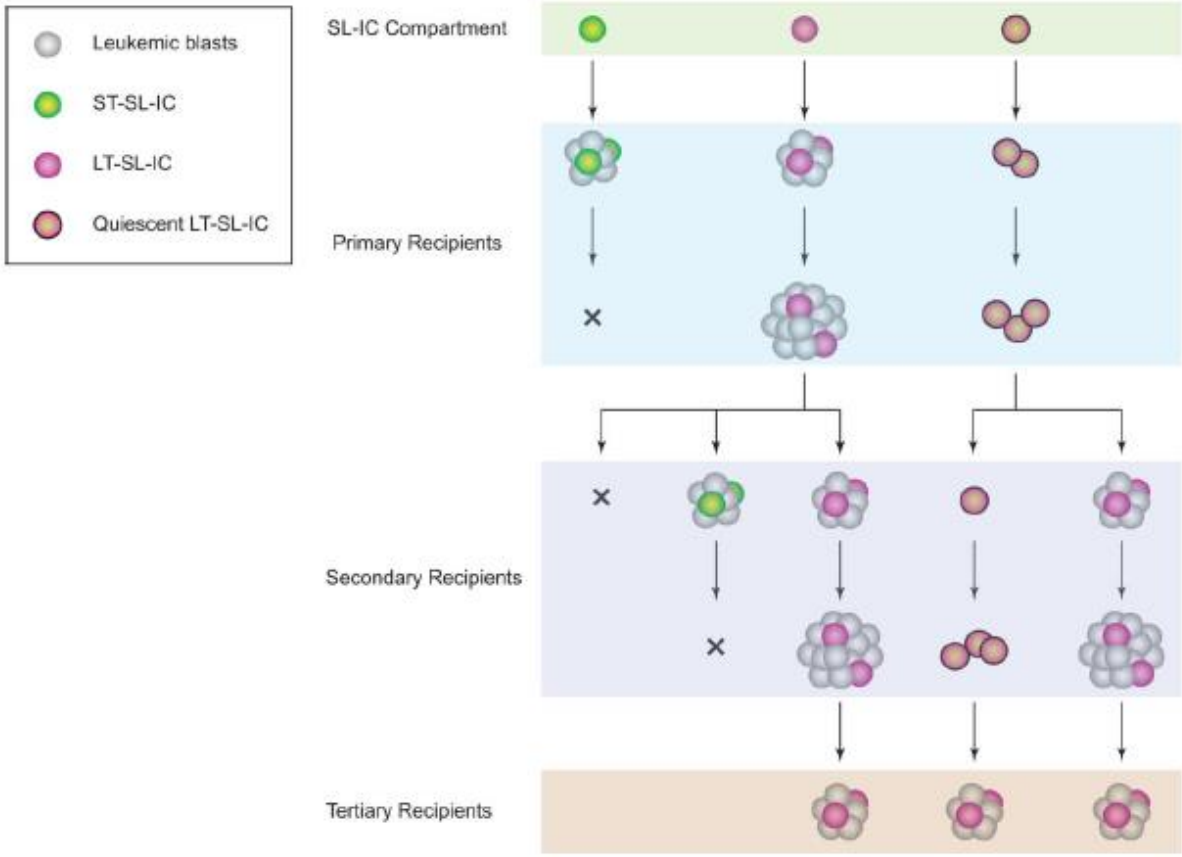


Figure 5 : hiérarchie des CIL (29)

L'impact pronostique des CIL est à ce jour bien exploré et des études mettent en évidence le lien entre la fréquence des CIL au diagnostic, leur persistance et la survie (32) (33). En effet, un pourcentage élevé de blastes CD34+CD38- au diagnostic est corrélé à un taux significativement plus élevé de rechute et une survie diminuée (32). Une explication à ces résultats tient au fait que les stratégies thérapeutiques actuelles des LAM ciblent préférentiellement les cellules proliférantes, épargnant ainsi la population de CIL, majoritairement quiescente (34). Ainsi, une meilleure caractérisation des CIL permettrait d'élaborer une combinaison thérapeutique visant à cibler spécifiquement les CIL, afin d'éradiquer définitivement la population de cellules blastiques initiatrices, tout en épargnant une hématopoïèse physiologique (11).

ii. Marqueurs de CIL

1. Les marqueurs historiques : CD34, CD38, CD90

L'identification des CIL a fait l'objet d'un grand nombre de travaux, mais, en dépit de tous les marqueurs évalués, très peu font l'objet d'un consensus à ce jour. Il y a 20 ans, différents travaux de xénogreffes de cellules de LAM chez des souris SCID (puis NOD-SCID) mettaient en évidence le rôle fondamental de la fraction CD34+CD38- dans la reconstitution post-greffe d'une population blastique leucémique, par opposition à la fraction CD34+CD38+ (27) (35,36).

Cependant, avec l'évolution des modèles murins (SCID, NOD-SCID puis NOD-SCID-γ_c^{null}) et des techniques, l'hétérogénéité des sous fractions cellulaires de LAM permettant la prise de greffe s'est avérée bien plus complexe. La reconstitution de la population blastique de LAM chez des souris immunodéprimées a depuis été possible à partir de la fraction CD34+CD38+ (37,38) et, en cas de mutation du gène *NPM1* (30% des LAM (39)), à partir de la fraction CD34- (40). Enfin, la prise de greffe n'est pas observée pour tous les blastes de patients leucémiques : les CIL provenant de LAM de pronostic cytogénétique intermédiaire ou défavorable présenteraient un meilleur potentiel de greffe que celles de pronostic favorable (41).

Si l'on considère l'hématopoïèse physiologique, les CSH sont aussi caractérisées par un phénotype CD34+CD38- ; d'autres cibles phénotypiques ont alors dû être évaluées en combinaison avec les marqueurs CD34 et CD38 afin de mieux définir les CIL et les différencier des CSH. Le CD90, une glycoprotéine de surface, appelé également Thy-1, fut l'un des premiers marqueurs testés. Son absence d'expression sur les CIL, par rapport aux CSH, en fait un paramètre intéressant pour différencier ces deux types de cellules souches (42).

2. CD123, chaîne α du récepteur de l'IL-3

Physiologiquement, le CD123 est exprimé sur les cellules dendritiques et une partie des progéniteurs granulo-monocytaires. Son ligand, l'IL-3, est un facteur de croissance essentiel de l'hématopoïèse, favorisant la prolifération des cellules hématopoïétiques immatures via les voies de signalisation JAK-STAT et MAP kinases. Le CD123 est retrouvé sur une majorité

de blastes CD34+CD38- et permettrait un enrichissement en CIL (43). De plus, son blocage membranaire dans la fraction CD34+CD38- par un anticorps monoclonal (7G3) réduit significativement la prise de greffe chez la souris NOD-SCID (44). Le groupe Ouest-Est des Leucémies Aigües et Maladies du Sang (GOELAMS) a corrélé en 2011 un taux de blastes myéloïdes CD34+CD38-CD123+ supérieur à 1% au diagnostic avec un mauvais pronostic, quel que soit le statut cytogénétique du patient (45). Récemment, une étude australienne retrouve dans la fraction CD34+CD38-CD123+ des duplications en tandem de FLT3 (*FLT3-ITD*), ce qui suggère un rôle de cette anomalie moléculaire dans l'expression du CD123 par les CIL et un statut d'évènement primaire (et non secondaire) dans le développement de la LAM (46).

3. Nouveaux marqueurs de CIL : CLL-1, TIM-3 et BMI-1

Parmi les marqueurs de CIL récemment décrits, trois d'entre eux ont retenu notre attention, en raison du nombre important de publications auxquelles ils ont donné lieu.

CLL-1 est une glycoprotéine transmembranaire de type II appartenant à une famille de récepteurs apparentée aux lectines de type C, impliqués dans la régulation du système immunitaire (47) (figure 6).

Figure 6 : schéma de la glycoprotéine CLL-1 de type II

Dans la LAM, à la fois les blastes et les CIL expriment CLL-1 (86.5% et 54.5% respectivement (47)). L'une des premières études sur CLL-1 par Bakker et al. décrivait le profil d'expression de cette molécule sur les cellules hématopoïétiques et rapportait une expression préférentielle sur les cellules myéloïdes ou sur les blastes de LAM (48). En 2007, van Rhenen et al. retrouvaient une expression de CLL-1 sur une majorité de blastes de LAM CD34+CD38- et, au contraire, une absence d'expression sur les cellules CD34+CD38- issues de moelles normales ou de régénération, suggérant un rôle important de ce marqueur dans la discrimination entre CIL et CSH physiologiques (49). L'importance de ce marqueur est

néanmoins à relativiser du fait de l'absence d'effet de l'anticorps monoclonal anti-CLL-1 sur la prise de greffe de blastes CD34+ chez la souris NOD/SCID (49).

La mucine TIM-3 est une glycoprotéine de surface constituée de quatre domaines transmembranaires (figure 7).

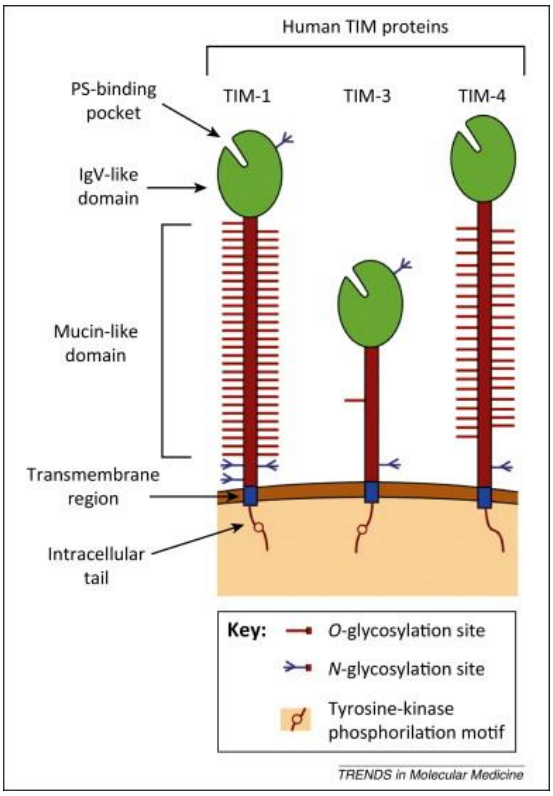


Figure 7 : schéma des glycoprotéines de la famille TIM (50)

La présence de résidus tyrosine au niveau de la queue cytoplasmique de la molécule a suggéré un rôle de TIM-3 dans la transduction du signal pour les CIL de LAM. En effet, TIM-3 est exprimée dans la sous fraction de LAM CD34+CD38- et dans la majorité des progéniteurs leucémiques CD38+ issus de leur maturation, pour tous les sous types de LAM à l'exception des LAM3 (51). De plus, son expression est absente sur les CSH physiologiques, et, *in vitro*, l'anticorps anti-TIM-3 interfère avec la prolifération des cellules blastiques (52). De ce fait, TIM-3 apparaît actuellement comme l'une des cibles les plus intéressantes sur les CIL de LAM (53).

Les phénomènes épigénétiques semblent jouer un rôle majeur dans l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH. Les protéines du groupe Polycomb (PcG) sont des répresseurs transcriptionnels de gènes impliqués dans la prolifération cellulaire et la différenciation, par

une action au niveau de la chromatine et des histones (54). De nombreuses études ont confirmé la surexpression de BMI-1 dans divers cancer solides, comme le cancer du sein (55). BMI-1 interagit avec des voies de signalisation telles que Akt, Wnt, Hedgehog, possédant ainsi des fonctions très diverses : prolifération, protection contre le stress oxydatif, protection contre l'apoptose, auto-renouvellement…(56) (figure 8).

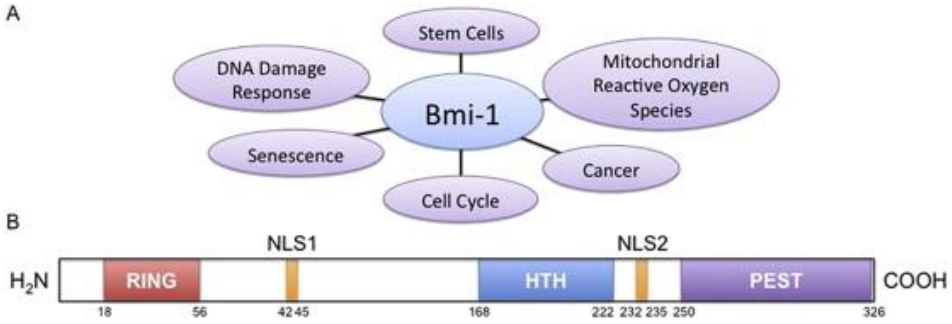


Figure 8 : fonctions de la protéine BMI-1 (A) et sa structure (B) (57) RING : Really Interesting New Gene, HTX : Helix-Turn-Helix, NLS : Nuclear Localization Signal, PEST : Motif rich in proline, glutamic acid, serine and threonine.

En hématologie, l'implication de BMI-1 a été démontrée en physiologie (prolifération des CSH) (58) et en pathologie, notamment dans les lymphomes du manteau (59). Dans une série de 51 patients atteints de syndromes myélodysplasiques (SMD) (ou de LAM post SMD), la surexpression de BMI-1 était associée à une blastose plus importante, un score IPSS plus élevé ainsi qu'à un risque de progression plus important de la maladie (60). Concernant l'allogreffe de leucémie myéloïde chronique (LMC), une forte expression de BMI-1 par les cellules de la LMC était associée à une survie post-greffe plus importante, suggérant une alloréactivité plus importante des lymphocytes du donneur contre les CIL, via un effet de type *Graf versus Leukemia* (GVL) (61).

L'inconvénient majeur de ce marqueur demeure son manque de spécificité : s'il semble essentiel pour les CIL et le développement des LAM, il reste indispensable à la survie des CSH.

4. CD81

CD81 est un membre de la superfamille des tétraspanines, dénommé à l'origine « TAPA-1 » (Target of an Anti-Proliferative Antibody) (62). Découvert sur une lignée de lymphome B

humain, des expériences de coimmunoprécipitation démontrent l'association de l'antigène au CD19 de surface de la cellule B, et la neutralisation du CD81 par un anticorps bloquant inhibe la croissance de la lignée. De façon intéressante, cet anticorps réagit significativement avec toutes les lignées lymphoïdes du sang périphérique mais très peu avec les granuleux et les monocytes.

Cette famille de protéines, conservée au cours de l'évolution, comporte 33 membres chez les mammifères. Ce sont des protéines transmembranaires, flanquées d'une extrémité C-terminale cytoplasmique. Ainsi, le CD81 comporte 4 domaines transmembranaires, une petite (SEL) et une grande (LEL, comportant 2 ponts disulfures) boucle extracellulaire (figure 9a). La structure tridimensionnelle du CD81 met en évidence 2 hélices α et une large boucle en forme de champignon, maintenue par 2 ponts disulfures (63). A l'inverse de la plupart des autres tétraspanines, la protéine CD81 n'est pas glycosylée.

Les tétraspanines s'associent entre elles et avec d'autres protéines partenaires au sein de Microdomaines Enrichis en Tetraspanines (TEM) (figure 9b). De façon notable, ces partenariats diffèrent selon le type cellulaire :

- Avec le CD19 (et indirectement avec le CD21) des cellules B (64)
- Avec le CD4 et le CD8 des cellules T (65,66)

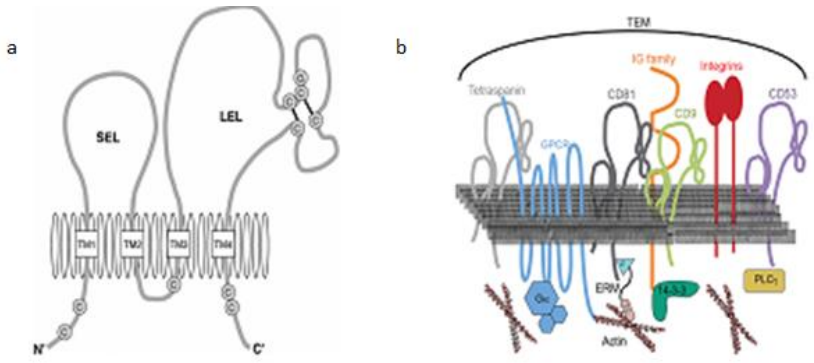


Figure 9 : le CD81 au niveau cellulaire. a : structure du CD81. b : organisation membranaire du CD81 en Microdomaines Enrichis en Tetraspanines (TEM) (67)

Le CD81 possède des rôles physiologiques très divers, variant selon le type cellulaire considéré. Par exemple, concernant les cellules non immunes, le CD81 est requis pour la fusion entre l'ovule et le spermatozoïde (68), la fusion des myoblastes pendant la

régénération musculaire (69) et pour l'entrée du virus de l'hépatite C dans les hépatocytes (70).

Dans les lymphocytes B, le CD81 permet l'assemblage du complexe CD19/CD21/CD81 et la transmission du signal suite à la reconnaissance d'antigènes par le BCR (71) . Une étude chez des souris déficientes en CD81 a mis en évidence le rôle essentiel de cette protéine dans le trafic du CD19 à la surface cellulaire (72). Le CD81 est la seule tétraspanine impliquée dans le trafic cellulaire du CD19. Le CD81 est également impliqué dans la transduction du signal du BCR, et l'engagement de cette protéine induit l'activation de nombreuses kinases, comme Syk (73). Enfin, l'association du CD81 et du CMH de classe II a été démontrée grâce à de nombreuses études d'immunoprécipitation (74). Cependant, il n'existe pas d'étude fonctionnelle évaluant le rôle des TEM dans la présentation d'antigènes aux cellules immunitaires (75).

Concernant les lymphocytes T, le CD81 interagit avec le CD28 dans la costimulation des cellules T, particulièrement les lymphocytes T naïfs. Cette costimulation entraîne une phosphorylation accrue de PLCγ, CD3ξ (intérêt dans les CARs (Chimeric Antigen Receptor)) et SLP76 (76). Comme dans les lymphocytes B, l'engagement de CD81 entraîne une réorganisation du cytosquelette sous membranaire mais, contrairement aux cellules B, une mutation de CD81 n'entraîne pas une perte de fonction du lymphocyte T (77). Une étude récente a montré que le domaine intracytoplasmique du CD4 était nécessaire à l'homodimérisation de la molécule et que de tels dimères étaient associés avec le CD81 dans les TEM (78). Enfin, plusieurs études ont noté une association du CD81 avec la protéine cytoplasmique 14-3-3ε (79).

En plus des fonctions propres aux cellules B et T, le CD81 est relocalisé au coeur de la synapse immune entre lymphocytes T et cellules présentatrices d'antigènes (80).

Les cellules hématopoïétiques, à l'exception des plaquettes et des érythrocytes, expriment le CD81 (81). Les cellules hématopoïétiques immatures CD34+ expriment également ce marqueur avec des intensités diverses. Tsuji et al. les subdivisent en 3 catégories : CD34+81+, CD34+81^{high} et CD34^{low}81+ (82). Les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes existent dans la sous population CD34+81+ et les progéniteurs mégacaryocytaires sont présents uniquement dans la sous fraction CD34^{low}81+. Les progéniteurs multipotents et érythrocytaires sont

partagés entre les sous-fractions CD34+81+ et CD34^{low}81+ ; cependant, les progéniteurs multipotents de la population CD34+81+ perdraient leur potentiel myéloïde. Les lymphocytes NK et les mastocytes sont essentiellement générés par la population CD34+CD81^{high} (82)(figure 10).

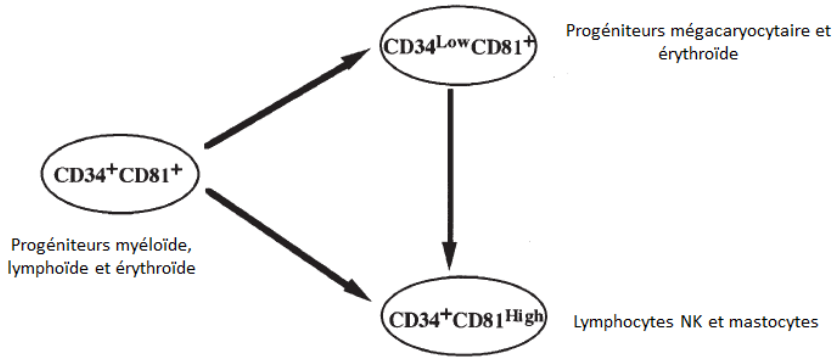


Figure 10 : hématopoïèse selon expression du CD34 et du CD81 (d'après Tsuji et al. (82))

En 2004, Venezia et al. avaient identifié plusieurs gènes préférentiellement exprimés dans les CSH selon l'état de prolifération ou de quiescence. Le gène codant pour le CD81 (localisé en 11p15.5) est sorti de cette étude comme l'un des plus régulièrement surexprimés dans les CSH exposées au stress proliératif (83). En partant de ce résultat, Lin et al. ont étudié un potentiel rôle du CD81 dans les CSH murines. Les cellules murines CD81 positives auraient la faculté de retrouver un état de quiescence plus rapidement que les cellules CD81 négatives après un stress cellulaire au 5-Fluoro-Uracile (84). Le CD81 aurait une action sur le cycle cellulaire par un mécanisme de régulation des voies de prolifération, incluant notamment la voie de signalisation Akt : le taux de phosphorylation d'Akt diminue avec le regroupement membranaire de CD81 (84).

A ce jour, le CD81 n'a été étudié ni sur les blastes de LAM, ni sur les CIL.

2. Les leucémies aigües myéloïdes (LAM)

a. Définition et épidémiologie des LAM

Les LAM sont définies comme un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs de cellules sanguines, appelés blastes, de nature myéloïde, avec blocage à un stade précoce de différenciation. Cette prolifération aboutit à

une accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, inhibant ainsi l'hématopoïèse physiologique.

Les LAM représentent 80% des leucémies aigües (LA) de l'adulte et 20% des LA de l'enfant. Alors que l'incidence des LA représente moins de 3% de tous les cancers aux Etats-Unis, ces pathologies constituent la principale cause de décès due au cancer chez les enfants et les personnes âgées de moins de 39 ans (85). L'incidence aux Etats-Unis entre 2005 et 2009 était de 3.6 cas pour 100000 habitants tout âge confondu et de 16.2 pour 100000 habitants pour les personnes âgées de plus de 65 ans (86). En Europe, le registre européen des cancers HAEMACARE retrouve une incidence similaire entre 2000 et 2002 de 3.62 pour 100000 habitants tout âge confondu et la même augmentation d'incidence chez les plus de 65 ans (87). Au vu de ces données épidémiologiques, bien que les LAM apparaissent comme une pathologie du sujet âgé, on note un pic de fréquence de ces pathologies chez les enfants de moins de 5 ans avec une incidence de 8 cas pour 100000 habitants (88).

b. Etiologies des LAM

Pour environ 10% des LAM, des facteurs de risque ont été retrouvés (89) :

- l'âge : épidémiologiquement, les LAM sont essentiellement une pathologie du sujet âgé. Ceci peut être expliqué par une majoration de l'instabilité génétique avec l'âge, avec un raccourcissement télomérique des chromosomes majorant ainsi les erreurs de réplication.
- Facteurs génétiques : le phénomène d'instabilité génétique est favorisé par certaines pathologies constitutionnelles :
    - Anomalies chromosomiques constitutionnelles : trisomie 21, syndromes de Turner et de Klinefelter… ;
    - Défaillance médullaire constitutionnelle : anémie de Fanconi, anémie de Blackfan-Diamond, neutropénies congénitales ;
    - Syndromes de cassure chromosomique : ataxie-télangiectasie, syndrome de Bloom ;
    - Neurofibromatose de type I, syndrome de Noonan ;

- Anomalies moléculaires constitutionnelles : Familial Platelet Disorder (mutations de *RUNX1*), LAM familiales associées aux mutations de *CEBPA*, SMD/LAM avec mutations de *GATA2* (90).

- Autres hémopathies myéloïdes : une partie des LAM est dite « secondaire » à diverses hémopathies chroniques telles que les syndromes myéloprolifératifs (SMP) (leucémie myéloïde chronique, myélofibrose primitive, thrombocytémie essentielle et polyglobulie de Vaquez) ou encore les SMD.
- Exposition à des agents toxiques : benzène contenu dans la fumée de cigarette (89), solvants benzéniques, radiations ionisantes, agents alkylants, phosphore 32, inhibiteurs de la topo-isomérase II utilisés en chimiothérapie anti-cancéreuse.

c. Diagnostic des LAM

i. Signes cliniques

Les signes cliniques au diagnostic sont multiples et non spécifiques, résultant de deux conséquences :

- Signes cliniques en rapport avec l'insuffisance médullaire : symptômes secondaires à l'anémie (pâleur cutanéo-muqueuse, tachycardie, asthénie) souvent d'installation rapide et, de ce fait, mal tolérée ; symptômes secondaires à la neutropénie (infections (jusqu'à l'angine ulcéro-nécrotique), fièvre résistante aux antibiotiques) ; symptômes secondaires à la thrombopénie (hémorragies cutanée et/ou muqueuse, parfois aggravées par une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD))
- Signes cliniques en rapport avec l'envahissement tumoral : une hépato-splénomégalie peut être présente, en lien avec une hypertrophie des organes hématopoïétiques. En revanche, les adénopathies sont rarement présentes dans les LAM. Certaines localisations, plus particulières, sont également observées d'emblée ou au cours de l'évolution, comme les atteintes cutanées (leucémides), neuro-méningées (anesthésie de la houppe du menton) ou l'hypertrophie gingivale (LA monocytaires).

ii. Diagnostic biologique des LAM

1. Hémogramme

L'hémogramme est constamment anormal et constitue un examen majeur dans l'orientation du diagnostic. L'anémie est quasiment constante, rencontrée dans 90% des cas, d'installation en général rapide. Classiquement, cette anémie est normochrome, normocytaire, arégénérative. La thrombopénie est également fréquente, avec une sévérité variable (un chiffre < 10 G/L est associé à un risque majoré d'hémorragies spontanées). Enfin, la leucocytose est quant à elle d'intensité variable, allant de la leucopénie (< 4G/L) à l'hyperleucocytose majeure (> 100 G/L). L'examen du frottis sanguin après coloration au MGG (May-Grünwald-Giemsa) retrouve, dans la grande majorité des cas, des cellules blastiques. Il est recommandé de compter 200 cellules nucléées sur les frottis. La présence de corps d'Auer observé dans les blastes circulants constitue une orientation essentielle pour le diagnostic de LAM.

2. Myélogramme

Une aspiration médullaire doit être impérativement réalisée en cas de suspicion de LAM. Réalisée par ponction sternale ou iliaque, le matériel prélevé permet de réaliser différents examens.

a. Examen cytologique

En dépit de la présence de blastes circulants, une analyse cytologique des frottis de moelle osseuse demeure l'examen clé du diagnostic. Le myélogramme permet de réaliser un diagnostic de certitude et de classer la LAM d'un point de vue morphologique. Un décompte de 500 éléments cellulaires est recommandé. La moelle est le plus souvent de cellularité augmentée, pauvre en mégacaryocytes, et contient plus de 20% de blastes selon les critères de l'organisation mondiale de la santé (91). Néanmoins, il existe trois situations où le diagnostic de LAM peut être posé indépendamment du pourcentage de blastes, en présence des anomalies cytogénétiques suivantes : translocation t(15;17)(q22;q12), t(8;21)(q22;q22) et inversion inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22).

L'étude morphologique, combinée à l'étude cytochimique (réaction de la myeloperoxydase (MPO) positive dans plus de 3% des blastes), permet de classer la LAM parmi l'une des 8 catégories (M0 à M7) de la classification FAB (French American British) (92). Classiquement, les blastes myéloïdes présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, une chromatine fine (avec ou sans nucléole), un cytoplasme basophile contenant des granulations azurophiles voire un ou plusieurs corps d'Auer (figure 11). La MPO se révèle cependant négative dans les LAM0, LAM5 (étude complémentaire des estérases non spécifiques (NASDA) en cytochimie) et LAM7 pour lesquelles un immunophénotypage est indispensable.

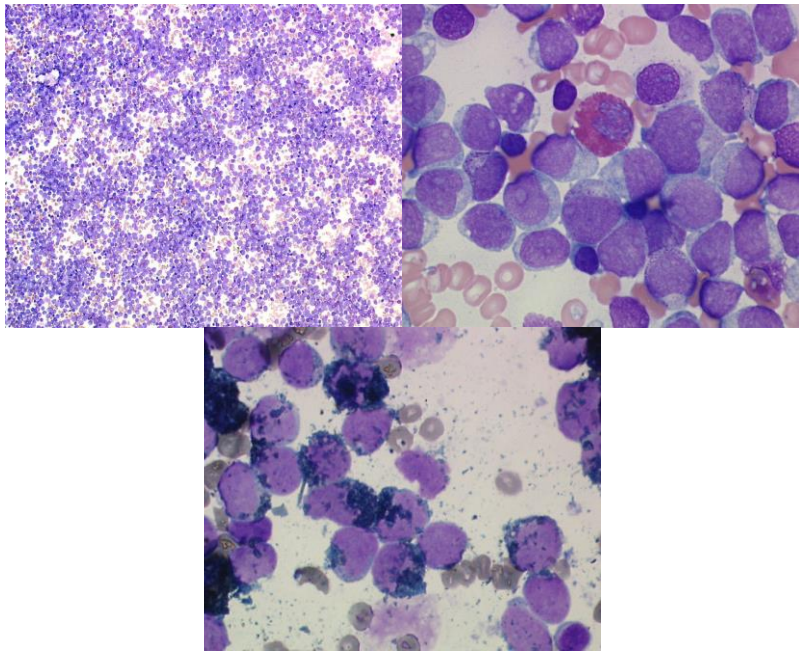


Figure 11 : examen cytologique de frottis médullaires au diagnostic (coloration au MGG).

En haut à gauche : analyse au grossissement x100 montrant une moelle très richement cellulaire. En haut à droite : étude au grossissement x1000 montrant un envahissement par des blastes présentant parfois un corps d'Auer. En bas : étude de la MPO (positive)

b. Immunophénotypage par cytométrie en flux

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) multiparamétrique est la technique de référence pour l'identification de la nature myéloïde ou lymphoïde de la prolifération blastique.

La CMF permet l'analyse de cellules placées dans le flux d'un liquide de gainage, défilant les unes après les autres devant un faisceau laser (cf Matériels et Méthodes, paragraphe 2a). Les antigènes d'intérêt, membranaires ou intra-cytoplasmiques, ciblés par des anticorps monoclonaux fluorescents, permettent de distinguer les LAM indifférenciées en cytologie des LA lymphoblastiques (LAL) par cette technique. Le diagnostic de certitude des LA monocytaires (LAM5), érythroblastiques (LAM6) et mégacaryocytaires (M7) est également posé en CMF.

L'immunophénotypage est également indispensable au diagnostic de formes particulières de leucémies, appelées leucémies biphénotypiques, caractérisées par l'expression concomittante de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes, ou encore les LA bi-linéales, caractérisées par la présence simultanée de 2 populations blastiques myéloïde et lymphoïde (93). Les classifications OMS de 2008 et 2016 regroupent ces deux entités sous l'appellation « Leucémie aiguë avec ambiguïté de lignée » (91,94).

Lineage assignment criteria
Myeloid lineage
MPO* (flow cytometry, immunohistochemistry, or cytochemistry)
or
Monocytic differentiation (at least 2 of the following: nonspecific esterase cytochemistry, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
T-lineage
Strong† cytoplasmic CD3 (with antibodies to CD3 ε chain)
or
Surface CD3
B-lineage
Strong† CD19 with at least 1 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, or CD10
or
Weak CD19 with at least 2 of the following strongly expressed: CD79a, cytoplasmic CD22, or CD10

Tableau 1 : marqueurs d'appartenance aux différentes lignées (lymphoïde et myéloïde) en CMF (94)

c. *Examen cytogénétique de la moelle*

Les anomalies cytogénétiques dans les LAM sont acquises, non aléatoires et récurrentes. Elles peuvent être spécifiques (t(15;17)(q22;q12) dans les LAM3) ou préférentiellement associées à un type de LAM (t(8;21)(q22;q22) dans les LAM2). Selon la taille du clone cytogénétique, les anomalies primaires (présentes dans tous les blastes donc apparues en

premier) peuvent être distinguées des anomalies secondaires (surajoutées aux anomalies primaires et présentes dans un ou plusieurs sous-clones).

Actuellement, le caryotype médullaire est l'examen pronostique de choix, et son impact sur les décisions thérapeutiques est déterminant.

La réalisation d'un examen cytogénétique de la moelle s'effectue de la façon suivante :

- La moelle est prélevée sur un tube hépariné, numérée, et mise en culture dans un milieu synthétique, sans adjonction de facteur mitogène, à 37°C, pendant 24 à 48 heures.
- La culture des cellules est bloquée en métaphase des cellules par adjonction d'un poison du fuseau mitotique (colchicine ou dérivés), suivie d'un choc hypotonique (afin d'assurer une dispersion optimale des chromosomes) et de plusieurs étapes de fixation avant étalement sur lame.
- Le marquage chromosomique est réalisé grâce à une dénaturation par la chaleur et/ou par la trypsine, suivie d'une coloration au Giemsa, donnant respectivement des bandes R (Reverse) et des bandes G (Giemsa).

La définition du caractère clonal d'une anomalie cytogénétique repose sur la présence d'au moins deux mitoses possédant le même gain chromosomique ou la même anomalie de structure, et la présence d'au moins trois mitoses présentant la même perte de matériel chromosomique. En théorie, cette analyse s'effectue sur 20 mitoses afin d'être interprétable, même s'il est admis que 15 mitoses peuvent être suffisantes en cas d'anomalie clonale. La classification OMS 2008 des LAM (reprise en 2016) distingue ces hémopathies en sous-types selon les anomalies cytogénétiques et moléculaires (91,94).

L'analyse cytogénétique par FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) est une option pour confirmer ou non la présence de réarrangements, de gains ou de pertes chromosomiques, ainsi que des remaniements de gènes précis comme *MLL*.

d. Biologie moléculaire

L'étude moléculaire des acides nucléiques blastiques (ARN et ADN) est aujourd'hui un examen diagnostique de première intention en raison du caractère décisionnel de certaines

altérations moléculaires. La biologie moléculaire peut également représenter une alternative à la recherche d'anomalies lorsque le caryotype est un échec (transcrits de fusion *PML-RARα* ou *RUNX1-RUNX1T1*).

Actuellement, dans le cadre des LAM à caryotype normal, la recherche des mutations de *NPM1*, *CEBPα* et *FLT3-ITD* doit être effectuée en raison de leur caractère décisionnel pour la prise en charge thérapeutique du patient.

iii. Classification des LAM

1. Classification FAB

La première classification des LAM, la classification FAB, émanait initialement d'un groupe d'experts en 1976 (92) avant d'être révisée en 1985 (95). La LAM était définie par une blastose médullaire supérieure à 30% et des critères morphologiques et cytochimiques (myeloperoxydase, estérases).

FAB	Morphologie et caractéristiques	Cytochimie			Immuno-phénotype[a,b]	Fréquence
		MPO	EST	PAS		
M0	*« Leucémie aiguë myéloblastique, peu différenciée », blastes immatures, immunophénotypage nécessaire*	< 3 %		–	Myéloïde	< 2 %
M1	*« Leucémie aiguë myéloblastique sans maturation »* Blastes immatures, immunophénotypage nécessaire	3–10 %	–	–		20 %
M2	*« Leucémie aiguë myéloblastique avec maturation »* 3–20 % de promyélocytes, souvent avec des corps d'Auer	> 30 %	–	–		30 %
	Sous-type « M2Baso » : avec basophilie					< 2 %
M3	*« Leucémie aiguë promyélocytaire » (LAP)* > 30 % de promyélocytes, corps d'Auer souvent en amas, « fagots »	+++	–	–/+	HLA-DR-	10 %
	Sous-type « M3v » Variante microgranulaire : noyaux lobulés ou réniformes, des corps d'Auer, parfois des granulations azurophiles, morphologie semblable à celle des blastes monocytoïdes. Analyses cytogénétique et génétique moléculaire nécessaires	++	–	–/+		
M4	*« Leucémie aiguë myélomonocytaire ».* Semblable à M2, toutefois fraction pro- monocytaire > 20 %	+	+	–		30 %
	Sous-type « M4Eo » : ≤ 30 % d'éosinophiles anormaux (noyaux type monocyte, granules éosinophiles ou basophiles immatures). Analyses cyto-/moléculaire génétiques nécessaires	+	+	+		
M5	*« Leucémie aiguë monoblastique »* ≥ 80 % des cellules médullaires non érythroïdes sont des cellules à type de monocyte. Sous-type « M5a » monoblastes immatures, monoblastes « M5b » avec maturation, noyau cérébriforme.	+/–	+	–/+		10 %
M6	*« Érythroleucémie aiguë » (Di Guglielmo)* ≥ 50 % des cellules médullaires nucléées sont des érythroïdes, ≥ 30 % des cellules non érythroïdes sont des blastes	–	–	+/–	Glycopho-rine+	< 5 %
M7	*« Leucémie aiguë mégacaryoblastique »* Population de blastes hétérogènes, mégacaryocytes anormaux. Souvent « ponction sèche », immunophénotypage nécessaire dans ce cas	–	–	+/–	CD61+/ CD41+	< 5 %

[a] Dans tous les types de LAM : ≥ 2 des marqueurs suivants sont positifs : myélopéroxidase, CD13, CD33, CD65, CD117
[b] La classification FAB est basée sur des critères morphologiques et cytochimiques. À quelques exceptions près (M0, M7) il n'y a pas de forte corrélation entre la classification FAB et l'immuno-phénotype. Les marqueurs listés correspondent aux associations fréquentes. Phénotypage immunologique ▶ Chap. 2.5
MPO myélopéroxidase, *EST* estérase non spécifique (naphtyle acétate estérase), *PAS* réaction acide périodique-Schiff

Tableau 2 : classification FAB (1985) (96)

Néanmoins, cette classification, strictement morphologique, n'a pas de valeur pronostique, hormis pour les entités les plus rares (LAM6 et LAM7) de pronostic défavorable et les LAM3, de pronostic devenu favorable depuis l'introduction de l'acide-tout-*trans*-rétinoïque dans la chimiothérapie de ces leucémies.

2. Classification OMS (2008 puis 2016)

Afin d'inclure des informations récentes d'ordre cytogénétique et moléculaire, l'OMS a complété cette classification FAB, permettant ainsi la définition de plusieurs entités de LAM ayant une signification pronostique distincte. Cette nouvelle classification abaissait également le seuil diagnostique de 30 à 20% de blastes médullaires (97). Une révision de cette classification a été proposée en 2008 afin d'y intégrer les nouveaux marqueurs moléculaires (tableau 3).

Acute myeloid leukemia and related neoplasms
Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities
AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*
AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*
AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*
AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*
Provisional entity: AML with mutated NPM1
Provisional entity: AML with mutated CEBPA
Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes
Therapy-related myeloid neoplasms
Acute myeloid leukemia, not otherwise specified
AML with minimal differentiation
AML without maturation
AML with maturation
Acute myelomonocytic leukemia
Acute monoblastic/monocytic leukemia
Acute erythroid leukemia
Pure erythroid leukemia
Erythroleukemia, erythroid/myeloid
Acute megakaryoblastic leukemia
Acute basophilic leukemia
Acute panmyelosis with myelofibrosis
Myeloid sarcoma
Myeloid proliferations related to Down syndrome
Transient abnormal myelopoiesis
Myeloid leukemia associated with Down syndrome
Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

Tableau 3 : classification OMS 2008 (91)

Le premier sous-groupe est constitué par les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes. 3 catégories de la classification OMS 2001 sont reprises, à savoir les LAM avec t(8;21)(q22;q22), les LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) et les LAM avec t(15;17)(q22;q12). Pour ces entités, la présence de l'anomalie, indépendamment de la blastose médullaire, est suffisante pour poser le diagnostic de LAM. Ce sous-groupe inclut également les LAM avec t(9;11) (et exclusion de ce fait des autres LAM avec réarrangement du gène *MLL*), les LAM avec t(6;9), les LAM avec inv(3) et les LAM avec t(1;22). Les LAM avec mutation de *NPM1* et *CEBP*α, définies comme entités provisoires en 2008, sont désormais classées à part entière dans ce sous-groupe par la classification 2016. Cette dernière classification de 2016 inclut deux nouvelles entités provisoires, à savoir les LAM avec fusions *BCR-ABL1* (en raison de l'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase dans les chimiothérapies) et les LAM avec mutations de *RUNX1*.

Le second sous-groupe considère les LAM avec anomalies de type myélodysplasie. Dans ce sous-groupe, les entités suivantes sont incluses :

- LAM secondaires à un SMD ou un SMP/SMD
- LAM avec des anomalies cytogénétiques caractéristiques des SMD (tableau 4)
- LAM avec dysplasie multilignées (dysplasie supérieure à 50% des cellules d'au moins deux lignées hématopoïétiques)

Cytogenetic abnormalities
Complex karyotype (3 or more abnormalities)
Unbalanced abnormalities
−7/del(7q)
del(5q)/t(5q)
i(17q)/t(17p)
−13/del(13q)
del(11q)
del(12p)/t(12p)
idic(X)(q13)
Balanced abnormalities
t(11;16)(q23.3;p13.3)
t(3;21)(q26.2;q22.1)
t(1;3)(p36.3;q21.2)
t(2;11)(p21;q23.3)
t(5;12)(q32;p13.2)
t(5;7)(q32;q11.2)
t(5;17)(q32;p13.2)
t(5;10)(q32;q21.2)
t(3;5)(q25.3;q35.1)

Tableau 4 : anomalies cytogénétiques définissant cette catégorie (94)

La classification 2016 précise que les LAM avec anomalies de type myélodysplasie mais mutées *NPM1* ou *CEBP*α ne doivent pas être incluses dans cette catégorie en raison de leurs pronostics différents.

Le troisième sous-groupe regroupe les LAM secondaires à des traitements (*therapy-related* AML), notamment radiothérapie ou agents alkylants, inhibiteurs de la topo-isomérase II.

Le quatrième sous-groupe distingue les LAM sans spécificité particulière (NOS-AML) et représente environ un tiers de l'ensemble des LAM. Cette catégorie reprend la classification FAB en ayant ajouté les LAM avec différenciation basophile et les LAM avec myélofibrose (nécessité d'une biopsie ostéo-médullaire dans ces cas-là). Un changement important a été apporté par la classification OMS 2016 : l'érythroleucémie (préalablement définie par une hyperplasie érythroblastique supérieure à 50% des cellules médullaires et une blastose médullaire ≥ 20% des cellules non érythroïdes) a été retirée de cette catégorie pour être classée désormais parmi les SMD avec excès de blastes. Les cas avec plus de 50% d' érythroblastes et plus de 20% de myéloblastes présentent habituellement les critères pour êtres inclus dans la sous-catégorie des LAM avec anomalies de type myélodysplasie. La classification OMS 2016 résume les différents cas de figure possibles (tableau 5).

BM erythroid precursors	Myeloblast % of all cells in BM (or PB)	Prior therapy?	Recurring WHO genetic abnormality?	Meets criteria for AML-MRC?	Fourth edition diagnosis	Updated fourth edition diagnosis
≥50%	NA	Yes	NA	NA	Therapy-related myeloid neoplasm	Therapy-related myeloid neoplasm
≥50%	≥20%	No	Yes	NA	AML with recurring genetic abnormality	AML with recurring genetic abnormality
≥50%	≥20%	No	No	Yes	AML with myelodysplasia-related changes	AML with myelodysplasia-related changes
≥50%	≥20%	No	No	No	AML, NOS, acute erythroid leukemia (erythroid/ myeloid type)	AML, NOS (non erythroid subtype)
≥50%	<20%, but ≥20% of nonerythroid cells	No	No*	NA	AML, NOS, acute erythroid leukemia (erythroid/ myeloid subtype)	MDS†
≥50%	<20%, and <20% of nonerythroid cells	No	No*	NA	MDS†	MDS†
>80% immature erythroid precursors with ≥30% proerythroblasts	<20%	No	No*	NA	AML, NOS, acute erythroid leukemia (pure erythroid type)	AML, NOS, acute erythroid leukemia (pure erythroid type)

Tableau 5 : approche diagnostique pour les hémopathies myéloïdes avec plus de 50% d'érythroblastes médullaires (94)

Les trois derniers sous-groupes concernent les sarcomes myéloïdes, les proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down et les néoplasies à cellules dendritiques plasmocytoïdes (CD4+ et CD56+).

Enfin, la classification OMS 2016 rajoute une catégorie, celle des hémopathies myéloïdes avec prédisposition génétique et dans laquelle des LAM peuvent être classées, à côté de SMD et SMD/SMP (94).

c. Facteurs pronostiques des LAM

Le pronostic des LAM est influencé à la fois par des facteurs liés au patient et des facteurs liés à la pathologie elle-même (98).

i. L'âge

L'âge du patient au diagnostic demeure le facteur pronostique lié au patient le plus important à l'heure actuelle. L'influence de l'âge sur le pronostic est évident à partir de 50 ans (99) ainsi que pour les patients âgés de moins de 30 ans (100). Plusieurs facteurs contribuent à ce mauvais pronostic chez les patients âgés : des comorbidités et des contre-indications à une chimiothérapie intensive plus fréquentes, un état général souvent altéré (caractérisé par un statut de performance de l'OMS (ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group) plus élevé), une plus grande incidence de LAM secondaires (SMD, traitements) ainsi qu'une fréquence élevée d'anomalies cytogénétiques défavorables au détriment d'anomalies favorables. Cependant, les patients âgés de plus de 65 ans conservent un mauvais pronostic, même après un traitement intensif, indépendamment du risque cytogénétique (101).

ii. Statut de performance OMS

Le statut ECOG est particulièrement important chez les sujets âgés. Un ECOG > 2 constitue un facteur indépendant de mauvais pronostic (99) et la combinaison de l'âge et du statut de performance est très prédictif d'un décès consécutif au traitement d'induction chez les sujets âgés (101).

iii. Paramètres biologiques

Une hyperleucocytose au diagnostic, ainsi qu'un taux de LDH (lactate deshydrogenase) élevé, sont associés à un mauvais pronostic (102,103). Néanmoins, il n'existe pas de consensus concernant les seuils significatifs de ces paramètres. Les taux d'hémoglobine, de plaquettes,

ou de fibrinogène, ont également démontré une influence sur le pronostic des LAM (102–104).

iv. Facteurs liés à la LAM

1. Cytogénétique

Démontré dès 1982, le risque cytogénétique demeure actuellement le facteur de survie lié à la maladie le plus important dans les LAM (105).

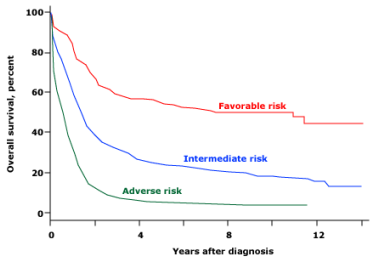


Figure 12 : survie et risque cytogénétique (106)

Les translocations équilibrées impliquant le facteur de transcription CBF (Core-Binding Factor), i.e les t(8;21), les inv(16) ou t(16;16), constituent les anomalies de risque cytogénétique favorable. En revanche, le consensus à propos des anomalies de risque cytogénétique défavorable est moins établi. L'étude la plus exhaustive concernant le relation entre risque cytogénétique et survie portait sur plus de 5800 patients atteints de LAM (107). Cette étude retrouvait comme anomalies cytogénétiques défavorables suivantes : anomalies (3q) (à l'exception de t(3;5)(q25;q34)), inv(3)(q21q26)/t(3;3)(q21;q26), anomalies (5q)/del(5q), -5, -7, anomalies (7q)/del(7q), t(11q23) (à l'exception de t(9;11)(p21-p23;q23) et t(11;19)(q23;p13)), t(9;22)(q34;q11), -17, anomalies (17p) et les caryotypes complexes (strictement plus de 3 anomalies au cayotype).

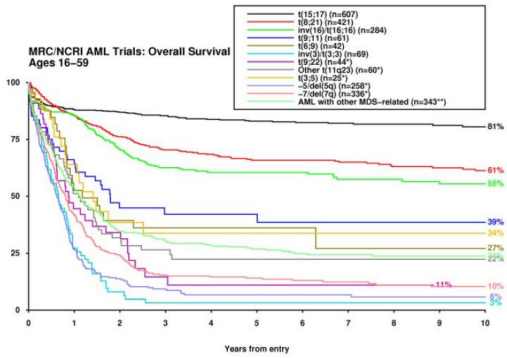


Figure 13 : anomalies cytogénétiques et survie globale dans les LAM (107)

En plus de cette classification, le groupe de travail belge et hollandais en Onco-Hématologie (HOVON) a identifié un caryotype monosomal, défini par l'association d'ne monosomie autosomale au caryotype avec une autre anomalie structurale ou une autre monosomie autosomale, comme étant un facteur de mauvais pronostic indépendamment de la présence d'un caryotype complexe (108). Enfin, une cytogénétique défavorable est aussi un facteur de mauvaise réponse à un traitement palliatif à base de faibles doses de cytarabine (109).

2. Biologie moléculaire

L'identification de mutations et/ou de la dérégulation d'expression d'un certain nombre de gènes ont permis ces dernières années d'affiner le pronostic de la pathologie, en particulier dans le vaste et très hétérogène groupe des patients avec un caryotype normal (LAM-CN)(110).

A ce jour, seuls trois gènes ont prouvé un rôle pronostique indéniable, et impactent la prise en charge thérapeutique des patients.

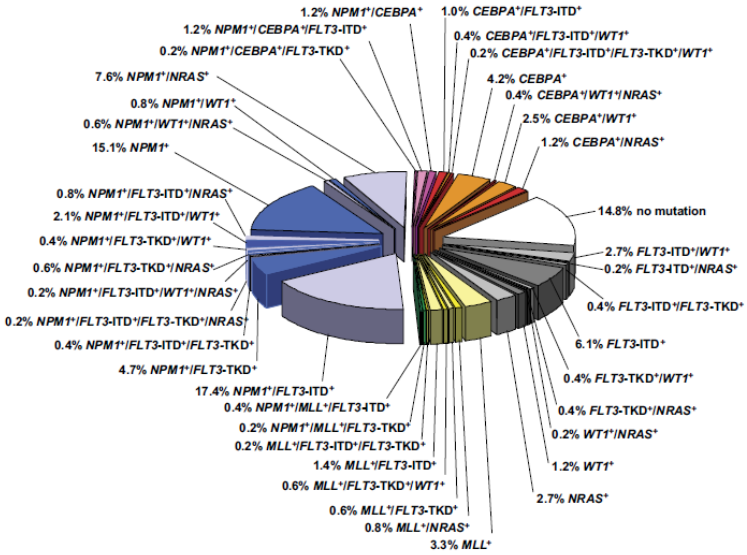


Figure 14 : hétérogénéité moléculaire des LAM-CN (38)

FLT3 :

La duplication en tandem *FLT3-ITD* est retrouvée chez environ 35% des patients atteints de LAM et confère un pronostic péjoratif chez les patients avec une cytogénétique favorable (111,112) ou intermédiaire (113,114). Chez ces derniers, si le gène *NPM1* est également muté, l'impact pronostique péjoratif n'est présent que si la taille de la duplication est importante, alors qu'en l'absence de mutation *NPM1*, la seule présence de *FLT3-ITD* confère un mauvais pronostic (115,116). La taille de la duplication est fortement corrélée à sa localisation au sein du gène *FLT3* (117) mais son impact pronostique reste controversé (114,117,118). Deux études récentes ont retrouvé une fréquence de *FLT3-ITD* chez des patients de plus de 60 et de 65 ans respectivement de 14 et de 12% (119,120). *FLT3-ITD* n'avait pas d'impact pronostique indépendant chez ces patients, tandis qu'une autre étude, s'intéressant à des patients LAM-CN de plus de 60 ans traités par chimiothérapie intensive montrait que la présence de *FLT3-ITD* constituait un facteur indépendant de mauvais pronostic (121). En revanche, aucun impact pronostique n'a été retrouvé pour les mutations activatrices du domaine tyrosine kinase de FLT3 (*FLT3-TKD*) (122).

NPM1 :

A ce jour, les mutations du gène *NPM1* constituent l'altération moléculaire la plus fréquemment rencontrée dans les LAM avec une fréquence oscillant entre 46 et 64% des LAM-CN, par comparaison aux 9 à 18% de LAM avec une cytogénétique anormale (123). Les mutations de NPM1 ont un impact pronostique favorable chez les patients LAM-CN, en présence ou en l'absence de *FLT3-ITD* (110,114,124).

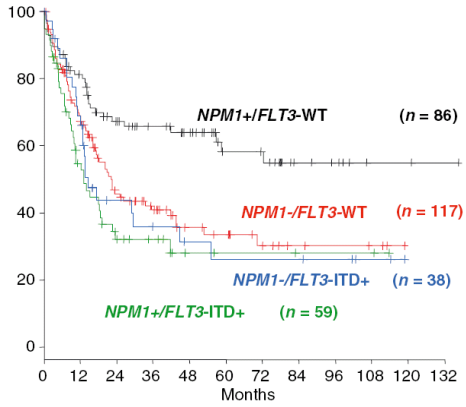


Figure 15 : impact des mutations de *NPM1* sur la survie des patients LAM-CN (124)

L'impact pronostique de ces mutations est en revanche peu clair concernant les caryotypes défavorables. Ces mutations ont été retrouvées chez 56% des patients LAM-CN de plus de 60 ans ; *NPM1* constituait alors un facteur indépendant de pronostic favorable (125). Dans une autre étude réalisée chez les patients de plus de 65 ans, tout venants, l'incidence des mutations de *NPM1* était seulement de 16% et un impact pronostique n'était retrouvé qu'en l'absence de *FLT3-ITD* (119).

CEBPα:

Les doubles mutations de *CEBPα* (*CEBPα* dm) sont un facteur de pronostic favorable dans les LAM-CN (126). Ces mutations bi-alléliques ont été incorporées dans la classification de l'ELN combinant les facteurs de risque cytogénétique et moléculaire (39). Il est important de noter que le bon pronostic des mutations de *CEBPα* est uniquement restreint aux mutations bi-alléliques (127) en l'absence de *FLT3-ITD* (128).

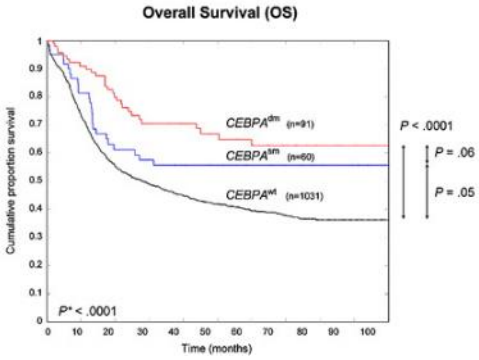


Figure 16: impact des mutations de *CEBPα* sur la survie des patients LAM-CN (15)

3. Caractère secondaire de la LAM

Comme défini précédemment, les LAM secondaires surviennent après traitement potentiellement leucémogène, exposition à des radiations ionisantes ou après d'autres pathologies hématologiques telles que les SMD, SMD/SMP ou SMP.

Les LAM secondaires à une chimiothérapie constituent un facteur indépendant de mauvais pronostic en comparaison aux LAM *de novo* avec une influence majeure du caryotype (129). Les pertes d'hétérozygotie (CN-LOH) ont également démontré un impact pronostique péjoratif au sein de LAM secondaires à un SMP sans chromosome Philadelphie (130).

4. Fréquence des CIL

De plus en plus d'études suggèrent qu'une fréquence élevée de CIL au diagnostic de LAM est associée à un pronostic plus sombre. Du fait de leur quiescence, les CIL sont chimiorésistantes (34). Une étude récente a corrélé une plus grande quantité de cellules CD34+CD38- au diagnostic, fraction sensée être enrichie en CIL, avec une survie significativement diminuée (33) tandis que Vergez et al. confirmaient ce résultat en y incorporant l'expression du CD123 sur les blastes CD34+CD38- (45).

5. Maladie résiduelle (MRD)

a. Expression aberrante d'antigènes associée à la LAM (LAIP)

Les progrès techniques en CMF multiparamétrique permettent aujourd'hui la détection des LAIP (*Leukemia-Associated Immunophenotype*) pour la majorité des patients au diagnostic. Des protocoles standardisés de CMF pour la détection et le suivi des LAIP en MRD ont été proposés dans un but d'amélioration de la sensibilité de la technique (131). Chez les patients adultes, Buccisano et al. ont détecté un LAIP chez 86% des patients atteints de LAM au diagnostic et la MRD par CMF en post consolidation était associée à la survie chez les patients de caryotype favorable ou intermédiaire (132). La faisabilité et l'impact pronostique d'un suivi centralisé de la MRD a été démontré de façon prospective lors d'un essai clinique chez les patients jeunes atteints de LAM (133). Une MRD > 0.1% chez des patients en rémission complète post induction était associée à un risque de rechute plus élevé en analyse multivariée (133). Une MRD positive en pré-greffe chez des patients en rémission cytologique (<5% blastes médullaires) a été associée à un risque de rechute important, comparable aux patients avec une maladie active (134).

b. MRD en biologie moléculaire

Au diagnostic, la plupart des patients atteints de LAM présente des anomalies chromosomiques ou moléculaires permettant une quantification de la MRD au cours du traitement (135). Une corrélation de ces différents marqueurs avec la survie nécessite une évaluation individuelle de chaque gène ou transcrit de fusion.

LAM de type CBF :

Dans ces leucémies, une réduction de la MRD inférieure à 3 log entre le diagnostic et la fin de la première consolidation est un facteur indépendant de rechute d'après l'étude française du CBF 2006 (136).

LAM avec mutations de *NPM1*

Kronke et al. en 2011 ont démontré qu'une MRD négative pour *NPM1* (après induction et en fin de traitement) était associée à une amélioration de la survie globale ; de plus, le seuil de 2 copies de *NPM1* muté (/100 copies d'*ABL1*) était prédictif d'une rechute post allogreffe (137). Par contre, une autre étude ne retrouvait pas d'impact de la MRD *NPM1* sur la survie globale chez les patients traités par chimiothérapie intensive (138). Toutefois, environ 10% des patients initialement mutés *NPM1* perdent la mutation à la rechute, ce qui constitue une limite du suivi de la MRD pour ce marqueur (139).

Autres marqueurs

L'intérêt de marqueurs comme *FLT3-ITD* et *CEBPα* n'a été évalué que sur de petites séries, qui n'ont pas pu démontrer de lien entre MRD et survie chez les patients. De plus, la perte fréquente de *FLT3-ITD* au cours de l'évolution de la maladie limite l'intérêt de ce marqueur dans le suivi de la MRD (140).

d. Traitement des LAM du sujet jeune

Pour les patients aptes à recevoir une chimiothérapie intensive, le traitement comporte classiquement une phase d'induction puis de consolidation dans un but curatif.

i. Chimiothérapie d'induction

Avant le début du traitement d'induction, les désordres métaboliques doivent être corrigés, les formes hyperleucocytaires maîtrisées (par de l'hydroxyurée ou un début précoce du traitement) et les états septiques instables doivent être contrôlés autant que possible.

Le régime standard associe trois jours d'anthracycline (daunorubicine 45 à 60mg/m^2/jour ou idarubicine ou mitoxantrone (141)) à sept jours de cytarabine (100 à 200 mg/m^2/jour) en

perfusion continue, permettant ainsi l'obtention d'une RC chez 60 à 80% des patients les plus jeunes et 40 à 60% des patients les plus âgés. L'utilisation de fortes doses de daunorubicine (90 mg/m^2) a permis une augmentation significative du taux de RC et de la survie globale, sans augmentation de la toxicité chez les patients âgés de moins de 50 ans (142).

L'utilisation de cytarabine à fortes doses ou l'adjonction d'un autre agent cytostatique (étoposide, thioguanine) n'améliore pas significativement les résultats.

Le traitement d'induction de la LAM3 comporte classiquement une anthacycline et de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA 45 mg/m^2/j). Récemment, des équipes allemandes et italiennes ont rapporté une survie supérieure avec l'association ATRA-trioxyde d'arsenic (en terme de survie) par rapport à l'association classique anthracycline-ATRA chez les patients de faible risque (143).

ii. Chimiothérapie de consolidation

Un traitement de consolidation est débuté seulement en cas de RC obtenue après la chimiothérapie d'induction. En fonction des facteurs de risque cytogénétiques et moléculaires, des comorbidités du patient et de l'existence ou non d'un donneur HLA compatible, ce traitement connaîtra des modalités différentes.

Pour les LAM du groupe favorable (LAM du groupe CBF, LAM à caryotype normal *NPM1*+/*FLT3-ITD*- et *CEBP*α double mutées (39)), une allogreffe de CSH en RC1 (rémission complète 1) n'est pas recommandée. La réalisation de 3 cures de consolidation à base de cytarabine haute dose (3g/m^2/12h) a démontré son efficacité chez ces patients par rapport à des doses intermédiaires (144,145).

Concernant les LAM de pronostics intermédiaire et défavorable, l'allogreffe de CSH après conditionnement myéloablatif en cas de donneur compatible reste l'option thérapeutique à privilégier en RC1, si les comorbidités du patient le permettent. Une amélioration de l'OS et de la DFS chez ces patients a été prouvée par rapport à la chimiothérapie conventionnelle (146).

e. Traitement des LAM du sujet âgé

Dès le diagnostic, les éléments pronostiques péjoratifs doivent être répertoriés: comorbidités, caractère secondaire, cytogénétique, biologie moléculaire. Le caryotype est en effet nécessaire dans la mesure où les LAM de cytogénétique défavorable présentent des taux de RC de 30% et une survie globale (OS) très faible (147).

La chimiothérapie d'induction est similaire à celle du sujet jeune si un risque prévisible de toxicité majeure n'est pas évident (3 jours d'anthracycline combinés à 7 jours de cytarabine). Afin de respecter une qualité de vie décente, certains traitements de support peuvent alors êtres proposés en combinaison avec une chimiothérapie palliative (hydroxyurée, cytarabine à faible dose si caryotype normal ...). Castaigne *et al* ont mis en évidence une amélioration de la survie globale à 2 ans en associant, en induction et en consolidation, le gemtuzumab ozogamicin (anti-CD33 combiné à la calicheamicine) dans les LAM de cytogénétique intermédiaire (148). Concernant le traitement de consolidation, il n'existe pas de recommandation claire dans la littérature. Néanmoins, les LAM du sujet âgé avec mutations de *NPM1* semblent bénéficier d'une chimiothérapie intensive (125).

f. Protocoles de traitement des LAM

i. Le protocole ALFA-0701

Le protocole ALFA-0701 est une étude de phase III randomisée multicentrique étudiant l'effet de l'addition de l'anticorps monoclonal Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg®) utilisé à doses fractionnées, ajouté au régime de chimiothérapie conventionnelle. Les critères majeurs d'éligibilité sont l'âge des patients (50 à 70 ans) ainsi que le caractère *de novo* de la LAM.

Ce protocole se compose de la façon suivante (figure 17) :

- Une phase d'induction avec une randomisation dans 2 bras, A et B. Chacun des 2 bras comporte de la daunorubicine à 60 mg/m^2/j de J1 à J3 et de la cytarabine à 200 mg/m^2/j de J1 à J7 ; le bras B comporte en plus du Mylotarg® à 3 g/m^2/j à J1, J4 et J7.

- Une évaluation à J15 par la réalisation d'un myélogramme. Une blastose médullaire supérieure à 10% entraîne un traitement de rattrapage du patient par de la daunorubicine à J1 et J2 ainsi que de la cytarabine de J1 à J3.

- Pour les patients ayant atteint la rémission complète, une phase de consolidation est alors envisagée. Dans les bras A et B, les patients reçoivent deux cures de daunorubicine à 60 mg/m^2/j à J1 et de cytarabine 1 mg/m^2/12h de J1 à J4 et du Mylotarg® 3 mg/m^2/j à J1 pour les patients inclus dans le bras B.

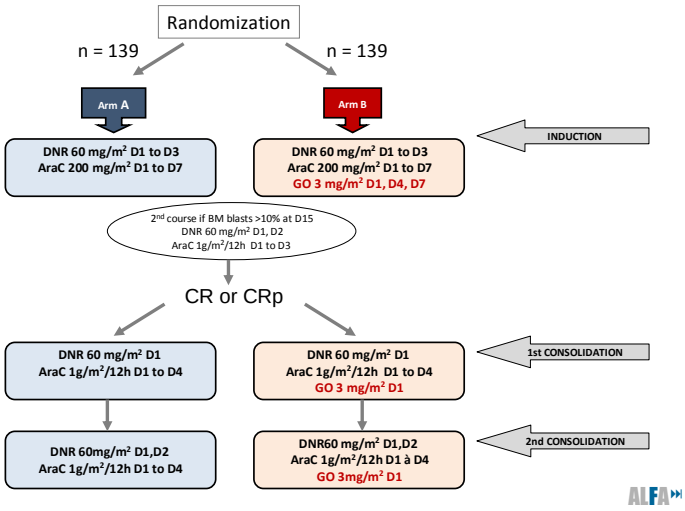


Figure 17 : schéma du protocole ALFA-0701

ii. Le protocole ALFA-0702 (CLARA)

Le protocole ALFA-0702 est une étude randomisée de phase II, multicentrique, testant l'association clofarabine/cytarabine à doses intermédiaires comparativement à la cytarabine à fortes doses en traitement de consolidation chez l'adulte jeune atteint d'une LAM et à l'exception des LAM de bon pronostic (LAM3 et LAM de type CBF). L'âge des patients est compris entre 18 et 60 ans.

Le protocole se déroule de la façon suivante (figure 18) :

- Une phase d'induction séquentielle commune à tous les patients comporte de la daunorubicine (60 mg/m^2/j de J1 à J3 et 35 mg/m^2/j à J8 et J9), de la cytarabine (500 mg/m^2) de J1 à J3 et 1g/m^2/12 heures de J8 à J10 et du G-CSF de J1 à J10.
- De l'idarubicine et des hautes doses de cytarabine sont proposées en traitement de rattrapage si le myélogramme réalisé en post induction ne montre pas de RC.
- Les patients achevant une RC, sans donneur HLA compatible et non mutés *NPM1* et *CEBPα* isolément, sont alors randomisés pour trois cures de consolidation. Le premier groupe reçoit de la cytarabine haute dose (3g/m^2/12h à J1, J3, J5) tandis que le second groupe reçoit l'association clofarabine (30 mg/m^2 de J2 à J6) et cytarabine (1g/m^2 de J1 à J5). Chaque groupe reçoit en plus du G-CSF pendant toute la durée des cures.

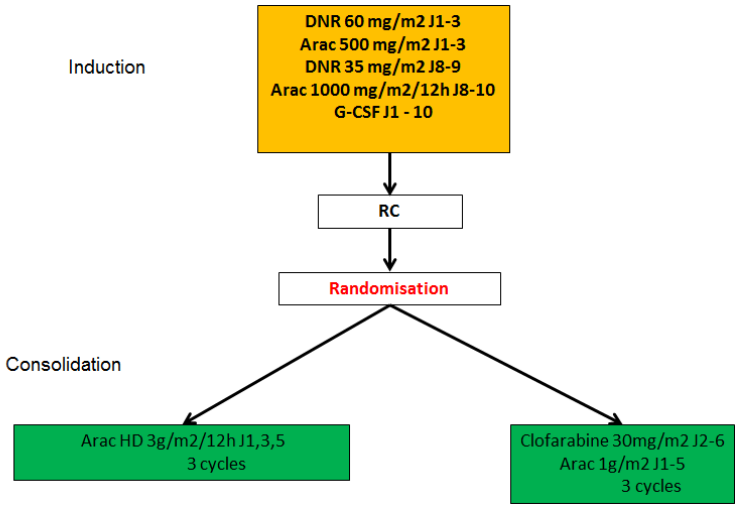


Figure 18 : schéma du protocole ALFA-0702

iii. Le protocole CBF-2006

Le protocole CBF-2006 est une étude de phase III, multicentrique, prospective (entre juillet 2007 et novembre 2010), randomisée, comparant une chimiothérapie d'induction systématique à une chimiothérapie d'induction séquentielle conditionnelle chez des patients atteints d'une LAM du groupe CBF. Les patients devaient être âgés de 18 à 60 ans et être atteints d'une LAM CBF, *de novo* ou secondaire, définie de la façon suivante :

- Pour le sous-groupe CBFα : présence de la t(8;21)(q22;q22) mise en évidence par cytogénétique conventionnelle et/ou hybridation *in situ* et/ou mise en évidence du transcrit de fusion *RUNX1-RUNX1T1* par RQ-PCR.
- Pour le sous-groupe CBFβ : présence de l'inv(16)(p13q22) ou de la t(16;16)(p13;q22) en cytogénétique conventionnelle et/ou hybridation *in situ* et/ou mise en évidence du transcrit de fusion *CBFB-MYH11* par RQ-PCR.

Ce protocole s'organise de la façon suivante (figure 19) :

- Les patients du bras ALFA reçoivent une première cure de J1 à J3 comprenant daunorubicine (60 mg/m^2/j) et cytarabine (500 mg/m^2/j) suivie systématiquement d'une seconde cure à J8 comprenant daunorubicine (35 mg/m^2/j) de J8 à J9 et cytarabine (1g/m^2/12h) de J8 à J10.
- Les patients du bras GOELAMS reçoivent une première cure de daunorubicine (60 mg/m^2/j) de J1 à J3 et cytrarabine (200 mg/m^2/j) de J1 à J7, suivie ou non d'une seconde cure selon les résultats du myélogramme à J15. Les patients ayant une blastose médullaire supérieure ou égale à 5% ou présentant au moins un blaste avec corps d'Auer reçoivent une seconde cure à J16 comprenant daunorubicine (35 mg/m^2/j) de J16 à J17 et cytarabine (1g/m^2/12h) de J16 à J18.

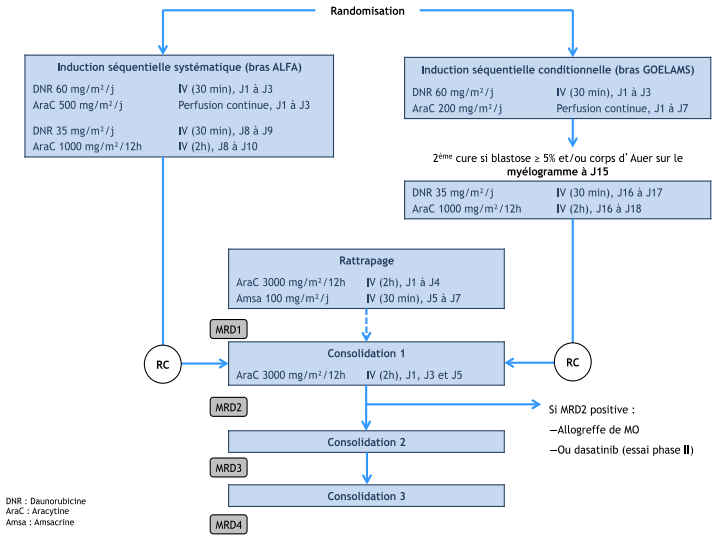


Figure 19 : schéma du protocole CBF-2006

Le myélogramme post induction était réalisé en sortie d'aplasie ou au plus tard à J35 dans le bras ALFA et J42 dans le bras GOELAMS. L'absence de RC en fin d'induction justifie la réalisation d'un traitement de rattrapage par cytarabine haute dose (3g/m^2/12h) de J1 à J4

et amsacrine (100 mg/m^2/j) de J5 à J7. Les patients atteignant une RC en fin d'induction ou après le traitement de rattrapage reçoivent ensuite trois cures mensuelles de consolidation à base de cytarabine à haute dose (3g/m^2/j) à J1, J3 et J5.

Le seuil de MRD décisionnel (en RQ-PCR sur les transcrits *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFβ-MYH11*) est défini sur la moelle osseuse comparativement à la valeur obtenue au diagnostic. Une réduction supérieure ou égale à 3 logs définit la rémission complète moléculaire (RCm). Les patients en absence de RCm avant la deuxième cure de consolidation (MRD2) sont orientés soit vers l'allogreffe de CSH (si donneur HLA identique ou non apparenté compatible 10/10) soit vers l'essai Dana-CBF (étude de phase II) testant le dasatinib en traitement d'entretien à 140 mg/j pendant 12 mois.

3. Tétraspanines et onco-hématologie

a. Pathologie lymphoïde

L'une des premières études s'intéressant à l'expression des tétraspanines dans les syndromes lymphoprolifératifs date de 2005 et considérait un total de 67 patients atteints de diverses pathologies lymphoïdes (leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) B, leucémie lymphoïde chronique (LLC), leucémie prolymphocytaire (LPL) B, leucémie à tricholeucocytes (HCL), lymphome du manteau (MCL), lymphomes de la zone marginale (MZL), lymphome folliculaire (FL), lymphome de Burkitt (BL), lymphome diffus à grandes cellules (DLBCL), myélome multiple (MM) et gammapathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS)) (149). L'expression des tétraspanines était comparée à des échantillons (sang, moelle osseuse) provenant de 17 patients sains. Cette expression était hautement variable au cours de la maturation lymphocytaire avec notamment une expression forte du CD81 aux stades immatures et une augmentation de l'intensité d'expression du CD37 et du CD53 aux stades matures (figure 20).

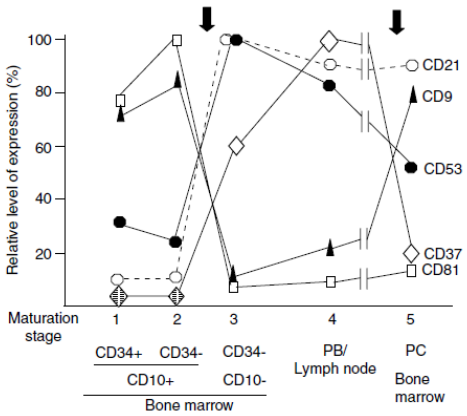


Figure 20 : Expression des tétraspanines au cours de la maturation lymhocytaire B normale (149)

Trois combinaisons d'expression des tétraspanines étaient ainsi identifiées : CD9/CD81 pour les précurseurs B, CD37/CD53 pour les lymphocytes B matures et CD9/CD53 pour les plasmocytes.

Parallèlement au processus physiologique, les syndromes lymphoprolifératifs matures tendent à exprimer plus fortement les CD37 et CD53 alors que le CD9 est retrouvé couplé au CD81 dans les LAL B et couplé au CD53 dans les MM. Le CD81, quant à lui, était constamment sous-exprimé dans les lymphocytes LLC mais surexprimé dans les LAL B (figure 21). D'autres études ont depuis montré une expression du CD81 dans les lymphomes B matures, comme les DLBCL (150).

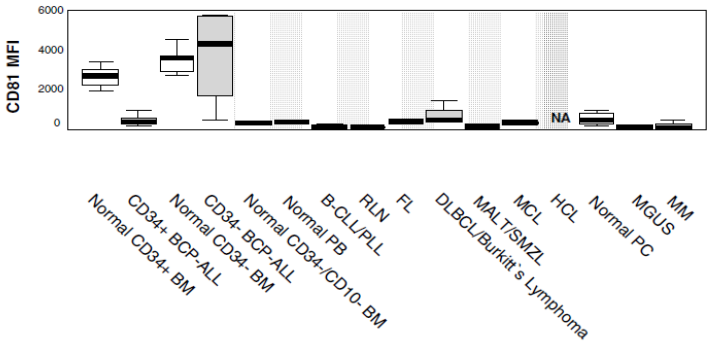


Figure 21 : Expression du CD81 au cours de la maturation lymphocytaire normale et dans différentes hémopathies lymphoïdes (149) (BCP-ALL : LAL B, BM : moelle osseuse, PB : sang périphérique, B-CLL/PLL : LLC/LPL, RLN : ganglion réactionnel)

La sous-expression constante du CD81 dans les LLC a contribué à l'étude de la maladie résiduelle par CMF dans cette pathologie (151) tandis que le développement d'anticorps monoclonaux anti-CD37 tels que l'otlertuzumab fait l'objet d'essais cliniques (152). L'otlertuzumab a récemment été testé chez des patients présentant des lymphomes non hodgkiniens (FL, DLBCL et macroglobulinémie de Waldenström (WM)) réfractaires ou en rechute, avec l'obtention d'une réduction de la masse ganglionnaire supérieure à 50% pour 3 patients sur 12 (153). Le rôle oncogénique du CD37 a été également établi dans les hémopathies lymphoïdes où son inhibition *in vitro* et *in vivo* protège contre la lymphomagénèse via la signalisation par l'IL-6 (154).

Le CD9, dont l'expression est maximale aux stades immatures (LAL) et matures (plasmocytes) de la lymphopoïèse, a été décrit comme un marqueur de CIL dans les LAL B (155). Il serait prédictif de la présence du transcrit de fusion *ETV6-RUNX1* (156) en fonction de son intensité d'expression. Une étude récente rapporte un lien entre la sous régulation du CD9 et la prolifération des blastes lymphoïdes B via une modulation de CXCR4 (157). Concernant les hémopathies B matures, le CD9 est impliqué dans la progression tumorale via une modulation de l'activité histone déacétylase (HDAC) (158,159). Enfin, l'expression du CD9 dans le FL est associé à un stade d'Ann Arbor peu avancé et à une progression significativement moins importante (PFS : Progression Free Survival) de la pathologie (160).

Des études récentes se sont concentrées sur le rôle physiopathologique du CD81 dans les plasmocytes tumoraux des patients atteints de dyscrasies plasmocytaires. Tohami et al. ont analysé les conséquences d'une surexpression du CD81 et du CD82 sur les lignées cellulaires de MM. Cette surexpression diminue la survie plasmocytaire et réduit les facultés de motilité et d'invasion, suggérant un rôle anti-prolifératif de ces molécules (161). Cette observation a été confirmée par Paiva et al. après immunophénotypage des plasmocytes tumoraux circulants dans le MM (162). Chez les patients souffrant de MGUS ou de myélome indolent (SM : Smoldering Myeloma), la présence de cellules tumorales circulantes est associée à un risque plus élevé de transformation en MM et, chez les patients souffrant de MM, à un pronostic défavorable. Ces plasmocytes tumoraux sont caractérisés par une sous expression des intégrines et d'autres molécules d'adhésion comme le CD81, qui apparaît ainsi comme l'une des molécules nécessaires à la rétention centrale des plasmocytes malins.

Tembhare et al. ont étudié l'expression du CD81, ainsi que des marqueurs plus classiques tels le CD19, CD38, CD138 ou CD56, afin de discriminer les plasmocytes normaux des tumoraux (163). Une expression négative ou diminuée du CD81 était exclusivement retrouvée sur les plasmocytes tumoraux (dans 95% des cas), permettant ainsi de différencier ces deux catégories de plasmocytes.

Cependant, selon les études, le pourcentage de plasmocytes CD81 positifs reste très variable (150).

Paiva et al. se sont intéressés au rôle pronostique du CD81 chez 230 patients atteints de MM (164). De façon intéressante, ce marqueur était un facteur indépendant de mauvais pronostic sur la PFS et l'OS. De plus, chez les patients souffrant de SM, l'expression du CD81 était associée à une progression plus rapide vers le MM. L'une des hypothèses pour expliquer ce résultat est le rôle du CD81 sur la surexpression du CD19, connue pour être un facteur de mauvais pronostic (165).

Très récemment, Paiva et al. se sont intéressés au rôle du CD81 dans la différenciation plasmocytaire et ont mis en évidence trois sous-catégories de plasmocytes selon l'expression combinée des marqueurs CD19 et CD81 (CD19+CD81+ correspondant aux plasmocytes les plus immatures, CD19-CD81+ et CD19-CD81- correspondant aux plasmocytes différenciés) (166). Dans leur série de 225 patients nouvellement diagnostiqués pour un MM, 59% présentent un phénotype différencié (CD19-CD81-), 38% un phénotype intermédiaire (CD19-CD81+) et 3% un phénotype indifférencié (CD19+CD81+). Le degré de différenciation plasmocytaire était un paramètre indépendant de mauvais pronostic pour la PFS et l'OS (figure 22).

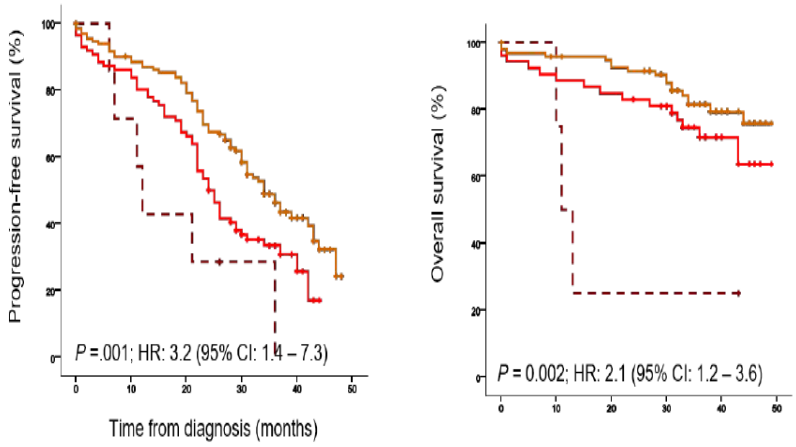


Figure 22 : impact de la différenciation plasmocytaire sur la PFS (à gauche) et l'OS (à droite) de 225 patients atteints de MM (166) (courbe marron en pointillés : CD19+CD81+, courbe rouge : CD19-CD81+, courbe ocre : CD19-CD81-).

b. Pathologie myéloïde

Très peu d'études se sont intéressées au rôle des tétraspanines dans les hémopathies myéloïdes puisque seuls deux membres de cette superfamille ont fait l'objet de publications : CD82 et la Tetraspanine 3.

Une étude de 1999 retrouvait pourtant une surexpression du CD82 au cours de la transformation blastique des leucémies myéloïdes chroniques mais aussi sur les blastes de LAM (167). Fort de ce constat, Termini et al. ont constaté une stabilisation de l'activation de PKCα (protéine kinase C alpha) à la membrane par le CD82 ainsi qu'une régulation de la taille des clusters de cette kinase au niveau membranaire (figure 23) (168). Cette organisation aboutit à un phénotype de LAM plus agressif.

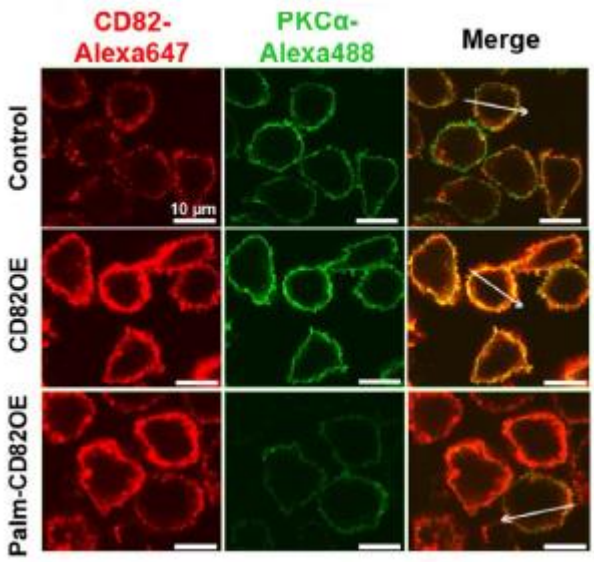


Figure 23 : co-localisation du CD82 et de PKCα au niveau membranaire (immunofluorescence) (168)

En plus de PKCα, le CD82 a été décrit comme étant impliqué dans la voie de signalisation intracellulaire AKT/STAT5 dans les blastes CD34+CD38- de LAM (169) ou encore dans la voie des MAPK (170). Enfin, une dernière étude s'est intéressée à l'interaction des blastes de

LAM avec le microenvironnement médullaire en mettant en évidence un rôle du CD82 dans l'organisation et la densité membranaire de la N-cadhérine (171).

Concernant la Tetraspanine 3, une étude de 2015 montrait le rôle prépondérant de cette molécule dans la LAM où son inhibition était associée à un défaut d'auto-renouvellement et de croissance des blastes *in vitro*, une augmentation de la survie des souris xénogreffées, et une localisation aberrante des blastes au sein de la niche hématopoïétique (172). La tétraspanine 3 apparaît ainsi importante pour la survie et la rétention médullaire des blastes de LAM.

OBJECTIFS

L'hétérogénéité clonale au diagnostic des LAM demeure un défi biologique et thérapeutique. L'identification de nouveaux marqueurs de CIL est nécessaire afin de mieux cibler ces cellules et ainsi limiter la chimiorésistance. Si les marqueurs CD34 et CD38 font désormais consensus, les autres marqueurs découverts depuis (CD96, TIM-3, CLL-1…) n'ont pas réussi à faciliter l'identification des CIL, ni à préciser le pronostic des LAM. L'identification de nouveaux marqueurs pronostiques dans les LAM reste un enjeu important, particulièrement dans les LAM-CN.

Nous nous sommes plus particulièrement intéressés dans cette étude au CD81. Cette tetraspanine a été étudiée dans la pathologie lymphoïde et plus particulièrement dans le myélome multiple, où son expression sur les plasmocytes est associée à une survie globale inférieure et une progression de la maladie plus importante (164). Des études récentes ont de plus montré le rôle prépondérant des tetraspanines lors de différents stades de la cancérogénèse (métastases, angiogénèse…) (173). Récemment, le CD81 s'est vu attribuer par Vences-Catalàn et al. un rôle déterminant dans la génèse des métastases et l'immunomodulation dans le cancer (174). Cette molécule semble également jouer un rôle au niveau hématopoïétique puisqu'elle permettrait aux CSH de réentrer en quiescence (84).

Fort de ces constatations, nous avons étudié le rôle du CD81 dans une cohorte de patients au diagnostic de LAM, sur les blastes totaux et la sous population blastique CD34+ CD38-. Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact du CD81 sur la prolifération et sur le profil d'expression génique des blastes exprimant ce marqueur.

MATERIELS ET METHODES

1. Patients

Cent trente quatre patients atteints de LAM et traités par chimiothérapie intensive selon les protocoles décrits précédemment (Introduction, paragraphe 2g) ont été inclus dans cette étude. Tous les patients ont été traités dans le service des Maladies du Sang de l'hôpital Claude Huriez du CHRU de Lille. Un consentement éclairé a été signé par chaque patient, en accord avec la déclaration d'Helsinki.

Le risque cytogénétique a été déterminé selon les critères définis par la littérature (175). Les critères de rémission hématologique complètes sont définis selon les recommandations de l'European Leukemia Net (39): blastose médullaire < 5%, absence de corps d'Auer dans les blastes, absence de localisation extra-médullaire de la LAM, nombre de polynucléaires neutrophiles > 1 G/L, taux de plaquettes > 100 G/L et indépendance transfusionnelle (concentrés de globules rouges).

La détermination des taux de MRD a été effectuée par RQ-PCR (voir paragraphe 3). La MRD correspond à la quantité de cellules leucémiques persistantes après chimiothérapie et non détectables par les méthodes conventionnelles, comme la cytologie. Les cibles de MRD de cette étude ont été les transcrits de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, les mutations de *NPM1* et l'expression de *WT1* sur les échantillons de suivi de moelle osseuse.

2. Cytométrie en flux multiparamétrique

a. Principe

La CMF est définie comme l'étude de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Cette technique de caractérisation qualitative et quantitative consiste à analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule interférant avec le faisceau lumineux d'un laser.

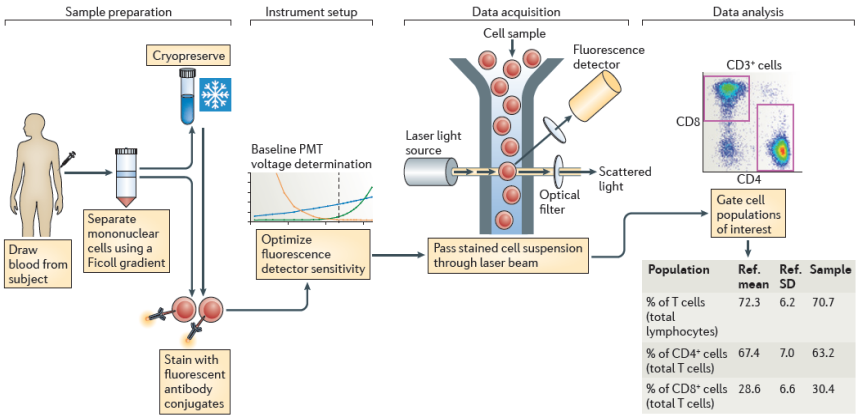


Figure 24 : les différentes étapes de l'immunophénotypage (176)

Les cellules sont marquées avec des anticorps couplés à des fluorochromes avant d'être traitées par l'automate. Lors de l'analyse de l'échantillon par le cytomètre, les cellules vont d'abord être entraînées dans la chambre de focalisation par un liquide de gaine. Ce liquide permet à la fois une séparation et un alignement des cellules : une seule cellule peut ainsi passer devant le laser. Chaque passage va provoquer une coupure du faisceau lumineux, ce qui correspond à un signal (177).

Les valeurs des signaux mesurés sont liées :

- Aux propriétés optiques intrinsèques des particules (diffusion lumineuse selon les dimensions de la particule et de sa structure interne) (178)
- Aux propriétés optiques des fluorochromes induisant une fluorescence, reflet des marquages spécifiques

Ces signaux sont ensuite séparés par des filtres optiques puis collectés par des photomultiplicateurs (PMT), amplifiés, numérisés, traités et stockés par un ordinateur. Ce procédé d'analyse individuelle (cellule par cellule) est multiparamétrique et peut s'effectuer à la vitesse de plusieurs milliers d'évènements par seconde.

Ainsi, pour chaque cellule passée en chambre d'analyse, les informations suivantes sont obtenues : taille, granulométrie et intensité de fluorescence de chaque fluorochrome testé (reflet de l'expression du marqueur).

La CMF résulte donc de la combinaison de plusieurs techniques : fluidique (hydrofocalisation), optique (utilisation de lasers, de lentilles de focalisation, de filtres

optiques), électronique (signaux lumineux transformés en énergie électrique) et informatique (représentation des données sous forme d'histogrammes ou de cytogrammes).

Le cytomètre utilisé pour les manipulations de la thèse est un Navios de chez Beckman Coulter utilisé en configuration 10 couleurs, trois lasers :

- Un laser Argon émettant à 488 nm
- Un laser He-Ne émettant à 633 nm
- Un laser violet émettant à 405 nm

La présence de plusieurs lasers permet de multiplier le nombre de fluorochromes aux caractéristiques différentes.

b. Anticorps et fluorochromes

Trois groupes de fluorochromes associés aux anticorps existent :

- Les fluorochromes organiques (FITC, PB, V450, AA 700, KO)
- Les fluorochromes protéiques (PE, APC)
- Les fluorochromes « conjugués » : un fluorochrome organique couplé à un fluorochrome protéique (PC5.5, PC7).

Chaque fluorochrome possède sa propre longueur d'onde d'absorption et d'émission (tableau 6).

fluorochrome	laser d'excitation	pic d'absorption (nm)	pic d'émission (nm)
Isothiocyanate de fluorescéine (FITC)	laser bleu (488 nm)	495	520
Phycoérythrine (PE)	laser bleu (488 nm)	564	575
Phycoérythrine-cyanine -5.5 (PC5.5)	laser bleu (488 nm)	490	694
Krome Orange (KO)	laser violet (405nm)	398	528
Pacific blue (PB)	laser violet (405nm)	401	452
Allophycocyanine (APC)	laser rouge (633 nm)	650	660
Phycoérythrine-cyanine -7 (PC7)	laser bleu (488 nm)	650	767
BD Horizon V450	laser violet (405nm)	404	448
Allophycocyanine – alexa fluor 700 (AA 700)	laser rouge (633 nm)	638	720

Tableau 6 : spectre d'absorption et d'émission des différents fluorochromes utilisés

Un des critères de choix les plus important pour un fluorochrome est son rendement quantique, défini par le nombre de photons de fluorescence sur le nombre de photons absorbés. Les fluorochromes ont des rendements quantiques compris entre 0.1 et 1 : ainsi, plus la valeur est élevée, plus la brillance est importante.

La brillance est exprimée en unités arbitraires :

- pour FITC qui a un rendement quantique égal à 0.9, la brillance est égale à 72 000 unités arbitraires.
- pour PE qui a un rendement quantique de 0.98, la brillance est égale à 2 360 000 unités arbitraires

L'un des problèmes principaux posé en CMF est celui du recouvrement spectral, qui résulte de la détection du signal d'un fluorochrome par deux détecteurs ou plus. Il est induit par le fait qu'il existe un chevauchement des longueurs d'onde d'émission entre différents fluorochromes, et pour certains, par le fait qu'un même fluorochrome puisse être excité par

plusieurs lasers (figure 25). Il est donc préférable de choisir un fluorochrome ayant le spectre d'émission le plus fin possible.

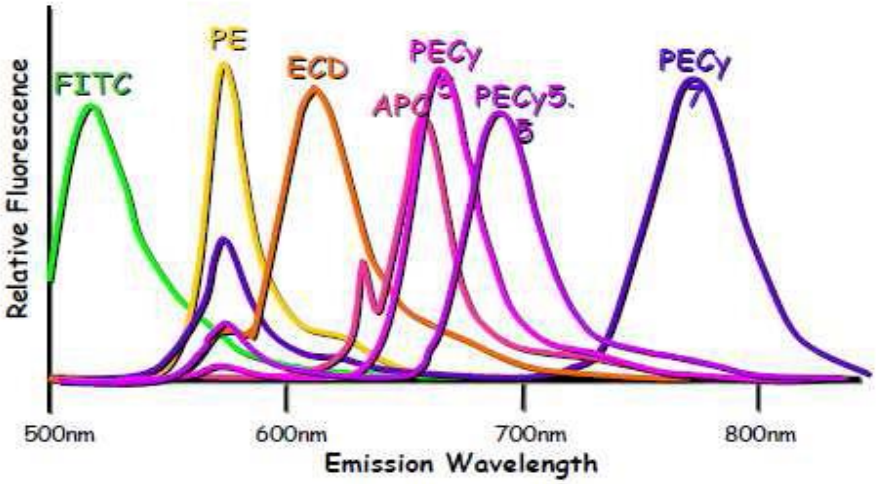


Figure 25 : chevauchement des spectres de fluorescence des différents anticorps

Les fluorochromes en tandem doivent être utilisés avec précaution : leur découplage peut entraîner une fuite de fluorescence dans le canal du fluorochrome excitateur.

Les compensations permettent de pallier à ces insuffisances. Du fait des spectres d'émissions des fluorochromes utilisés qui se chevauchent, il y a risque de fluorescences artefactuelles. L'emploi de compensations électroniques ou mathématiques de fluorescence permettant de soustraire la superposition des deux signaux est indispensable.

Par exemple, les fluorochromes FITC et PE, émettant en FL1 et en FL2, présentent un chevauchement de leurs spectres d'émission respectifs (figure 26)

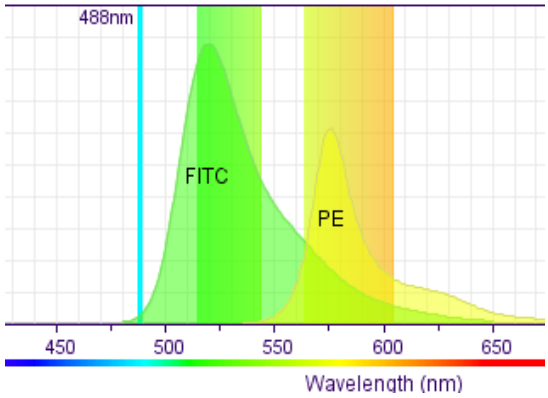


Figure 26 : spectres d'émission de FITC-PE

Le chevauchement des spectres a pour conséquence une surestimation de la fluorescence dans chaque canal. Sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais pas en fluorescence jaune (PE) peut tout de même apparaître positive dans le canal FL2. Sur un histogramme biparamétrique, la population sera positionnée sur la bissectrice des deux fluorescences (figure 27)

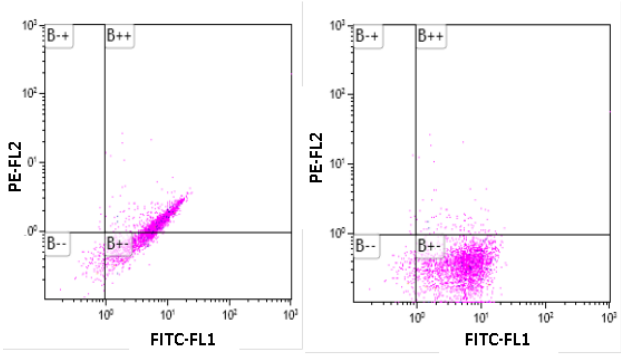


Figure 27 : 1. fluorescence de cellules marquées en FITC sans compensation. 2. fluorescence de cellules marquées en FITC avec compensation

Le système de compensation résulte d'un calcul mathématique (méthode des médianes ou méthode des pentes) et permet de soustraire artificiellement la fluorescence du FITC dans le canal du PE. Chaque pourcentage de compensation sera ainsi déterminé par l'analyse des cellules simplement marquées par les divers fluorochromes utilisés, permettant ainsi d'établir une matrice de compensation.

Cependant, après compensation, le phénomène de distorsion du signal, défini par son étalement, peut survenir. La distorsion est estimée en mesurant la déviation standard de la fuite avant la compensation puis en comparant cette dernière avec la déviation standard de la population négative, et enfin, en prenant en compte la médiane de fluorescence de la population négative. La distorsion est dépendante du cytomètre et des fluorochromes utilisés. Les différents fluorochromes ont été testés afin d'établir la distorsion de leur signal dans chaque canal et ainsi obtenir une matrice (figure 28)

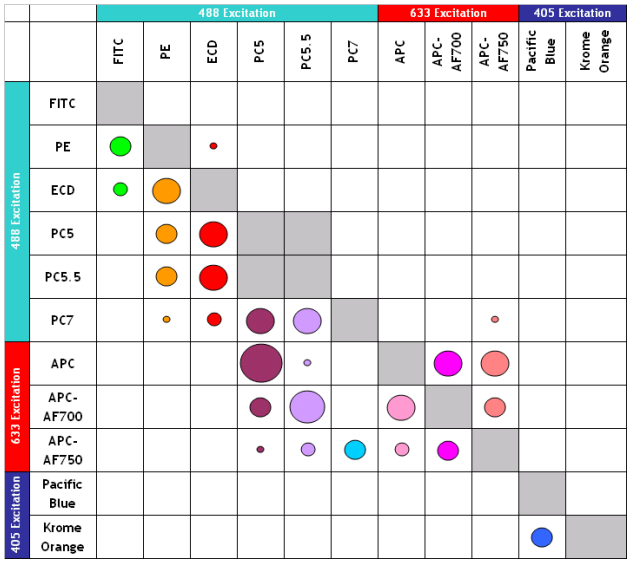


Figure 28 : distorsion du signal de fluorescence dans les différents canaux (Beckman Coulter)

c. Immunophénotypage des LAM au diagnostic

Les blastes au diagnostic de LAM sont récupérés à partir d'un prélèvement de moelle osseuse frais ou congelé (les résultats entre échantillons frais et congelés n'ont pas été significativement différents sur cinq prélèvements testés). Chaque échantillon frais est lavé deux fois avec du RPMI additionné de 10% de SVF à 37°C afin d'éliminer les immunoglobulines plasmatiques. Les blastes issus de prélèvements médullaires congelés de LAM à -20°C sont décongelés après 2 lavages successifs dans du RPMI+SVF 10% préalablement chauffé à 37°C. Après un lavage des cellules avec du PBS additionné de 1% de SAB et un ajustement de la suspension cellulaire à 5.10^5 cellules par tube, le marquage est effectué à l'obscurité et à température ambiante pendant 30 minutes. Deux panels d'anticorps monoclonaux ont été utilisés :

- Le premier panel est composé d'un anti-CD36 FITC (clone FA6-152, Iotest, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), d'un anti-CD81 PE (clone JS24, Beckman Coulter) ou d'un contôle isotypique (clone 7T4-IF5, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD33 PC5.5 (clone D3HL60.251, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD123 PC7 (clone SSDCLY107D2, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD90 APC (clone 5E10, Biolegend), d'un anti-CD34 AA700 (clone 581, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD38 PB (clone LS198-4-3, Iotest, Beckman Coulter) et d'un anti-CD45 KO (clone J.33, Iotest, Beckman-Coulter).

- Le deuxième panel utilisé est constitué d'un anti-CD7 FITC (clone 8H8.1, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD13 PE (clone SJ1D1, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD19 ECD (clone J3-119, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD33 PC5.5 (clone D3HL60.251, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD117 APC (clone 104D2D1, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-CD34 AA700 (clone 581, Iotest, Beckman Coulter), d'un anti-HLA-DR PB (clone Immu-357, Iotest, Beckman Coulter) et d'un anti-CD45 KO (clone J.33, Iotest, Beckman-Coulter). Ce panel a pour unique fonction la confirmation de la nature myéloïde de la prolifération blastique.

Fluorochrome	**FITC**	**PE**	**PC5.5**	**PC7**	**APC**	**AA700**	**PB**	**KO**
Anticorps	**CD36**	**CD81**	**CD33**	**CD123**	**CD90**	**CD34**	**CD38**	**CD45**

Fluorochrome	**FITC**	**PE**	**ECD**	**PC5.5**	**APC**	**AA700**	**PB**	**KO**
Anticorps	CD7	CD13	CD19	CD33	CD117	CD34	HLA-DR	CD45

Tableau 7 : panels de marquage en CMF utilisés pour chaque échantillon

Après incubation, 2 lyses successives avec 2 mL de tampon de lyse (NH4Cl) sont réalisées, à raison de 10 minutes par lyse et à l'obscurité. La lyse est ensuite stoppée à l'aide de PBS, un lavage est réalisé et le culot cellulaire est repris dans 500 µL de PBS pour être passé au cytomètre.

Un contôle isotypique (clone 7T4-IF5, Iotest, Beckman Coulter) a été utilisé afin de définir précisément le seuil de positivité des cellules CD81 marquées. Les résultats sont rapportés en pourcentage de cellules blastiques positives. La population blastique est définie comme étant la population présentant un CD45 faible combiné à un SS faible. Si plus de 20% de la

population blastique est marquée par le CD81, la LAM est considérée comme étant CD81 positive.

Les immunomarquages ont été passés sur un cytomètre Navios et analysés sur le logiciel Kaluza (Beckman Coulter). Les paramètres du cytomètre étaient vérifiés chaque jour, en terme d'alignement optique, de stabilité fluidique, de sensibilité du détecteur optique et de standardisation grâce à l'utilisation de fluorosphères (Flowset targets™ et Flowcheck™, Beckman Coulter).

d. Etude de la prolifération cellulaire : expression du Ki67

Les blastes issus de prélèvements médullaires congelés de LAM à -20°C sont décongelés après 2 lavages successifs dans du RPMI+SVF 10% préalablement chauffé à 37°C. Un volume équivalent d'une solution d'immunoglobulines humaines diluée au 1/10e (Human Ig, Sigma Aldrich, Milwaukee, WI, USA) est ajouté, suivi d'une incubation de 30 minutes à température ambiante afin de saturer les récepteur Fc présents à la surface des blastes. Après centrifugation, un volume équivalent à celui ajouté est éliminé du surnageant.

Du SVF-D pur est ajouté au culot cellulaire afin d'obtenir une concentration d'environ 10.10^{6} cellules par mL. 2.5 µL de la solution de buffer 1 (fixateur) du kit Perfix-NC™ (Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA) sont alors ajoutés à 50 µL de cette suspension cellulaire pour une incubation de 15 minutes à température ambiante. 150 µL de buffer 2 (perméabilisant) sont ajoutés juste avant le marquage par des anticorps de surface et des anticorps intracellulaires : anti-CD81 PE (clone JS24, Beckman Coulter), anti-CD38 ECD (clone LS198-4-3, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD34 AA700 (clone 581, Iotest, Beckman Coulter) anti-CD45 KO (clone J.33, Iotest, Beckman-Coulter) pour le marquage de surface ; isotype IgG1 kappa eFluor™450 (clone P3.6.2.8.1, eBioscience Inc, San Diego, CA, USA) ou Ki67 eFluor™450 (clone 20Raj1, eBioscience)) pour le marquage intracellulaire. L'incubation a lieu 30 minutes à température ambiante et à l'obscurité. Enfin, 3 mL de buffer 3 dilué au 10ème sont ajoutés, suivi d'une centrifugation 5 minutes à 430 G. Le surnageant est éliminé, les culots sont repris dans 500 µL de buffer 3 dilué au 10ème avant passage au cytomètre.

3. Biologie moléculaire

a. Isolements cellulaires

A partir du tube EDTA (prélèvements médullaire ou sanguin), les leucocytes sont isolés en vue de l'extraction d'ADN ou d'ARN. Les hématies sont ensuite lysées (prélèvement total ou surnageant) préalablement à une série de lavages destinés à purifier les cellules nucléées. Des aliquots de 10 millions de cellules sont ainsi constitués et stockés à -80°C dans du *TRIzol™ Reagent* (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) ou du *Maxwell™16 LEV simply RNA cells* (Promega, Madison, WI, USA) en vue de l'extraction d'ARN.

b. Extraction d'ARN

Deux méthodes d'extraction de l'ARN sont actuellement disponibles : la méthode dite « classique », selon le protocole technique *TRIzol™ Reagent*, manuelle et plus toxique, et la méthode d'extraction automatisée selon le protocole *Maxwell*, plus rapide et moins contraignante. Cette dernière méthode, réalisée sur un appareil semi-automatique, permet d'extraire des acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques. Elle comporte une première phase de lyse des cellules suivie d'une purification de l'ARN dans diverses solutions. L'ARN est enfin élué dans un faible volume DNase RNase free de haute qualité permettant des applications telles que la RQ-PCR.

c. Rétrotranscription (RT)

A partir des ARN totaux extraits, les ADNc sont synthétisés par rétrotranscription à l'aide du kit *High Capacity cDNA Archive Kit™* (Applied Biosystems, Foster City, CA). Les ARN sont incubés en présence d'une reverse transcriptase, d'hexanucléotides, de désoxynucléotides triphosphates et d'une solution tampon et les ADNc obtenus sont stockés à - 20°C jusqu'à utilisation. La quantité et la qualité des ADNc obtenus sont évaluées par amplification du gène de référence *ABL1* par RQ-PCR Taqman™.

d. PCR quantitative en temps réel Taqman™ (RQ-PCR)

La RQ-PCR repose sur la possibilité de suivre au cours du temps le processus de PCR à l'aide de la fluorescence. Les données de fluorescence sont collectées à chaque cycle de PCR et représentent la quantité de produits amplifiés à cet instant. La RQ-PCR Taqman™ utilise l'hydrolyse de la sonde grâce à l'activité exonucléase de la polymérase *Thermus aquaticus* (Taq, figure …). L'ADN est amplifié par PCR en utilisant une paire d'amorces spécifiques ainsi qu'une sonde interne marquée avec un 5'*reporter* et un 3'*quencher*. Le spectre d'émission du *reporter* chevauche le spectre d'excitation du *quencher*, l'émission du *reporter* est donc éteinte à proximité du *quencher*. Lors de la phase d'élongation, la sonde est dégradée par l'activité 5'-3' exonucléase de la Taq polymérase. Ce processus libère le *reporter* et le *quencher*, les séparant ainsi et amenant à une augmentation de la fluorescence du *reporter*, proportionnelle au nombre de copies synthétisées à chaque cycle de PCR.

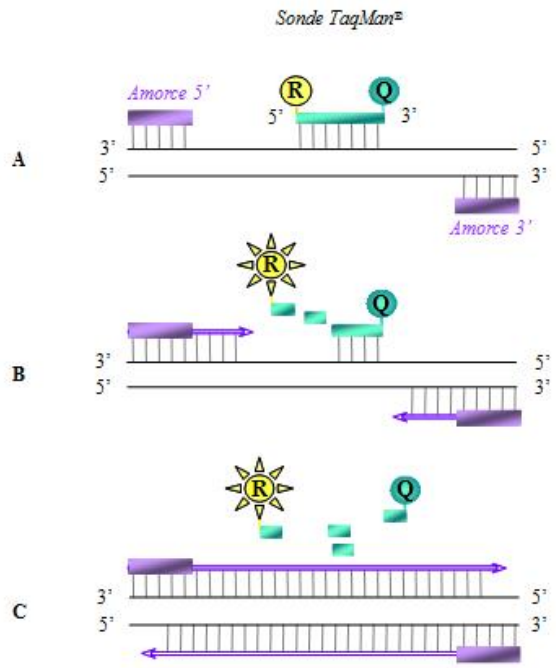


Figure 29 : principe de la RQ-PCR (Taqman™). **A** : Hybridation de la sonde Taqman™ entre les amorces sens et antisens. Une partie de la fluorescence émise par le *reporter* est absorbée par le *quencher*. **B** : élongation par la polymérase et clivage (grâce à l'activité exonucléase) de la sonde Taqman™ : émission de fluorescence par le *reporter* (plus d'inhibition par le *quencher*). **C** : synthèse du nouveau brin complémentaire (179)

La quantification du nombre de molécules contenues dans les échantillons analysés est basée sur la mesure du Ct (*Cycle threshold,* figure 30). Il correspond au nombre de cycles nécessaires pour obtenir un signal de fluorescence d'émission du *reporter* significativement différent du bruit de fond, apparaissant en début de phase exponentielle. La ligne de base, qui reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence, est établie au cours des 15 premiers cycles d'amplification. Plus la séquence cible est représentée dans l'échantillon, moins le Ct sera important. La droite standard va ensuite représenter les valeurs de Ct obtenues en fonction du logarithme des concentrations en molécules cibles fixées, issues de dilutions en série d'un échantillon standard. Le Ct va donc être ramené à un pourcentage de molécules cibles exprimé par rapport à un plasmide de référence. Les résultats sont ainsi normalisés par rapport au gène de référence *ABL* et exprimés en nombre de copies / 100 copies d'*ABL* (%).

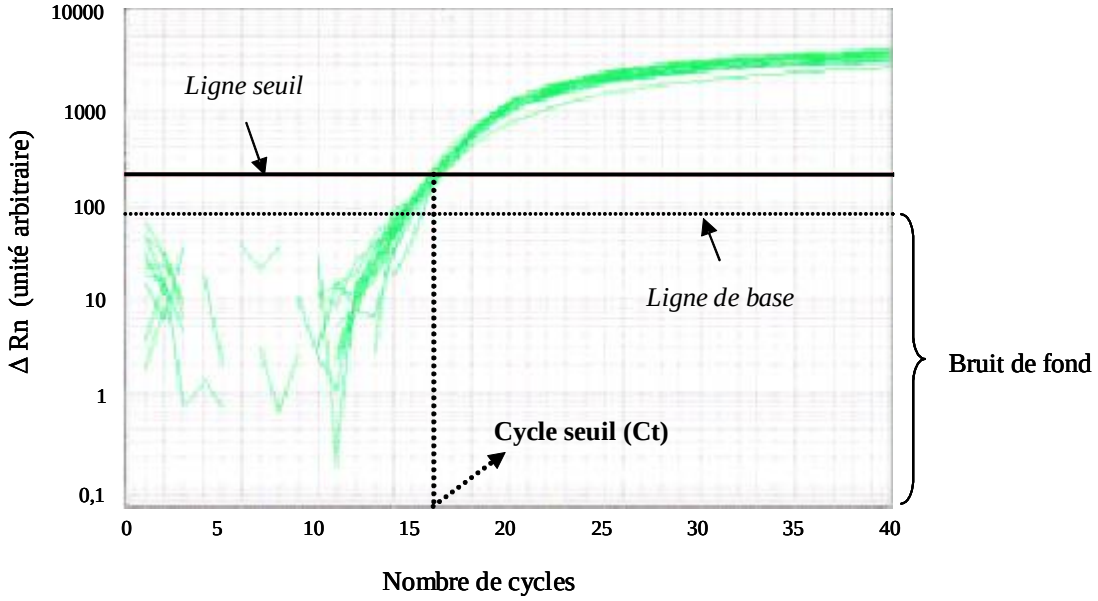


Figure 30 : Courbe d'amplification d'une réaction de RQ-PCR. L'axe des ordonnées représente la quantité du produit amplifié et l'axe des abscisses le nombre de cycles de la PCR. La ligne de base reflète l'intensité du bruit de fond de fluorescence. La ligne seuil correspond à un signal de fluorescence significatif. Le point d'intersection de la courbe cinétique PCR avec la ligne seuil définit le cycle seuil Ct.

e. Profils d'expression génique : utilisation des puces GeneChip™Human Genome U133 Plus 2.0 Array

La puce *GeneChip™ U133 Plus 2.0 Array* de chez Affymetrix est constituée de 1300000 oligonucléotides permettant la détection de 47000 transcrits et variants, certains étant

ciblés par plusieurs « probesets », chaque probeset étant constituée de 11 sondes différentes.

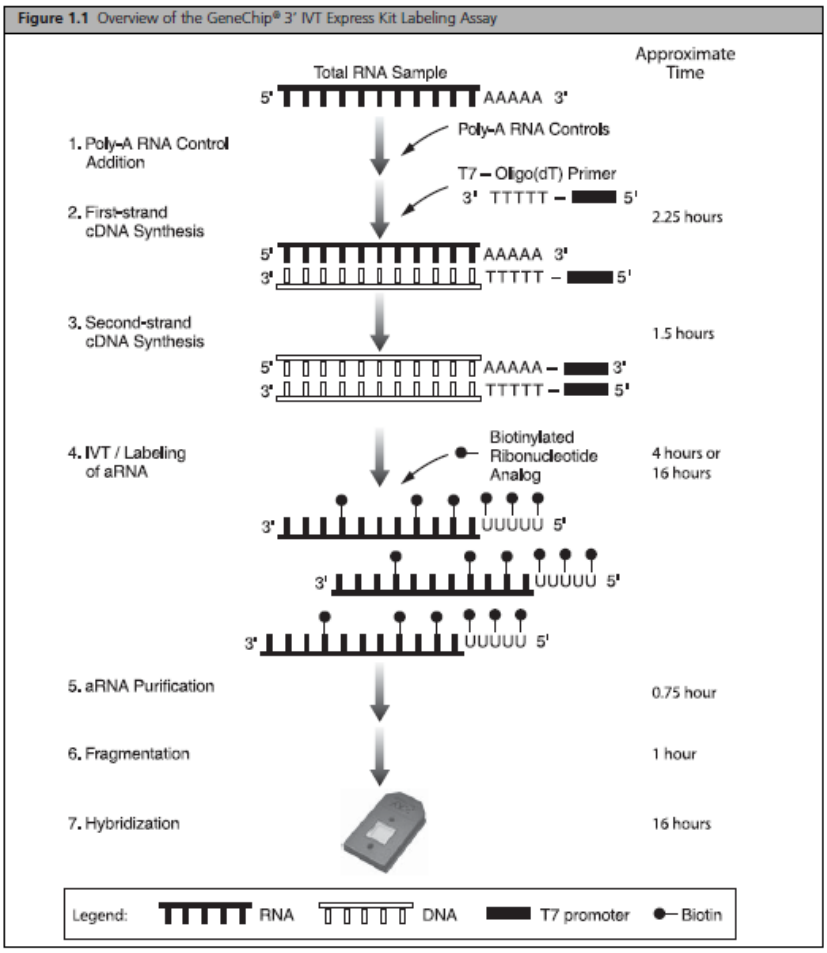


Figure 31 : principe d'utilisation de la puce *GeneChip™ U133 Plus 2.0 Array*

Les techniques d'analyse transcriptionnelle par puce *GeneChip™ U133 Plus 2.0 Array* ont été réalisées par la plateforme de génomique fonctionnelle et structurale de l'Université Lille 2.

Dans un premier temps, l'ARN est extrait de culots cellulaires selon les techniques précédemment décrites (cf Matériels et Méthodes, 3.b). L'intégrité de ces ARN est ensuite évaluée grâce au *2100 Bioanalyzer™* (Agilent) afin d'écarter les ARN de mauvaise qualité.

La rétrotranscription est effectuée selon les recommandations du fabricant. Des étapes de fragmentation, purification et biotinylation des ADNc obtenus sont ensuite réalisées avant l'hybridation sur une puce *GeneChip™ U133 Plus 2.0 Array*. Après 16 heures d'hybridation, une quantité d'expression des gènes est évaluée par un scanner laser. Les hybridations sont révélées par incubation avec la streptavidine couplée à la phycoérythrine. Plusieurs

contrôles qualités sont ensuite générés par le logiciel Expression console, notamment concernant la qualité des ARN hybridés (vérifiée par comparaison des intensités obtenues pour des sondes situées en 5' et 3' d'un même ARN) ou encore le nombre de probesets détectées. Une fois cette étape effectuée, il est possible d'utiliser les valeurs brutes obtenues.

L'intensité observée pour un spot est proportionnelle à la quantité d'ARN messager et donc, au niveau d'expression du gène correspondant. Une analyse biostatistique grâce au logiciel « R » a enfin été réalisée.

4. Analyse statistique

La distribution des variables quantitatives a été vérifiée graphiquement et par un test de Shapiro Wilk ; la comparaison entre moelle normale et moelle de LAM concernant l'expression du CD81 par les blastes a été réalisée par test de Student. Concernant les patients présentant plus ou moins de 20% de CD81 sur la population blastique, les variables quantitatives ont été comparées par test de Student ou de Mann-Whitney ; les variables qualitatives ont, quant à elles, été étudiées grâce au test du Chi-deux ou au test exact de Fisher.

La survie sans événement (EFS) a été calculée à partir de la date du diagnostic jusqu'à l'apparition d'un événement (RC non atteinte, décès en cours d'induction ou en première RC, rechute). La survie sans récidive (RFS) a, quant à elle, été calculée à partir de la date de RC jusqu'à la survenue d'une rechute ou du décès (à la date des dernières nouvelles). La survie globale (OS) est calculée à partir de la date de diagnostic jusqu'à la date des dernières nouvelles ou à la date du décès.

Les variables quantitatives associées aux données de survie (OS, EFS et RFS) ont été testées avec le modèle de Cox pour toutes les sous populations blastiques au diagnostic. Pour les patients ayant reçu une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques, la survie a été censurée à la date de l'allogreffe et, pour les patients vivants, la survie a été censurée à la date des dernières nouvelles. L'association entre CD81 et OS, EFS et RFS a été ajustée sur le risque cytogénétique et l'âge au diagnostic. Les données de survie ont été représentées selon les courbes de Kaplan Meier avec une stratification selon une expression du CD81

inférieure ou supérieure à 20% de la population blastique (classiquement admise comme étant le seuil de positivité en cytométrie en flux (Jaffe 2001 WHO)) et une expression supérieure à 50%, définie comme une surexpression du marqueur.

Tous les tests statistiques ont été réalisés de façon bilatérale et la limite de significativité a été définie à 0.05. Les analyses ont été réalisées sur le logiciel SAS version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

RESULTATS

1. Le CD81 est un marqueur de mauvais pronostic dans les LAM

a. Expression du CD81 sur les blastes physiologiques et les blastes de LAM

En parallèle des 134 patients, nous avons phénotypé avec le même panel 11 moelles issus de patients ne présentant pas d'hémopathies. Le CD81 est exprimé de façon homogène sur les blastes physiologiques (32% en moyenne (de 21 à 42%), n=11, figure 32a). A contrario, l'expression du CD81 sur les blastes de LAM est plus hétérogène (allant de 0.1 à 100%, n=134) et significativement plus importante (47% en moyenne, $p<0.001$, figure 32b).

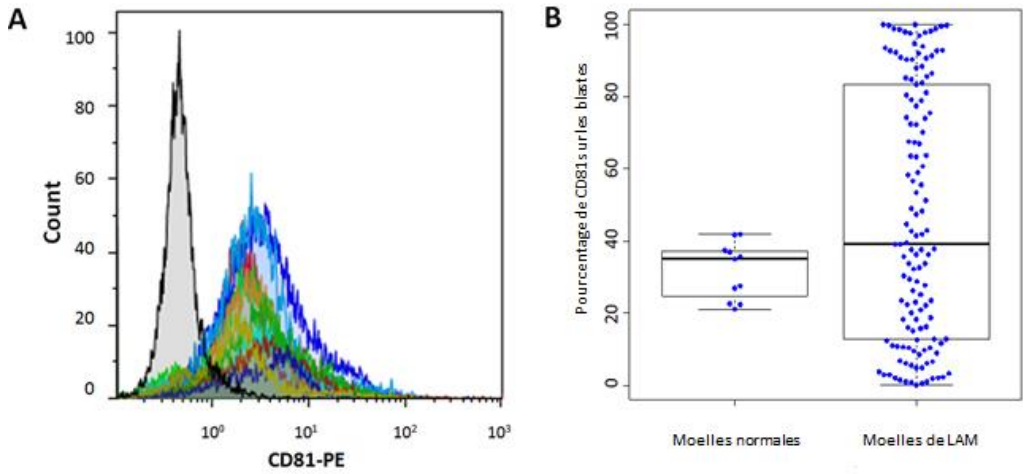


Figure 32 : expression du CD81 sur les blastes. A : Intensités de fluorescence (histogrammes) des 11 échantillons de moelle normale pour le CD81. Le contrôle isotypique est en noir. B : Comparaison de l'expression du CD81 sur les blastes physiologiques (n=11) par rapport aux blastes de LAM (n=134).

De façon intéressante, nous avons observé deux catégories de LAM : celles exprimant intensément le CD81 (43% des LAM, expression sur plus de 50% des blastes, figure 33a) et celles n'exprimant pas ce marqueur (31% des LAM, expression sur moins de 20% des blastes, figure 33b). Seules 25% des LAM exprimaient le CD81 avec une intensité proche de celle des blastes physiologiques (figure 33c).

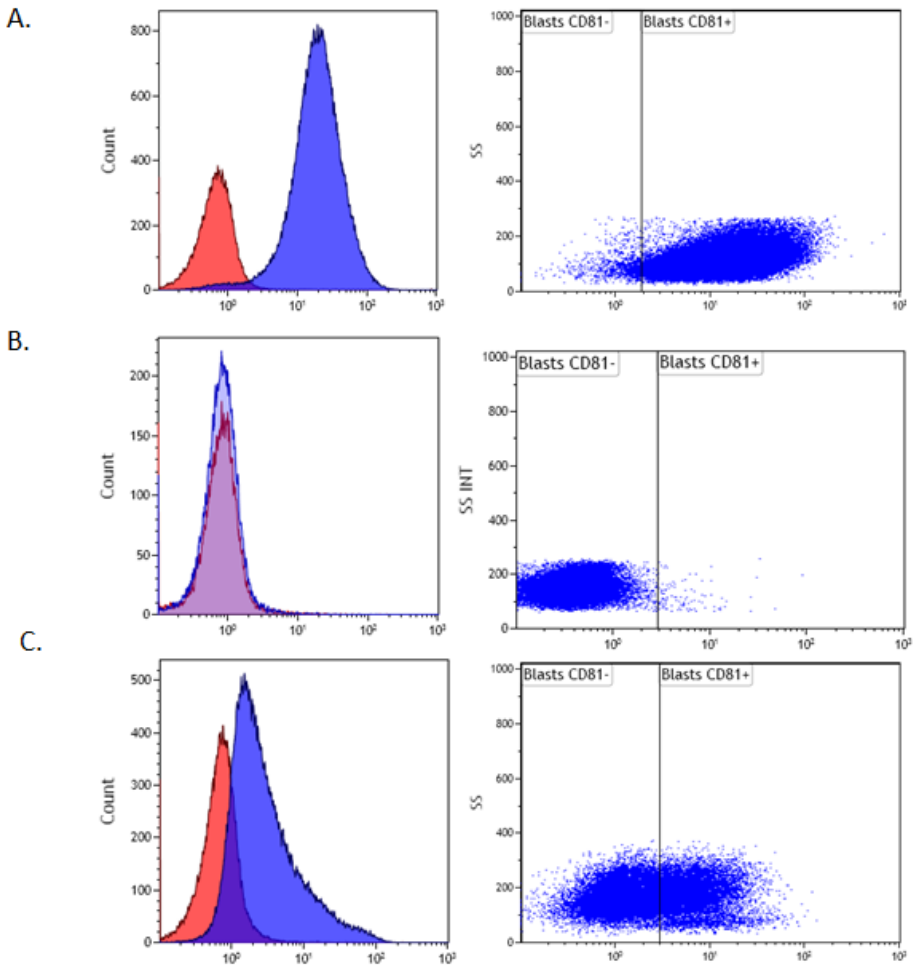


Figure 33 : le pourcentage de blastes CD81 positifs est très variable dans les LAM. A : Exemple d'une expression forte du CD81 sur les blastes (patient n°8). B : Exemple d'une absence d'expression du CD81 (patient n°18). C : Exemple d'une expression intermédiaire du CD81 sur les blastes (patient n°130). Le contrôle isotypique correspond à l'histogramme rouge.

b. CD81 et facteurs pronostiques classiques des LAM

Un total de 134 patients, traités par chimiothérapie intensive, a été inclus dans notre étude (âges allant de 18 à 78 ans). Les caractéristiques des patients CD81 positifs et négatifs sur les blastes sont résumées dans le tableau 8.

Une expression du CD81 a été retrouvée chez les majorité des patients (92 sur 134 soit 69%) mais cette expression n'était pas associée à des éléments de bon pronostic (jeune âge, faible leucocytose et cytogénétique favorable). L'expression du CD81 était associée aux sous-types FAB M1 et M5 (tableau 8). Aucune différence significative entre les patients positifs et négatifs n'a été trouvée concernant le sexe, l'hémoglobine, les plaquettes, le statut mutationnel *FLT3-ITD* ou *NPM1*, même si les patients CD81 positifs avaient tendance à

présenter plus de mutations *FLT3-ITD* (p=0.06). Aucune association entre les blastes CD81 positifs et les marqueurs antigéniques de notre panel n'a été retrouvée, mais plutôt une tendance à l'exclusion avec le CD7 et le CD19 (p=0.07 dans les deux cas). Les patients avec une LAM CD81 positive était plus âgés, étaient davantage hyperleucocytaires au diagnostic (p=0.02) et présentaient plus fréquemment un caryotype intermédiaire (p<0.001).

	Cohorte (n=134)	**Blastes CD81- (n=42)**	**Blastes CD81+ (n=92)**	**P-value**
Sexe [H/F]	79/56	24/18	54/38	0.83
Age [années]$	51.1±16.0	46.9±16.4	53.0±15.5	**0.04**
Leucocytose [G/L]*	28 (1-325)	14 (2-198)	45(1-325)	**0.02**
FAB				**<0.0001**
M0	3% (4/101)	3% (1/35)	4% (3/66)	
M1	22% (22/101)	14% (5/35)	26% (17/66)	
M2	28% (28/101)	49% (17/35)	17% (11/66)	
M4	26% (26/101)	31% (11/35)	23% (15/66)	
M5	19% (19/101)	3% (1/35)	27% (18/66)	
M6	2% (2/101)	0% (0/35)	3% (2/66)	
Hémoglobine [g/dL]$	9.5±2.2	9.5±2.3	9.4±2.1	0.81
Plaquettes [G/L]*	59 (7-864)	70 (12-864)	58 (7-670)	0.96
Risque cytogénétique				**<0.0001**
Favorable	11% (14/131)	28% (12/42)	2% (2/89)	
Intermédiaire	75% (98/131)	55% (23/42)	84% (75/89)	
Défavorable	14% (19/131)	17% (7/42)	14% (12/89)	
FLT3-ITD	28% (36/129)	17% (7/41)	33% (29/88)	0.06
NPM1 mut	34% (43/125)	28% (10/36)	37% (33/89)	0.32

*rang médian entre parenthèses; $moyenne± écart type; H: homme; F: femme

Tableau 8 : Caractéristiques des 134 patients

c. Rôle du CD81 dans le pronostic des LAM

Au moment de l'analyse, nous avons dénombré 40 décès (non censurés) et le suivi médian était de 3 ans et demi. Comme attendu, une cytogénétique défavorable était associée à une OS plus faible (risque relatif (RR)=2.75, intervalle de confiance à 95% (95%IC)=1.48-5.09, p=0.006). Les mutations de *NPM1* étaient associées à un pronostic favorable (RR=0.61, 95%IC=0.31-1.2, p=0.03) alors que les mutations *FLT3-ITD* n'avaient pas d'impact sur la survie globale (p=0.4).

L'expression du CD81 sur les blastes de LAM affectait de façon négative la survie des patients, que ce soit sur l'EFS, l'OS ou la RFS (p<0.0001). L'analyse multivariée validait ce mauvais pronostic du CD81 dans la LAM sur les paramètres de survie (tableau 9).

	RR (95% IC)	***p*-value**
EFS	3.45 (1.5-7.8)	**0.003**
OS	4.14 (1.69-10.14)	**0.002**
RFS	9.46 (2.66-33.71)	**0.0005**

Tableau 9 : Risque relatif du CD81 ajusté sur le risque cytogénétique, l'âge au diagnostic et le statut mutationnel *NPM1+/FLT3-ITD-*

L'expression du CD81 sur les blastes physiologiques n'excédait pas 40% (figure 31b). De plus, l'expression moyenne de ce marqueur sur les blastes de LAM montrait une distribution bimodale avec une moyenne de 47% (figure 34).

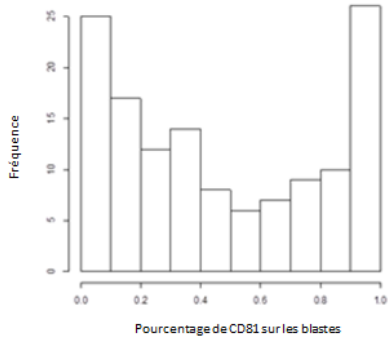


Figure 34 : Distribution bimodale de l'expression du CD81 sur les blastes de LAM (n=134)

De plus, l'algorithme de maximisation du hazard ratio pour les variables de survie (EFS, OS et RFS) montrait des valeurs hautes pour les seuils de 20% et 50% des blastes. Ainsi, nous avons déterminé trois groupes de patients selon l'expression du CD81 sur les blastes : CD81- (moins de 20% des blastes, n=42), CD81+ (entre 20 et 50% des blastes, n=34) et CD81++ (plus de 50% des blastes, n=59). Un pronostic significativement plus péjoratif (EFS, OS et RFS) était associé à une expression plus forte du CD81 (p<0.001) comparativement aux CD81- (figure 35). De façon intéressante, parmi les patients *NPM1* mutés, l'expression du CD81 (au-delà de 20% des blastes) était associée à une OS plus faible (p=0.01, figure 36a) mais n'avait pas d'impact sur l'EFS (p=0.24) et la RFS (p=0.22). Concernant la classification ELN des LAM, les analyses en sous groupe ont montré un impact significatif de l'expression du CD81 pour l'OS chez les patients du groupe favorable (p=0.002, figure 36b) mais pas dans les autres catégories.

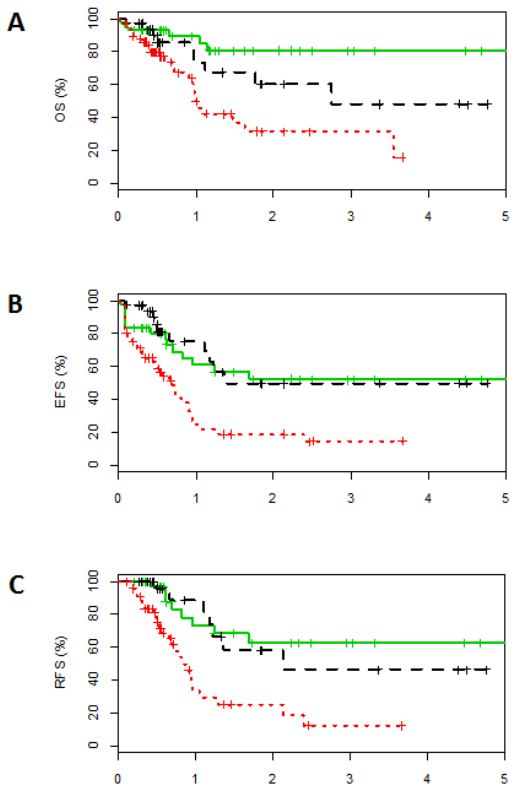


Figure 35 : l'expression du CD81 sur les blastes de LAM est associé à un pronostic péjoratif. Courbes de survie de l'OS (A), l'EFS (B) et la RFS (C). La courbe verte représente les patients CD81- (moins de 20% de CD81), la courbe noire les patients CD81+ (20 à 50%) et la courbe rouge les patients CD81++ (plus de 50%).

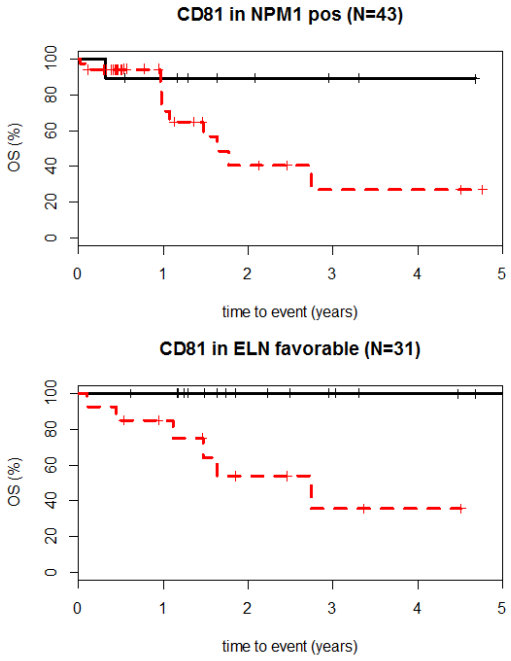


Figure 36 : effet du CD81 sur la survie des patients de pronostic favorable. Les courbes en noir représentant la survie globale des patients CD81- (moins de 20%) et les rouges celles des patients CD81+ (plus de 20%) pour A. les patients *NPM1* mutés B. les patients du groupe de risque favorable selon l'ELN (39).

Les données de MRD étaient disponibles pour 92 patients. Deux points de suivi ont été étudiés : MRD1 en post induction et MRD2 en post consolidation. Il y avait une tendance à une association entre l'expression du CD81 sur les blastes et une MRD2 positive (p=0.09, n=73) mais pas d'impact sur la MRD1 (p=0.38, n=89).

2. Rôle du CD81 sur la prolifération cellulaire dans les LAM

Afin d'étudier le rôle du CD81 sur l'expression du Ki67 (représentant la prolifération cellulaire) en CMF, nous avons constitué deux groupes d'échantillons de LAM au diagnostic : celles exprimant fortement le CD81 (n=5) et celles n'exprimant pas le CD81 (n=5).

Les échantillons de LAM provenaient tous de prélèvements médullaires issus de patients inclus dans l'étude clinico-biologique sur l'impact du CD81 au diagnostic (cf 1. de la partie Résultats).

En parallèle du marquage de ces échantillons, nous avons utilisé le même panel décrit précédemment (Matériels et Méthodes, partie 2.d) sur la lignée cellulaire Jurkat (LAL-T, caryotype : 46,XY,-2, -18,del(2) (p21p23),del(18) (p11.2)) afin de vérifier la faisabilité du marquage.

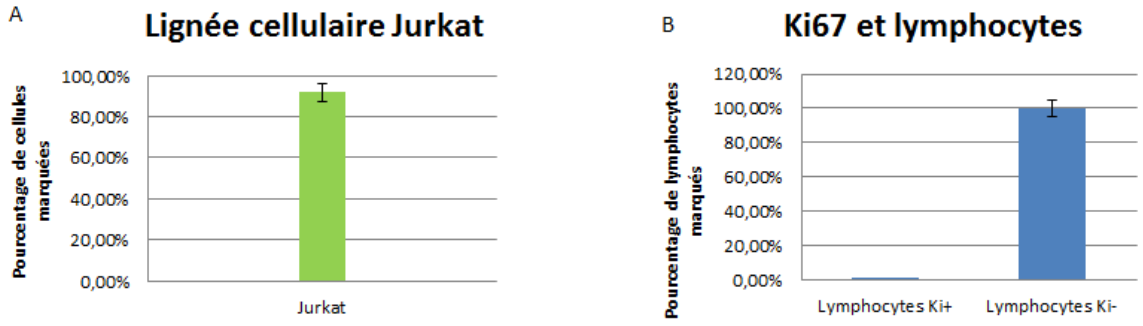


Figure 37 : marquage des populations témoins. A : marquage de la lignée cellulaire Jurkat, B : marquage des lymphocytes

Chaque marquage a été réalisé trois fois, sur trois échantillons de lignée différents. La lignée cellulaire Jurkat présentait un marquage par le Ki67 en moyenne à 92% des cellules. D'autres part, comme témoin négatif, nous avons pu vérifier l'absence de positivité des lymphocytes (cellules en G0 du cycle cellulaire et n'exprimant donc pas le Ki67) présents dans les échantillons de la série (figure 37b). Les lymphocytes Ki67 positifs représentent moins de 0.05% des lymphocytes totaux.

La combinaison d'anticorps utilisée, ainsi que le marquage du Ki67, a donc été validée.

Les résultats que nous avons obtenus pour les 10 échantillons de patients sont résumés par la figure 38. Au sein de la population blastique, l'expression du Ki67 sur les blastes CD81 négatifs et CD81 positifs n'est pas significativement différente (p=0.93).

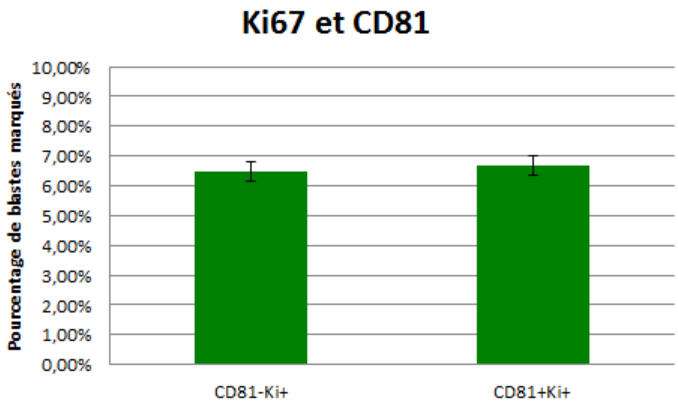


Figure 38 : expression du Ki67 sur les blastes de LAM selon le statut CD81 (à gauche : blastes négatifs pour le CD81 (<10%, n=5), à droite : blastes positifs pour le CD81 (>90%, n=5))

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'expression du Ki67 dans la sous-population blastique CD34+ CD38-, censée être enrichie en CIL. L'absence d'expression du Ki67 sur cette sous-population était significativement plus importante que son expression (figure 39, p<0.0001).

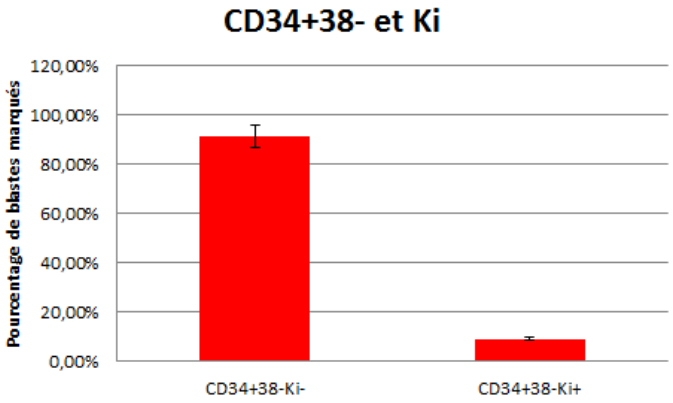


Figure 39 : expression du Ki67 au sein de la sous-population blastique CD34+ CD38- au diagnostic de LAM (n=20)

Dans l'hypothèse où le CD81 est un marqueur de CIL, et au vu de son rôle sur les CSH, nous avons enfin étudié l'expression du Ki67 au sein des sous fractions CD34+ CD38- CD81- et CD34+ CD38- CD81+ afin de voir si le CD81 contribue à la quiescence de cette sous population. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 40 ci-dessous.

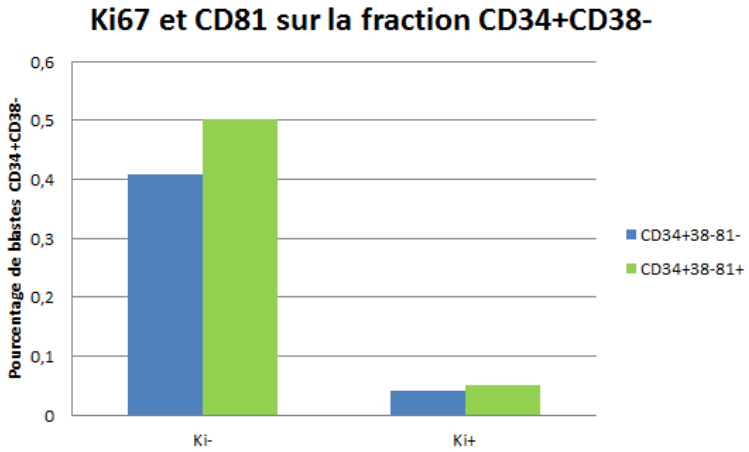


Figure 40 : expression du Ki67 dans les sous-populations blastiques CD34+ CD38- CD81- ou CD81+. Les pourcentages sont exprimés par rapport au nombre de blastes CD34+CD38-.

Quelque soit la sous population considérée (CD81 négatif ou positif), la majeure partie de la population n'exprime pas le Ki67 (40.7% de la population CD34+ CD38- CD81- et 50.2% de la population CD34+ CD38- CD81+). Cette différence d'expression entre ces deux sous-populations blastiques n'est pas significative (p=0.59). Si l'on considère la partie de ces sous populations exprimant le Ki67, nous n'observons pas de différence significative entre la fraction blastique CD34+ CD38- CD81- et CD34+ CD38- CD81+ (4.1% vs 5%, p=0.76). La présence du CD81 sur les blastes CD34+ CD38- n'influe donc pas sur l'expression du Ki67 au sein de cette sous fraction blastique.

3. Analyse du profil transcriptomique selon l'expression du CD81

La signature transcriptionnelle par GEP (*Gene expression profiling*) de 13 patients atteints de LAM a été étudiée afin d'évaluer si l'expression du CD81 (n=8 patients) est associée à une signature transcriptomique particulière.

L'analyse différentielle a permis l'identification d'une signature associée à l'expression du CD81 comprenant 52 sondes couvrant 42 gènes (figure 41). Les gènes codant pour des canaux ioniques comme *FXYD5* ou *TMC8* sont sous-exprimés dans le groupe CD81 positif et surexprimés dans le groupe CD81 négatif.

Nous avons ensuite recherché les principales voies de signalisation dérégulées grâce au logiciel d'analyse Ingenuity™. L'expression du CD81 sur les blastes de LAM est associée à des réseaux fonctionnels comme la réponse inflammatoire, le développement et la croissance cellulaire ou encore la signalisation cellulaire (figure 42).

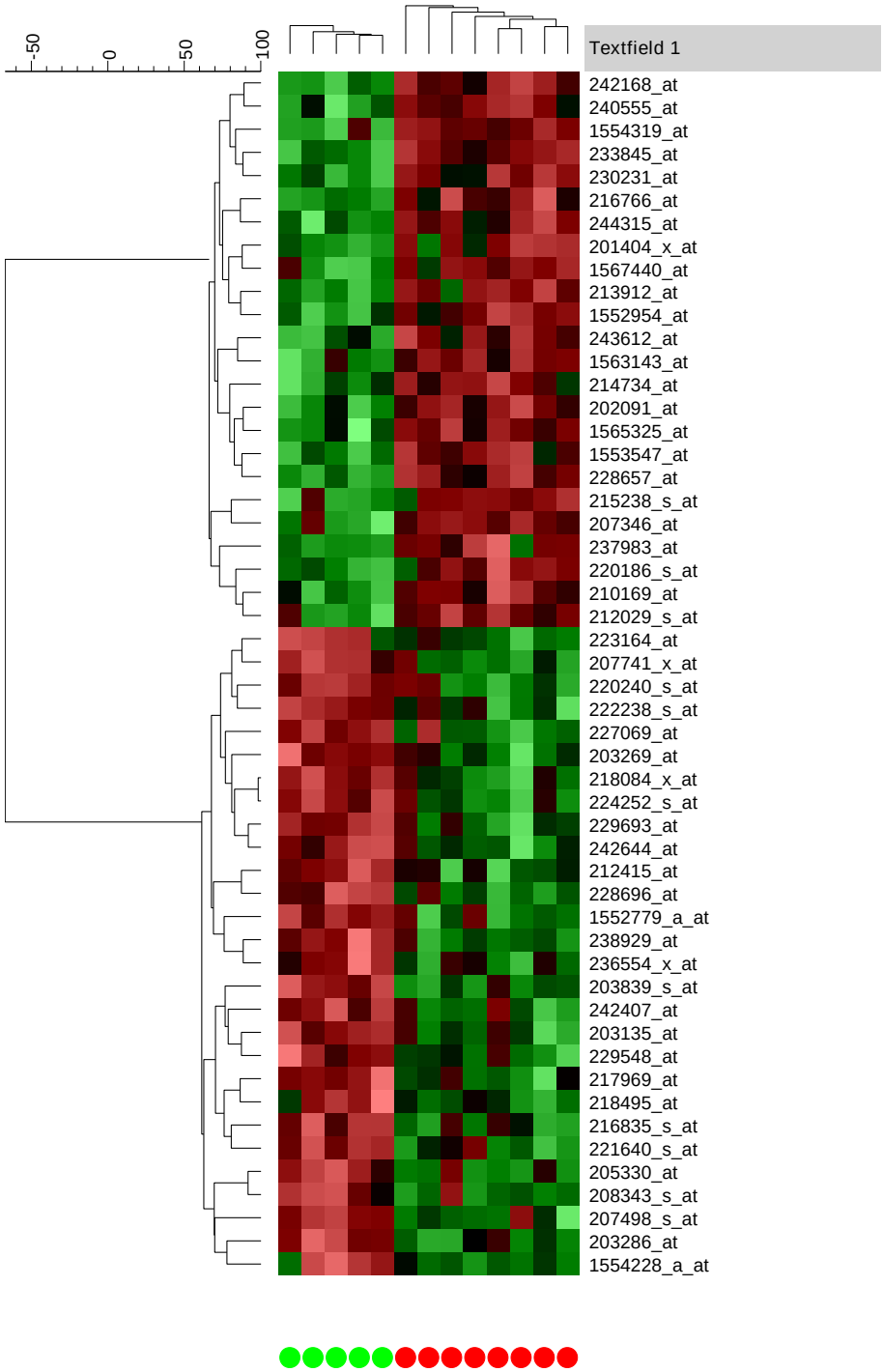


Figure 41 : analyse du profil transcriptomique associé à l'expression du CD81. La couleur de la heatmap varie selon la valeur de l'expression génique (rouge : surexpression, vert : sous-expression). Les pastilles vertes (n=5) représentent les patients CD81 négatifs. Les pastilles rouges (n=8) représentent les patients CD81 positifs.

Identité de la sonde	Symbole	Nom du gène	Localisation cellulaire	Type de protéine	p value	Fold Change
1554228_a_at	*BAALC-AS2*	*BAALC antisense RNA 2*	Autre	Autre	0,000275	-12.1
1552954_at	*C5orf17*	*chromosome 5 open reading frame 17*	Noyau	Facteur de transcription	0,000486	3.2
223164_at	*CCM2*	*cerebral cavernous malformation 2*	Cytoplasme	Autre	0,002738	-2.1
220186_s_at	*CDHR2*	*cadherin-related family member 2*	Membrane	Autre	0,000579	1.8
227069_at	*CUX1*	*cut-like homeobox 1*	Noyau	Enzyme	0,00345	-1.7
207498_s_at	*CYP2D6 /// CYP2D7 /// LOC101929829*	*cytochrome P450, family 2, subfamily D*	Cytoplasme	Cytochrome	0,002222	-1.9
215238_s_at	*DOCK9*	*dedicator of cytokinesis 9*	Cytoplasme	Enzyme	0,000544	12.8
216835_s_at	*DOK1*	*docking protein 1*	Noyau	Autre	0,00283	-1.7
214734_at	*EXPH5*	*exophilin 5*	Cytoplasme	Autre	0,004916	2.6
230231_at	*FGF14*	*fibroblast growth factor 14*	Extracellulaire	Cytokine	0,000398	7.6
218084_x_at	*FXYD5*	*FXYD domain containing ion transport regulator 5*	Membrane	Canal ionique	0,000078	-2.2
224252_s_at	*FXYD5*	*FXYD domain containing ion transport regulator 5*	Membrane	Canal ionique	6,05E-05	-2.2
228657_at	*KIF1B*	*kinesin family member 1B*	Mitochondrie	Autre	0,000299	13.3
205330_at	*MN1*	*meningioma (disrupted in balanced translocation) 1*	Autre	Autre	0,000278	-15.6
242168_at	*NDUFS7*	*NADH dehydrogenase (ubiquinone) Fe-S protein 7, 20kDa (NADH-coenzyme Q reductase)*	Mitochondrie	Enzyme	0,000186	2.2
208343_s_at	*NR5A2*	*nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2*	Noyau	Autre	0,00275	-13.1
243612_at	*NSD1*	*nuclear receptor binding SET domain protein 1*	Noyau	Enzyme	0,001697	2.1
203269_at	*NSMAF*	*neutral sphingomyelinase activation associated factor*	Cytoplasme	Enzyme	0,00235	-1.5
221640_s_at	*PIDD1*	*p53-induced death domain protein 1*	Noyau	Apoptose	0,00659	-1.8
202091_at	*PLLP*	*plasmolipin*	Membrane	Canal ionique	0,001694	2.1
244315_at	*PLSCR1*	*phospholipid scramblase 1*	Noyau	Enzyme	0,004113	4.1
222238_s_at	*POLM*	*polymerase (DNA directed), mu*	Noyau	Enzyme	0,001886	-1.9
1567440_at	*PSEN1*	*presenilin 1*	Autre	Enzyme	0,000655	2.1
201404_x_at	*PSMB2*	*proteasome subunit beta 2*	Cytoplasme	Enzyme	0,003008	1.8
212029_s_at	*PTOV1-AS2*	*PTOV1 antisense RNA 2*	Autre	Autre	0,000298	3.4
203286_at	*RNF44*	*ring finger protein 44*	Autre	Autre	0,000229	-1.5
1554319_at	*RPS6KA5*	*ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 5*	Noyau	Enzyme	0,000149	15.3
210169_at	*SEC14L5*	*SEC14-like lipid binding 5*	Cytoplasme	Autre	0,000707	1.9
212415_at	*SEPT6*	*septin 6*	Noyau	Autre	0,003941	-1.8
1552779_a_at	*SLC44A5*	*solute carrier family 44, member 5*	Membrane	Autre	0,001355	-5.9
228696_at	*SLC45A3*	*solute carrier family 45, member 3*	Membrane	Autre	0,001065	-4.2
1565325_at	*SNHG4*	*small nucleolar RNA host gene 4*	Noyau	Facteur de transcription	0,006998	6.5
238929_at	*SRSF8*	*serine/arginine-rich splicing factor 8*	Noyau	Autre	0,00033	-2.3
207346_at	*STX2*	*syntaxin 2*	Extracellulaire	Autre	0,000722	2.5
213912_at	*TBC1D30*	*TBC1 domain family, member 30*	Membrane	Enzyme	0,00095	10.7
203135_at	*TBP*	*TATA box binding protein*	Noyau	Facteur de transcription	0,002729	-1.3
242644_at	*TMC8*	*transmembrane channel like 8*	Membrane	Canal ionique	0,001464	-1.8
236554_x_at	*TMC8*	*transmembrane channel like 8*	Membrane	Canal ionique	0,002218	-1.8
220240_s_at	*TMCO3*	*transmembrane and coiled-coil domains 3*	Membrane	Autre	0,000783	-1.9
229693_at	*TMEM220*	*transmembrane protein 220*	Membrane	Autre	0,000404	-2.1
203839_s_at	*TNK2*	*tyrosine kinase, non-receptor, 2*	Noyau	Enzyme	0,000102	-1.8
207741_x_at	*TPSAB1*	*tryptase alpha/beta 1*	Extracellulaire	Enzyme	7,92E-05	-16.3
218495_at	*UXT*	*ubiquitously expressed prefoldin like chaperone*	Noyau	Autre	0,001235	-1.4
217969_at	*VPS51*	*vacuolar protein sorting 51 homolog (S. cerevisiae)*	Cytoplasme	Autre	0,003104	-1.6

Tableau 10 : liste des gènes dérégulés lors de l'analyse du profil d'expression génique par puces *GeneChip™ U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix). Une valeur de $p < 0.05$ est considérée comme significative.

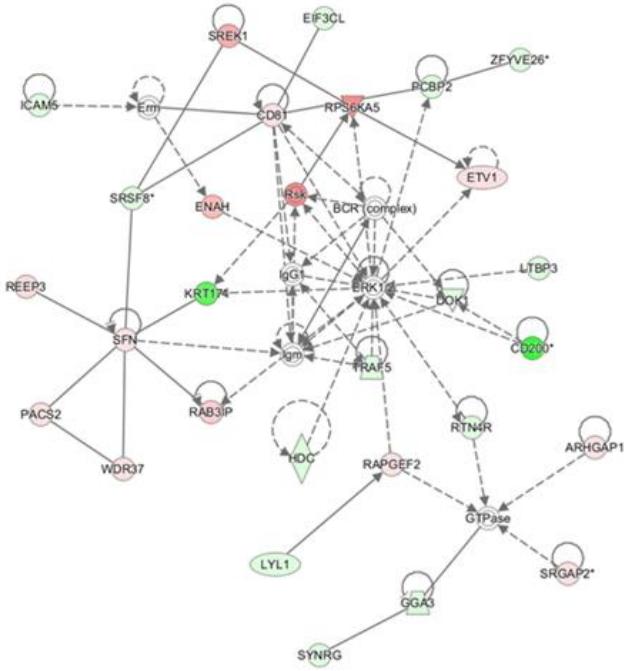


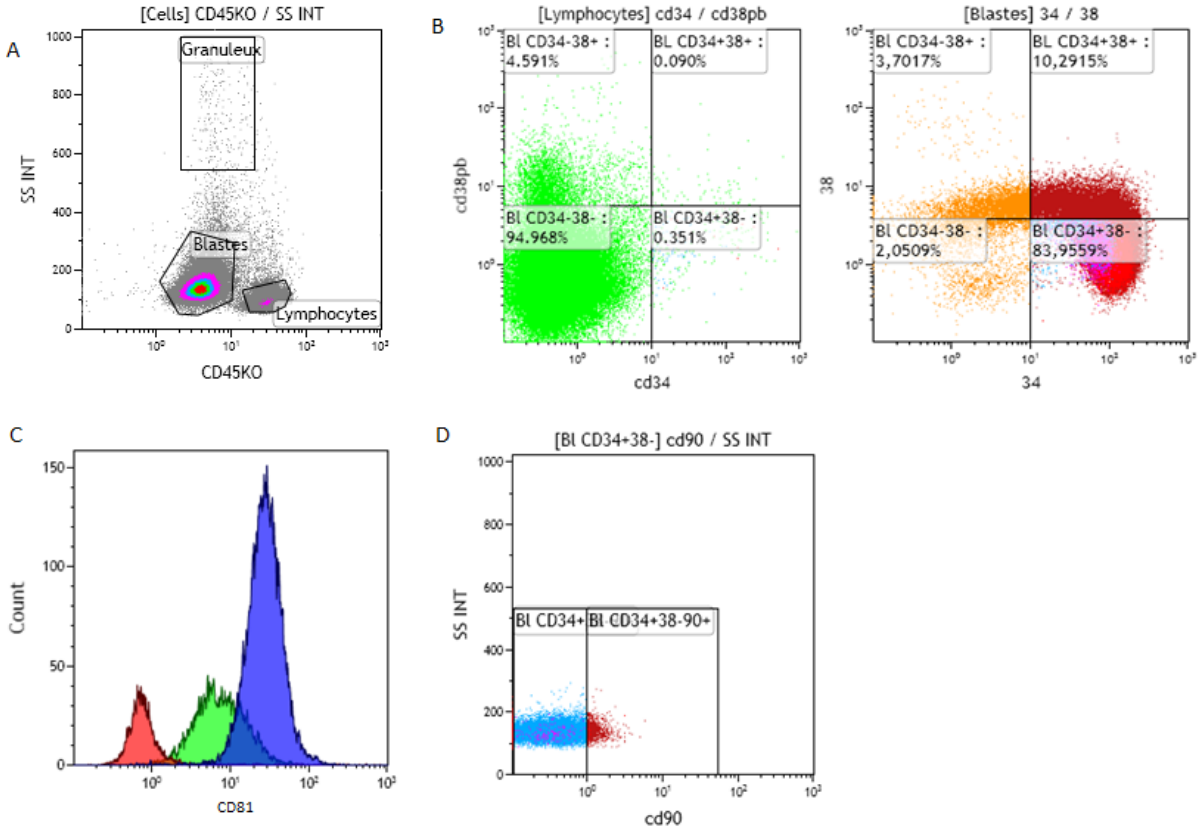
Figure 42 : exemple de voies de signalisation dérégulées par l'expression du CD81 (logiciel Ingenuity™). Les gènes sous exprimés sont colorés en vert, les gènes surexprimés sont colorés en rouge.

4. Hétérogénéité phénotypique au diagnostic et CD81

Grâce à la combinaison d'anticorps utilisée (cf Matériels et Méthodes, 2.c)), nous avons pu étudier la distribution des différentes sous-populations blastiques au diagnostic de LAM sur les 134 patients de la série et sur les 11 échantillons de moelle normale. Le choix des marqueurs CD90 et CD123 afin de discriminer les différentes sous-populations a été motivé par les données de la littérature. En effet, ces deux molécules de surface ont été décrites comme permettant une discrimination des CSH physiologiques et des CIL au sein de la sous-fraction blastique CD34+ CD38- (42,43,180). En plus de ces marqueurs « classiques », nous avons souhaité étudier l'expression du CD81 sur ces sous-populations, en plus de l'expression sur les blastes totaux, dans la mesure où une activité sur les CSH murines avait été décrite (84).

La stratégie de sélection des sous-populations blastiques repose sur plusieurs étapes, après acquisition d'au moins 200 000 évènements par le cytomètre (figure 43).

1) Sélection des blastes sur une expression plus faible du CD45 (figure 43a)
2) Détermination de l'intensité du CD38 sur les lymphocytes afin de définir la sous-fraction CD34+ CD38- des blastes (figure 43b)
3) Détermination des seuils de positivité du CD90 et du CD123 sur les blastes totaux par rapport à un contrôle isotypique
4) Détermination du seuil de positivité du CD81 sur les blastes totaux par rapport à un contrôle isotypique ; validation supplémentaire en utilisant un contrôle interne négatif (granulocytes) et positif (lymphocytes) (figure 43c)
5) Sélection de la sous fraction CD34+ CD38- CD90- (figure 43d)
6) Sélection de la sous fraction CD34+ CD38- CD123+ (figure 43e)
7) Sélection de la sous fraction CD34+ CD38- CD81+ (figure 43f)



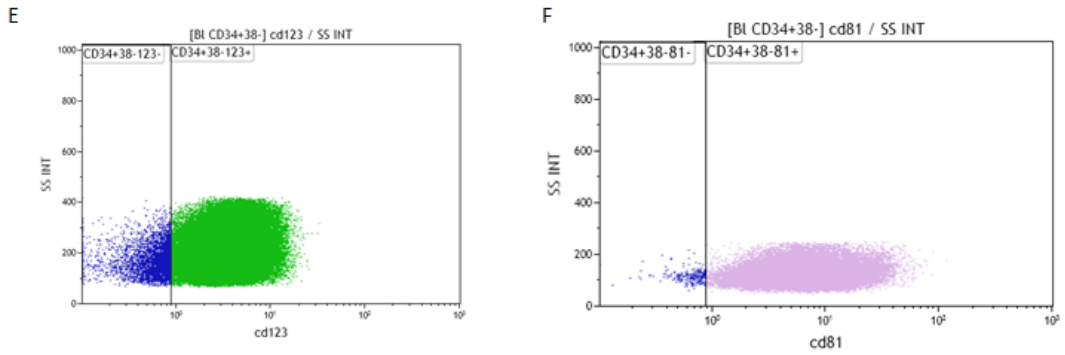


Figure 43 : stratégie de sélection en cytométrie en flux des sous-populations blastiques d'intérêt au diagnostic de LAM. A : sélection des blastes sur la faible expression du CD45. B : fixation de l'intensité du CD38 sur les lymphocytes (à gauche) afin de déterminer le seuil de la fraction CD34+ CD38-. C : intensité du CD81 selon les différentes sous populations cellulaires (en rouge : granulocytes, en vert : lymphocytes, en bleu : blastes). D : sélection des cellules CD90- de la sous fraction CD34+ CD38-. E : détermination de la sous-fraction blastique CD34+ CD38- CD123+. F : détermination de la sous-fraction blastique CD34+ CD38- CD81+.

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux sous populations blastiques suivantes :

- Fraction CD34+ CD38-
- Fraction CD34+ CD38- CD90-
- Fraction CD34+ CD38- CD123+
- Fraction CD34+ CD38- CD81+

La moyenne de distribution des différentes sous-populations sur les moelles normales est résumée dans le tableau ci-dessous.

Paramètre	Moyenne
Blastes*	1,57% (0.73-3.0)
CD34+38-**	13,8% (5.7-19.5)
CD34+38-90-**	1,65% (0.11-4.29)
CD34+38-123+**	3.18% (0.77-8.59)
CD34+38-81+**	2.41% (0.76-3.78)

Tableau 11 : distribution des sous-populations blastiques sur les échantillons de moelle

normale (*pourcentage de l'ensemble des leucocytes**pourcentage de la population blastique. Entre parenthèses sont indiquées les valeurs basses et hautes (en pourcentage) retrouvées pour chaque sous-population)

Les différentes sous-fractions enrichies en CIL (CD34+CD38-, CD34+CD38-CD90- et CD34+CD38-CD123+) sont présentes chez des individus sains (13.8%, 1.65% et 3.18% des blastes respectivement). Nous constatons que c'est également le cas pour la sous-fraction CD34+CD38-CD81+, retrouvée sur 2.41% des blastes physiologiques.

Nous avons appliqué ce même panel aux 134 échantillons de moelle osseuse de notre série de LAM et les résultats obtenus sont présentés dans le tableau 12 :

CD34+38-	Nombre (%)
0-0,01%	0 (0)
0,01-0,1%	5 (4)
0,1-1%	24 (18)
1-10%	**50 (37)**
10-50%	44 (33)
50-100%	11 (8)

CD34+38-90-	Nombre (%)
0-0,01%	5(4)
0,01-0,1%	21 (16)
0,1-1%	36 (27)
1-10%	**49 (37)**
10-50%	21 (16)
50-100%	0 (0)

CD34+38-81+	Nombre (%)
0-0,01%	7 (5)
0,01-0,1%	13 (10)
0,1-1%	33 (25)
1-10%	**48 (36)**
10-50%	32 (24)
50-100%	1 (0)

CD34+38-123+	Nombre (%)
0-0,01%	4 (3)
0,01-0,1%	11 (8)
0,1-1%	45 (34)
1-10%	**53 (40)**
10-50%	19 (14)
50-100%	2 (1)

Tableau 12 : nombre de patients et pourcentage des différentes sous-populations blastiques au diagnostic de LAM (n=134) (en gras et rouge : fraction majoritaire de la sous-population, résultats exprimés en pourcentage de la population blastique)

Les résultats d'immunophénotypage avec les marqueurs utilisés révèlent une certaine hétérogénéité de la population blastique au diagnostic de LAM. Ainsi, la majorité des patients (50 soit 37% de la série) a un taux de CD34+CD38- compris entre 1 et 10% des blastes totaux et seulement 8% d'entre eux possèdent un pourcentage de CD34+CD38-

supérieur à 50% des blastes. Les autres sous-populations enrichies en CIL sont présentes dans des proportions similaires chez les patients de notre cohorte, représentant majoritairement 1 à 10% de la population blastique.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'impact de ces différentes sous-populations sur la survie des patients (EFS, OS et RFS). L'étude de l'impact pronostique des différentes sous-populations étudiées est résumée dans le tableau 13. Concernant les marqueurs classiques, nous ne retrouvions pas d'impact du taux de CD34+CD38- sur ces trois paramètres (p=0.95, p=0.31 et p=0.73 respectivement) et seulement un effet du CD34 sur la RFS (p=0.03). Aucun impact de la fraction CD34+CD38-CD90- sur la survie n'a été mis en évidence dans notre série.

Sous population	EFS (p-value)	OS (p-value)	RFS (p-value)
CD34+38-	0.95	0.31	0.73
CD34+38-90-	0.25	0.15	0.69
CD34+38-123+	0.06	0.02	0.38
CD34+38-81+	0.77	0.86	0.92

Tableau 13 : impact pronostique des sous-populations blastiques sur les paramètres de survie des 134 patients

Concernant la sous fraction CD34+ CD38- CD123+, nous retrouvons une diminution significative de l'OS chez les patients présentant un taux de CD34+ CD38- CD123+ supérieur à 0.4% des blastes (p=0.02, figure 43). En revanche, nous ne retrouvons pas d'impact sur la survie des patients lorsque le CD81 est associé à la sous fraction CD34+ CD38-.

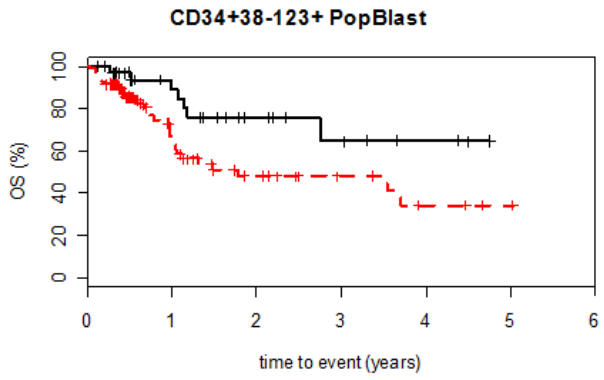


Figure 44 : analyse statistique de l'impact de la fraction CD34+38-123+ sur la survie globale des patients (n=134) (courbe noire : taux de CD34+ CD38- CD123+ inférieur à 0.4% de la population blastique, courbe rouge : taux de CD34+ CD38- CD123+ supérieur à 0.4% de la population blastique)

Dans un second temps, nous nous sommes concentrés sur l'expression du CD123 et du CD81 sur la sous fraction CD34+ CD38- CD90- (que nous abrègerons CIL) afin d'évaluer l'intérêt de l'adjonction de ces marqueurs sur cette sous population, censée être enrichie en CIL. Ainsi, les sous fractions étudiées sont : CIL CD123- CD81-, CIL CD123+ CD81-, CIL CD123- CD81+ et CIL CD123+ CD81+. Cette étude a été réalisée sur notre cohorte de 134 patients et les résultats d'immunophénotypage obtenus sont présentés dans le tableau 14.

CIL 123-81-	Nombre (%)
0-0,01%	30 (22)
0,01-0,1%	38 (28)
0,1-1%	**39 (29)**
1-10%	22 (17)
10-50%	5 (4)
50-100%	0 (0)

CIL 123+81-	Nombre (%)
0-0,01%	**43 (32)**
0,01-0,1%	37 (28)
0,1-1%	35 (26)
1-10%	18 (13)
10-50%	1 (1)
50-100%	0 (0)

CIL 123-81+	Nombre (%)
0-0,01%	31 (23)
0,01-0,1%	30 (22)
0,1-1%	**38 (28)**
1-10%	30 (22)
10-50%	6 (5)
50-100%	0 (0)

CIL 123+81+	Nombre (%)
0-0,01%	**42 (31)**
0,01-0,1%	29 (22)
0,1-1%	37 (28)
1-10%	22 (16)
10-50%	4 (3)
50-100%	0 (0)

Tableau 14 : nombre de patients et pourcentage des différentes sous-populations blastiques au diagnostic de LAM (n=134) (en gras et rouge : fraction majoritaire de la sous-population, résultats exprimés en pourcentage de la population blastique)

Comme attendu, l'hétérogénéité phénotypique de ces sous populations est importante et les sous-populations blastiques discriminées sur le CD123 et le CD81 constituent des fractions minoritaires de la population blastique, avec une majorité de patients exprimant moins de 1% de la combinaison étudiée (CIL CD123- CD81+ et CIL CD123-CD81-), voire moins de 0.01% concernant la sous-population CD123+ CD81-. Il est enfin à noter qu'environ 20% des patients n'expriment ni le CD123, ni le CD81 sur la sous fraction CD34+ CD38- CD90-.

Pour terminer, nous nous sommes intéressés à l'impact de ces différentes sous-populations sur la survie des patients (EFS, OS et RFS) et les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 15.

Sous population	EFS (p-value)	OS (p-value)	RFS (p-value)
CIL CD123-CD81-	p=0,03	p=0,26	p=0,005
CIL CD123-CD81+	p=0,34	p=0,07	p=0,68
CIL CD123+CD81-	p=0,93	p=0,81	p=0,62
CIL CD123+CD81+	p<0,0001	p=0,0001	p=0,002

Tableau 15 : impact pronostique des sous-populations blastiques sur les paramètres de survie des 134 patients (les valeurs statistiques significatives sont indiquées en rouge)

La fraction CIL double positive pour le CD123 et le CD81 possède un effet sur les trois paramètres de survie dans notre série alors que la fraction CIL double négative a un impact négatif sur l'EFS et la RFS mais pas sur l'OS. Les deux autres fractions (CIL CD123-CD81+ et CD123+CD81-) n'ont aucun effet significatif sur la survie, malgré une tendance à une OS plus faible pour la sous-population CIL CD123-CD81+ (p=0.07).

DISCUSSION

Les LAM constituent un groupe hétérogène d'hémopathies tant au niveau morphologique, immunophénotypique que cytogénétique et moléculaire, comme l'atteste la dernière classification OMS de ces pathologies (94). De ce fait, les facteurs pronostiques sont primordiaux afin de sélectionner la thérapie la plus adaptée à chaque patient. En effet, chez les patients adultes (âge < 60 ans) traités par chimiothérapie intensive, la RC est atteinte dans 60 à 85% des cas mais la pathologie n'est guérie que chez 40% des patients (181). Chez les personnes plus âgées (âge > 60 ans), le pronostic est davantage péjoratif puisque, sur les 50% de patients atteignant la RC, 85% d'entre eux rechutent (182).

Actuellement, l'analyse cytogénétique est un examen biologique fondamental pour une classification pronostique des LAM (70) et trois groupes sont actuellement définis : favorable, intermédiaire et défavorable (181). Dans les LAM-CN, les facteurs pronostiques sont particulièrement importants et des sous-groupes, basés sur le statut mutationnel de gènes tels que *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPα*, *IDH 1/2*, *ASXL1* ou encore *TET2*, ont été définis (135,183). En dépit des nombreux travaux effectués depuis une dizaine d'années, de nouveaux outils pronostiques restent à définir pour mieux préciser le pronostic hétérogène des LAM.

Dans la première partie de ce travail, nous avons évalué l'impact pronostique de l'expression du CD81 sur une cohorte de 134 patients adultes atteints de LAM et traités par chimiothérapie intensive. Nous avons pu mettre en évidence une expression du CD81 sur les blastes de 69% des patients atteints de LAM. Les patients qui présentaient une expression du CD81 sur plus de 20% des blastes étaient plus âgés (p=0.04), davantage hyperleucocytaires au diagnostic (p=0.02) et présentaient une cytogénétique intermédiaire (p<0.0001) par rapport aux patients dont les blastes étaient CD81 négatifs. L'expression du CD81 était associée à un pronostic péjoratif sur les paramètres de survie (OS, EFS et RFS), en analyses univariée et multivariée. De plus, ce mauvais pronostic était d'autant plus important que l'expression du CD81 sur les blastes était élevée. Chez les patients appartenant au groupe favorable selon l'ELN (LAM du groupe CBF, LAM avec t(15;17)(q22;q12), LAM-CN *NPM1*+ *FLT3-ITD*- et LAM-CN avec *CEBPα* double muté), une expression du CD81 sur plus de 20% des blastes était associée à une survie globale diminuée

(p=0.002). Cette donnée semble particulièrement intéressante puisqu'elle permettrait de discriminer une population de patients de moins bon pronostic dans ce groupe de faible risque et ainsi autoriser leur reclassement dans un groupe de risque supérieur. Ces patients pourraient éventuellement bénéficier d'une prise en charge thérapeutique plus agressive, et l'utilité d'une allogreffe en première rémission complète, qui n'est actuellement pas recommandée dans ce groupe de risque favorable, pourrait être évaluée pour gommer cet écart de survie. Néanmoins, de nouvelles études sont nécessaires pour confirmer cet impact sur de plus larges cohortes de patients.

Cette étude clinico-biologique permet de conclure pour la première fois sur le rôle péjoratif du CD81 sur la survie des patients atteints de LAM, ce qui n'avait jamais été étudié auparavant. Le rôle pronostique du CD81 avait été essentiellement étudié dans le MM, où son expression sur les plasmocytes était associée à une PFS et une OS inférieures (164). L'expression du CD81 était même restreinte aux plasmocytes anormaux (162).

Les mécanismes impliquant le CD81 ne sont, pour l'heure, pas encore élucidés. Nous n'avons pas trouvé de différence significative en terme de MRD1 (post induction) entre les patients négatifs et positifs pour ce marqueur, ce qui rend peu probable un mécanisme de chimiorésistance induit par l'expression du CD81 sur les blastes. Cependant, nous avons trouvé une tendance (p=0.09) à une plus forte expression de CD81 chez les patients avec une MRD2 (post consolidation) positive ; cette observation nécessite d'être validée sur une plus large cohorte pour établir le lien entre l'expression du CD81 et le risque plus élevé de rechute.

L'un des mécanismes avérés du CD81 dans l'hématopoïèse physiologique est son rôle dans la quiescence des CSH ; plus exactement, le CD81 semble favoriser leur retour en quiescence après un stress oxydatif (84), observation qui confirmait le travail de Venezia et al. (83). Dans une seconde partie, nous nous sommes donc intéressés au rôle potentiel du CD81 sur la prolifération cellulaire dans les LAM. Dans ce but, nous avons choisi d'étudier en CMF l'expression du Ki67 sur des blastes négatifs ou positifs pour le CD81. Ce choix d'étude du cycle cellulaire en utilisant un anticorps anti Ki67 a été motivé par plusieurs raisons :

- Eviter un biais de culture qui aurait été induit par l'utilisation du BrdU
- Les tests utilisant l'iodure de propidium (IP) n'ont pas été concluants. L'utilisation de

ce marqueur n'a pas été compatible avec un marquage de surface préalable sur des cellules primaires issues de patients (moins robustes et en quantité limitée par rapport aux blastes issus de culture). Ce marquage de surface, avec le CD81 en PE dans notre panel, est indispensable à l'étude de l'expression du marqueur. Nous avons testé plusieurs méthodes de perméabilisation des cellules et aucune ne s'est réellement montrée satisfaisante ; de plus, le spectre d'émission de l'IP étant très large, les fuites de fluorescence dans les autres canaux rendaient très difficiles l'utilisation d'autres anticorps sur nos échantillons. Ces fuites de fluorescence étant également rencontrées avec d'autres marqueurs de l'ADN (Hoechst™33432…), nous avons donc privilégié l'utilisation d'un anticorps monoclonal anti Ki67, pouvant être couplé avec notre marquage de surface.

A notre connaissance, très peu d'études ont été publiées sur l'utilisation d'un anti-Ki67 sur des blastes primaires de LAM, nous offrant ainsi peu de comparaisons avec notre série. Une étude de 2005 retrouvait cependant un niveau d'expression de l'ARN messager du Ki67 (mesuré par RT-PCR) comparable entre des blastes issus de LAM et des échantillons de moelle osseuse ou de sang périphérique issus de donneurs sains (184).

Sur notre série de 10 patients, nous n'avons pas mis en évidence une différence significative d'expression du Ki67 entre les blastes CD81 négatifs et CD81 positifs (6.5% vs 6.7% des cellules marquées, p=0.93), ne signifiant donc pas une implication de cette tétraspanine dans la quiescence cellulaire des blastes de LAM. De plus, la présence du CD81 sur les blastes CD34+ CD38- ne semble pas influer sur l'expression du Ki67 au sein de cette sous fraction blastique. Sur notre cohorte de 134 patients, l'expression du CD81 sur les blastes était associée à une hyperleucocytose au diagnostic (p=0.02), ce qui va dans le sens d'une absence de rôle du CD81 dans la quiescence des blastes de LAM. Le CD81 est une molécule d'adhésion et une hyperleucocytose au diagnostic pourrait être expliquée par un défaut de homing des cellules blastiques. Le rôle du CD81 dans l'adhésion cellulaire a également été mis en évidence dans le MM puisque les plasmocytes tumoraux circulants sous-expriment cette molécule (164). L'étude des partenaires du CD81 dans la LAM est indispensable afin d'apporter une réponse sur le rôle de cette molécule sur les blastes. Les molécules associées au CD81 varient selon le type cellulaire considéré (CD19 pour les lymphocytes B, CD4 et CD8 pour les lymphocytes T…(67)) et semblent grandement influer sur le rôle du CD81, comme

dans le MM où son association avec le CD19 serait à l'origine de son rôle pronostique péjoratif (165). Dans notre cohorte, nous n'avons pas retrouvé d'association du CD81 avec le CD19 sur les blastes de LAM. Des études de coimmunoprécipitation seraient utiles pour connaître les partenaires du CD81 à la surface des cellules blastiques.

Les fonctions biologiques du CD81 sont multiples et son association avec d'autres molécules de surface illustre la grande hétérogénéité des rôles de cette tétraspanine (67). Les voies de signalisation cellulaire associées au CD81 sont tout aussi diverses et, là encore, semblent différer selon le type cellulaire considéré. En effet, si la voie Akt est sous l'influence du CD81 dans les CSH (84), son association avec PI4K dans le carcinome hépatocellulaire (185), avec PKC (à l'instar d'autres tétraspanines) dans différentes lignées cellulaires (186) ou encore avec la voie Rac (187,188) a été démontrée par ailleurs. Dans un premier temps, l'analyse transcriptomique nous a permis de mettre en évidence un profil d'expression génique associé à l'expression du CD81. Cette étude n'a pu être menée que sur 13 patients faute de matériel disponible. Ce profil d'expression comporte 42 gènes. 24 gènes sont retrouvés surexprimés dans les LAM CD81 positives par rapport aux LAM CD81 négatives comme *KIF1B*, *NSD1*, *SLC44A5* ou encore *EXPH5*. Ces gènes engendrent des protéines localisées à tous les niveaux cellulaires (membranaire, cytoplasmique, nucléaire) qui présentent des fonctions variées (facteur de transcription, enzyme…). 18 gènes sont à l'inverse retrouvés sous-exprimés tels *CUX1*, *TBD*, *FXYD5*. Parmi les gènes sous-exprimés, deux d'entre eux ont été reconnus par deux sondes différentes (*FXYD5* et *TMC8*) et ces deux gènes codent des canaux ioniques. Ces 2 gènes n'ont pas, à ce jour, été décrits dans la pathologie hématologique. Cependant, certains des gènes dérégulés de notre signature transcriptomique ont montré une implication dans les leucémies aiguës. Une étude suédoise de 2014, par séquençage de 168 enfants atteints de LAL-B, identifiait une mutation de *KIF1B* comme possible mutation *driver* de ces pathologies (189). Cette observation semble intéressante dans la mesure où *KIF1B* est décrit dans les cancers solides comme un gène suppresseur de tumeur (190). Le statut mutationnel de *KIF1B*, surexprimé dans les blastes CD81 positifs, serait intéressant à étudier dans les LAM. L'importance de ce gène dans la pathogénèse des LAL-B, qui expriment assez largement le CD81, pose la question d'une éventuelle coopération entre *KIF1B* et le CD81. Le transcrit de fusion *NUP98-NSD1* est retrouvé dans 16% et 2% des LAM-CN de l'enfant et de l'adulte respectivement (191,192) et confère un pronostic péjoratif à

ces hémopathies. Nous n'avons pas étudié l'expression du CD81 dans les LAM de l'enfant, ce qui constituerait une suite logique à ce travail. Il serait également intéressant de corréler la présence du transcrit de fusion à l'expression de ce marqueur, le gène *NSD1* étant surexprimé dans les blastes CD81 positifs. De façon intéressante, nous retrouvons une sous-expression du gène *CUX1*, gène suppresseur de tumeur, fréquemment inactivé dans les LAM (193) et associé dans notre série à l'expression du CD81.

Dans un second temps, nous avons modélisé, grâce au logiciel Ingenuity™, les différentes voies de signalisation pouvant être impactées par ce profil d'expression génique. Des réseaux fonctionnels comme la réponse inflammatoire, le développement cellulaire ou la signalisation cellulaire apparaissent affectés par l'expression du CD81. La molécule STAT1, impliquée dans la réponse inflammatoire et la signalisation cellulaire, est retrouvée constamment surexprimée en cas d'expression du CD81. Ce facteur de transcription est connu pour être activé suite à une liaison de l'IFN sur son récepteur membranaire (194). De façon intéressante, une coopération entre STAT5 et une surexpression du gène *MN1*, dérégulé dans notre analyse transcriptomique, a été décrite comme étant critique pour l'auto-renouvellement des CIL de LAM (195). A l'inverse, une activation de STAT1 via le gène RIG-1 inhiberait la croissance des blastes de LAM *in vitro* et *in vivo* (196). Une étude de la signalisation par la voie JAK/STAT sur les blastes CD81 positifs paraît donc judicieuse au vu des données contradictoires de la littérature, les facteurs STAT3 et STAT5 ayant une implication décrite dans les leucémies (197,198). D'autre part, le CD200, une glycoprotéine membranaire de la superfamille des immunoglobulines, a été retrouvée sous-exprimée en cas d'expression du CD81. Cette molécule a montré un intérêt dans la différenciation de la LLC et du lymphome du manteau, tous deux CD5+ (199) et, à notre connaissance, aucune étude dans la pathologie lymphoïde (ou myéloïde) n'a étudié la relation entre ces deux marqueurs. Enfin, nous avions souligné en introduction l'importance de la coopération dans les LAM entre le CD82, PKCα et la voie Akt/STAT5 (168,169) : ces voies de signalisation seraient à explorer chez les blastes CD81 positifs.

Dans la dernière partie du travail, nous nous sommes intéressés à l'hétérogénéité phénotypique des blastes au diagnostic de LAM dans notre série de 134 patients et de 11 échantillons de moelles normales en étudiant l'expression des marqueurs CD34, CD38, CD90, CD123 et CD81. Aucune sous-fraction ne permet de différencier les blastes physiologiques

des blastes leucémiques, dans la mesure où toutes ces populations sont présentes dans nos échantillons de moelle normale. Nous n'avons pas retrouvé d'impact pronostique du pourcentage de cellules CD34+CD38- les paramètres de survie, observation déjà rapportée par l'équipe de Gerber (200). Nous ne retrouvons également pas d'impact pronostique du pourcentage de cellules CD34+ CD38- CD90- au sein des blastes; là encore, les données de la littérature sont contradictoires. La fraction CD34+ CD38- CD90- est décrite comme étant enrichie en CIL (42) donc de pronostic théoriquement plus sombre mais, à notre connaissance, seule une étude de 2004 s'est intéressée au pronostic du CD90 (201). La série de LAM *de novo* comprenait 100 patients et les auteurs décrivaient un effet péjoratif de la fraction CD34+CD90+ sur la survie des patients en analyse univariée. Le rôle du CD90 dans la leucémogénèse reste donc à préciser. Les sous fractions CD34+ CD38- CD123+ et CD34+ CD38- CD81+ sont retrouvées, pour la majorité des patients, à hauteur de 1 à 10% de la population blastique totale. L'adjonction du CD81 sur la sous fraction CD34+ CD38- n'a pas d'impact pronostique dans notre cohorte. Si l'on considère l'expression du CD123 dans cette sous fraction, la survie globale des patients est significativement diminuée (p=0.02), retrouvant une observation déjà rapportée par Vergez et al. (45). Enfin, l'évaluation de l'expression du CD81 et du CD123 dans la sous-population blastique CD34+ CD38- CD90- a permis une caractérisation d'environ 80% des LAM de notre série, seules 20% d'entre elles n'exprimant aucun des deux marqueurs. Si l'on considère nos données de survie, seule la sous-population CIL CD123+ CD81+ possède un impact significativement péjoratif sur les 3 paramètres de survie (p<0.0001, p=0.0001 et p=0.002 sur l'EFS, l'OS et la RFS respectivement) ; inversément, nous ne retrouvons pas d'influence des sous-fractions CIL CD123- CD81+ et CD123+ CD81- sur la survie des patients. Par contre, nous retrouvons un impact négatif du pourcentage de la sous-population blastique CIL double négative (CD123- CD81-, p=0.03 et p=0.005 pour l'EFS et la RFS respectivement) suggérant qu'un autre marqueur présent sur les CIL est responsable du pronostic des patients.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Dans notre série de 134 patients atteints de LAM, le CD81 est exprimé sur les blastes dans 69% des cas et cette expression est corrélée à une hyperleucocytose au diagnostic et à une cytogénétique intermédiaire. La survie est alors significativement inférieure, quelque soit le paramètre considéré (EFS, OS, RFS), en analyses uni- et multivariées. De façon intéressante, un impact négatif sur la survie globale dans les groupes favorables (cytogénétique et ELN) est associé à l'expression du CD81. L'expression de cette tétraspanine sur les blastes n'est pas associée à une expression plus faible du Ki67 dans notre série de 10 patients, suggérant un rôle du CD81 différent par rapport aux CSH où cette molécule est impliquée dans la quiescence. Néanmoins, l'analyse transcriptomique montre une dérégulation de gènes impliqués dans la réponse inflammatoire ou la signalisation cellulaire. Afin de comprendre le rôle physiopathologique du CD81 dans la LAM, plusieurs pistes suggérées par cette analyse peuvent être envisagées, comme l'étude des voies de signalisation JAK/STAT, Akt et PKCα dans des modèles d'expression différentielle du CD81. L'étude de l'expression du CD81 sur des blastes issus de LAM pédiatriques constitue une suite logique à ce travail. Une étude du gène *NSD1*, retrouvé dans 16% des LAM-CN pédiatriques fusionné à *NUP98* et associé à un pronostic péjoratif, serait souhaitable, ce gène étant surexprimé dans notre série de LAM adulte.

Le rôle exact du CD81 dans la leucémogénèse demeure incertain et son impact clinique n'est pas le même entre les sous-fractions blastiques définies dans notre étude et sur les blastes. Dernièrement, une équipe hollandaise a décrit l'intérêt de l'étude du CD45RA dans les CIL de LAM et les CSH, notamment pour une meilleure différenciation de ces cellules (202). Un marquage en cytométrie en flux sur des moelles normales associant CD34, CD38, CD81, CD90 et CD45RA permettrait de mieux situer le CD81 dans l'hématopoïèse physiologique et son étude sur des moelles de LAM permettrait d'en faire autant concernant la leucémogénèse.

BIBLIOGRAPHIE

1. Trümper LH, Atkins HL. Hematopoietic stem cells, 1961-1991 (meeting report). Cancer Cells Cold Spring Harb N 1989. 1991 Oct;3(10):399–404.

2. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol. 2006 Feb;6(2):93–106.

3. Doulatov S, Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. Cell Stem Cell. 2012 Feb 3;10(2):120–36.

4. Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, et al. Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. Cell Stem Cell. 2010 Jan 8;6(1):48–58.

5. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. Cell Stem Cell. 2007 Dec 13;1(6):635–45.

6. Kondo M. Lymphoid and myeloid lineage commitment in multipotent hematopoietic progenitors. Immunol Rev. 2010 Nov;238(1):37–46.

7. Cheng T, Rodrigues N, Shen H, Yang Y, Dombkowski D, Sykes M, et al. Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. Science. 2000 Mar 10;287(5459):1804–8.

8. Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM, et al. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999 Aug 3;96(16):9118–23.

9. Notta F, Zandi S, Takayama N, Dobson S, Gan OI, Wilson G, et al. Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. Science. 2016 Jan 8;351(6269):aab2116.

10. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. Nature. 2001 Nov 1;414(6859):105–11.

11. Huntly BJP, Gilliland DG. Leukaemia stem cells and the evolution of cancer-stem-cell research. Nat Rev Cancer. 2005 Apr;5(4):311–21.

12. Rieger MA, Hoppe PS, Smejkal BM, Eitelhuber AC, Schroeder T. Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. Science. 2009 Jul 10;325(5937):217–8.

13. Beyne-Rauzy O, Prade-Houdellier N, Demur C, Recher C, Ayel J, Laurent G, et al. Tumor necrosis factor-alpha inhibits hTERT gene expression in human myeloid normal and leukemic cells. Blood. 2005 Nov 1;106(9):3200–5.

14. Rosenbauer F, Tenen DG. Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation. Nat Rev Immunol. 2007 Feb;7(2):105–17.

15. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. Blood. 2011 Feb 24;117(8):2469–75.

16. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. Immunity. 2004 Dec;21(6):853–63.

17. Orkin SH, Zon LI. SnapShot: hematopoiesis. Cell. 2008 Feb 22;132(4):712.

18. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nat Rev Immunol. 2006 Feb;6(2):93–106.

19. Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. Cell. 2008 Feb 22;132(4):598–611.

20. Charbord P, Livne E, Gross G, Häupl T, Neves NM, Marie P, et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells: a systematic reappraisal via the genostem experience. Stem Cell Rev. 2011 Mar;7(1):32–42.

21. Zhang J, Niu C, Ye L, Huang H, He X, Tong W-G, et al. Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. Nature. 2003 Oct 23;425(6960):836–41.

22. Kiel MJ, Yilmaz OH, Iwashita T, Yilmaz OH, Terhorst C, Morrison SJ. SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. Cell. 2005 Jul 1;121(7):1109–21.

23. Li W, Johnson SA, Shelley WC, Yoder MC. Hematopoietic stem cell repopulating ability can be maintained in vitro by some primary endothelial cells. Exp Hematol. 2004 Dec;32(12):1226–37.

24. Méndez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. Nature. 2010 Aug 12;466(7308):829–34.

25. Christopher MJ, Rao M, Liu F, Woloszynek JR, Link DC. Expression of the G-CSF receptor in monocytic cells is sufficient to mediate hematopoietic progenitor mobilization by G-CSF in mice. J Exp Med. 2011 Feb 14;208(2):251–60.

26. Quesnel B. Niches hématopoïétiques et cellules souches. EMC - Hématologie. 2012 Nov;7(4):1–9.

27. Nguyen LV, Vanner R, Dirks P, Eaves CJ. Cancer stem cells: an evolving concept. Nat Rev Cancer. 2012 Feb;12(2):133–43.

28. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. Nat Med. 1997 Jul;3(7):730–7.

29. Dick JE. Stem cell concepts renew cancer research. Blood. 2008 Dec 15;112(13):4793–807.

30. Alison MR, Lin W-R, Lim SML, Nicholson LJ. Cancer stem cells: in the line of fire. Cancer Treat Rev. 2012 Oct;38(6):589–98.

31. Vargaftig J, Taussig DC, Griessinger E, Anjos-Afonso F, Lister TA, Cavenagh J, et al. Frequency of leukemic initiating cells does not depend on the xenotransplantation model used. Leukemia. 2012 Apr;26(4):858–60.

32. van Rhenen A, Feller N, Kelder A, Westra AH, Rombouts E, Zweegman S, et al. High stem cell frequency in acute myeloid leukemia at diagnosis predicts high minimal residual disease and poor survival. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2005 Sep 15;11(18):6520–7.

33. Terwijn M, Zeijlemaker W, Kelder A, Rutten AP, Snel AN, Scholten WJ, et al. Leukemic stem cell frequency: a strong biomarker for clinical outcome in acute myeloid leukemia. PloS One. 2014;9(9):e107587.

34. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. Sci Transl Med. 2010 Feb 3;2(17):17ra9.

35. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. Nature. 1994 Feb 17;367(6464):645–8.

36. Sutherland HJ, Blair A, Zapf RW. Characterization of a hierarchy in human acute myeloid leukemia progenitor cells. Blood. 1996 Jun 1;87(11):4754–61.

37. Sarry J-E, Murphy K, Perry R, Sanchez PV, Secreto A, Keefer C, et al. Human acute myelogenous leukemia stem cells are rare and heterogeneous when assayed in NOD/SCID/IL2Rγc-deficient mice. J Clin Invest. 2011 Jan;121(1):384–95.

38. Eppert K, Takenaka K, Lechman ER, Waldron L, Nilsson B, van Galen P, et al. Stem cell gene expression programs influence clinical outcome in human leukemia. Nat Med. 2011 Sep;17(9):1086–93.

39. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010 Jan 21;115(3):453–74.

40. Taussig DC, Vargaftig J, Miraki-Moud F, Griessinger E, Sharrock K, Luke T, et al. Leukemia-initiating cells from some acute myeloid leukemia patients with mutated nucleophosmin reside in the CD34(-) fraction. Blood. 2010 Mar 11;115(10):1976–84.

41. Pearce DJ, Taussig D, Zibara K, Smith L-L, Ridler CM, Preudhomme C, et al. AML engraftment in the NOD/SCID assay reflects the outcome of AML: implications for our understanding of the heterogeneity of AML. Blood. 2006 Feb 1;107(3):1166–73.

42. Blair A, Hogge DE, Ailles LE, Lansdorp PM, Sutherland HJ. Lack of expression of Thy-1 (CD90) on acute myeloid leukemia cells with long-term proliferative ability in vitro and in vivo. Blood. 1997 May 1;89(9):3104–12.

43. Jordan CT, Upchurch D, Szilvassy SJ, Guzman ML, Howard DS, Pettigrew AL, et al. The interleukin-3 receptor alpha chain is a unique marker for human acute myelogenous leukemia stem cells. Leuk Off J Leuk Soc Am Leuk Res Fund UK. 2000 Oct;14(10):1777–84.

44. Jin L, Lee EM, Ramshaw HS, Busfield SJ, Peoppl AG, Wilkinson L, et al. Monoclonal antibody-mediated targeting of CD123, IL-3 receptor alpha chain, eliminates human acute myeloid leukemic stem cells. Cell Stem Cell. 2009 Jul 2;5(1):31–42.

45. Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry J-E, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucemies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. Haematologica. 2011 Dec;96(12):1792–8.

46. Al-Mawali A, Gillis D, Lewis I. Immunoprofiling of leukemic stem cells CD34+/CD38-/CD123+ delineate FLT3/ITD-positive clones. J Hematol OncolJ Hematol Oncol. 2016;9(1):61.

47. Zhao X, Singh S, Pardoux C, Zhao J, Hsi ED, Abo A, et al. Targeting C-type lectin-like molecule-1 for antibody-mediated immunotherapy in acute myeloid leukemia. Haematologica. 2010 Jan;95(1):71–8.

48. Bakker ABH, van den Oudenrijn S, Bakker AQ, Feller N, van Meijer M, Bia JA, et al. C-type lectin-like molecule-1: a novel myeloid cell surface marker associated with acute myeloid leukemia. Cancer Res. 2004 Nov 15;64(22):8443–50.

49. van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. Blood. 2007 Oct 1;110(7):2659–66.

50. Angiari S, Constantin G. Regulation of T cell trafficking by the T cell immunoglobulin and mucin domain 1 glycoprotein. Trends Mol Med. 2014 Dec;20(12):675–84.

51. Kikushige Y, Shima T, Takayanagi S, Urata S, Miyamoto T, Iwasaki H, et al. TIM-3 is a promising target to selectively kill acute myeloid leukemia stem cells. Cell Stem Cell. 2010 Dec 3;7(6):708–17.

52. Kikushige Y, Miyamoto T. TIM-3 as a novel therapeutic target for eradicating acute myelogenous leukemia stem cells. Int J Hematol. 2013 Dec;98(6):627–33.

53. Kikushige Y, Miyamoto T. Identification of TIM-3 as a Leukemic Stem Cell Surface Molecule in Primary Acute Myeloid Leukemia. Oncology. 2015;89 Suppl 1:28–32.

54. Radulović V, de Haan G, Klauke K. Polycomb-group proteins in hematopoietic stem cell regulation and hematopoietic neoplasms. Leukemia. 2013 Mar;27(3):523–33.

55. Dimri GP, Martinez J-L, Jacobs JJL, Keblusek P, Itahana K, Van Lohuizen M, et al. The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. Cancer Res. 2002 Aug 15;62(16):4736–45.

56. Chandler H, Patel H, Palermo R, Brookes S, Matthews N, Peters G. Role of polycomb group proteins in the DNA damage response--a reassessment. PloS One. 2014;9(7):e102968.

57. Bhattacharya R, Mustafi SB, Street M, Dey A, Dwivedi SKD. Bmi-1: At the crossroads of physiological and pathological biology. Genes Dis. 2015 Sep;2(3):225–39.

58. Park I, Qian D, Kiel M, Becker MW, Pihalja M, Weissman IL, et al. Bmi-1 is required for maintenance of adult self-renewing haematopoietic stem cells. Nature. 2003 May 15;423(6937):302–5.

59. Beà S, Tort F, Pinyol M, Puig X, Hernández L, Hernández S, et al. BMI-1 gene amplification and overexpression in hematological malignancies occur mainly in mantle cell lymphomas. Cancer Res. 2001 Mar 15;61(6):2409–12.

60. Mihara K, Chowdhury M, Nakaju N, Hidani S, Ihara A, Hyodo H, et al. Bmi-1 is useful as a novel molecular marker for predicting progression of myelodysplastic syndrome and patient prognosis. Blood. 2006 Jan 1;107(1):305–8.

61. Yong ASM, Stephens N, Weber G, Li Y, Savani BN, Eniafe R, et al. Improved outcome following allogeneic stem cell transplantation in chronic myeloid leukemia is associated with higher expression of BMI-1 and immune responses to BMI-1 protein. Leukemia. 2011 Apr;25(4):629–37.

62. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol. 1990 Aug;10(8):4007–15.

63. Kitadokoro K, Bordo D, Galli G, Petracca R, Falugi F, Abrignani S, et al. CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. EMBO J. 2001 Jan 15;20(1–2):12–8.

64. Bradbury LE, Kansas GS, Levy S, Evans RL, Tedder TF. The CD19/CD21 signal transducing complex of human B lymphocytes includes the target of antiproliferative antibody-1 and Leu-13 molecules. J Immunol Baltim Md 1950. 1992 Nov 1;149(9):2841–50.

65. Imai T, Kakizaki M, Nishimura M, Yoshie O. Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82. J Immunol Baltim Md 1950. 1995 Aug 1;155(3):1229–39.

66. Todd SC, Lipps SG, Crisa L, Salomon DR, Tsoukas CD. CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation. J Exp Med. 1996 Nov 1;184(5):2055–60.

67. Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. Immunol Res. 2014 May;58(2–3):179–85.

68. Deng J, Yeung VP, Tsitoura D, DeKruyff RH, Umetsu DT, Levy S. Allergen-induced airway hyperreactivity is diminished in CD81-deficient mice. J Immunol Baltim Md 1950. 2000 Nov 1;165(9):5054–61.

69. Tachibana I, Hemler ME. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube maintenance. J Cell Biol. 1999 Aug 23;146(4):893–904.

70. Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. Science. 1998 Oct 30;282(5390):938–41.

71. Dempsey PW, Allison ME, Akkaraju S, Goodnow CC, Fearon DT. C3d of complement as a molecular adjuvant: bridging innate and acquired immunity. Science. 1996 Jan 19;271(5247):348–50.

72. Maecker HT, Levy S. Normal lymphocyte development but delayed humoral immune response in CD81-null mice. J Exp Med. 1997 Apr 21;185(8):1505–10.

73. Schick MR, Nguyen VQ, Levy S. Anti-TAPA-1 antibodies induce protein tyrosine phosphorylation that is prevented by increasing intracellular thiol levels. J Immunol Baltim Md 1950. 1993 Aug 15;151(4):1918–25.

74. Schick MR, Levy S. The TAPA-1 molecule is associated on the surface of B cells with HLA-DR molecules. J Immunol Baltim Md 1950. 1993 Oct 15;151(8):4090–7.

75. Hoorn T van den, Paul P, Janssen L, Janssen H, Neefjes J. Dynamics within tetraspanin pairs affect MHC class II expression. J Cell Sci. 2012 Jan 15;125(Pt 2):328–39.

76. Sagi Y, Landrigan A, Levy R, Levy S. Complementary costimulation of human T-cell subpopulations by cluster of differentiation 28 (CD28) and CD81. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012 Jan 31;109(5):1613–8.

77. Crotta S, Ronconi V, Ulivieri C, Baldari CT, Valiante NM, Valiente NM, et al. Cytoskeleton rearrangement induced by tetraspanin engagement modulates the activation of T and NK cells. Eur J Immunol. 2006 Apr;36(4):919–29.

78. Fournier M, Peyrou M, Bourgoin L, Maeder C, Tchou I, Foti M. CD4 dimerization requires two cysteines in the cytoplasmic domain of the molecule and occurs in microdomains distinct from lipid rafts. Mol Immunol. 2010 Oct;47(16):2594–603.

79. Clark KL, Oelke A, Johnson ME, Eilert KD, Simpson PC, Todd SC. CD81 associates with 14-3-3 in a redox-regulated palmitoylation-dependent manner. J Biol Chem. 2004 May 7;279(19):19401–6.

80. Mittelbrunn M, Yáñez-Mó M, Sancho D, Ursa A, Sánchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. J Immunol Baltim Md 1950. 2002 Dec 15;169(12):6691–5.

81. Engel P, Tedder TF. New CD from the B cell section of the Fifth International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens. Leuk Lymphoma. 1994;13 Suppl 1:61–4.

82. Tsuji K, Feng MA, Wang D. Development of human lymphohematopoiesis defined by CD34 and CD81 expression. Leuk Lymphoma. 2002 Dec;43(12):2269–73.

83. Venezia TA, Merchant AA, Ramos CA, Whitehouse NL, Young AS, Shaw CA, et al. Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. PLoS Biol. 2004 Oct;2(10):e301.

84. Lin KK, Rossi L, Boles NC, Hall BE, George TC, Goodell MA. CD81 is essential for the re-entry of hematopoietic stem cells to quiescence following stress-induced proliferation via deactivation of the Akt pathway. PLoS Biol. 2011 Sep;9(9):e1001148.

85. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer. 2006 Nov 1;107(9):2099–107.

86. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Neyman N, Aminou R, Waldron W, Altekruse SF, Kosary CL, Ruhl J, Tatalovich Z, Cho H, Mariotto A, Eisner MP, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2009 (Vintage 2009 Populations), National Cancer Institute. Bethesda, MD http://seer.cancer.gov/csr/1975_2009_pops09/, based on November 2011 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2012.

87. Sant M, Allemani C, Tereanu C, De Angelis R, Capocaccia R, Visser O, et al. Incidence of hematologic malignancies in Europe by morphologic subtype: results of the HAEMACARE project. Blood. 2010 Nov 11;116(19):3724–34.

88. Coleman MP, Gatta G, Verdecchia A, Estève J, Sant M, Storm H, et al. EUROCARE-3 summary: cancer survival in Europe at the end of the 20th century. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2003;14 Suppl 5:v128-149.

89. Thomas X, Chelghoum Y. Cigarette smoking and acute leukemia. Leuk Lymphoma. 2004 Jun;45(6):1103–9.

90. Hahn CN, Chong C-E, Carmichael CL, Wilkins EJ, Brautigan PJ, Li X-C, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. Nat Genet. 2011 Sep 4;43(10):1012–7.

91. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. Blood. 2009 Jul 30;114(5):937–51.

92. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. Br J Haematol. 1976 Aug;33(4):451–8.

93. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, 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. 1995 Oct;9(10):1783–6.

94. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. Blood. 2016 May 19;127(20):2391–405.

95. Bloomfield CD, Brunning RD. The revised French-American-British classification of acute myeloid leukemia: is new better? Ann Intern Med. 1985 Oct;103(4):614–6.

96. Mertelsmann R, Engelhardt M, Berger DP. Précis d'hématologie et d'oncologie [Internet]. Paris: Springer; 2011 [cited 2016 Jul 17]. Available from: http://site.ebrary.com/id/10494403

97. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2292–302.

98. Liersch R, Müller-Tidow C, Berdel WE, Krug U. Prognostic factors for acute myeloid leukaemia in adults--biological significance and clinical use. Br J Haematol. 2014 Apr;165(1):17–38.

99. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Möllgård L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. Blood. 2009 Apr 30;113(18):4179–87.

100. Creutzig U, Büchner T, Sauerland MC, Zimmermann M, Reinhardt D, Döhner H, et al. Significance of age in acute myeloid leukemia patients younger than 30 years: a common analysis of the pediatric trials AML-BFM 93/98 and the adult trials AMLCG 92/99 and AMLSG HD93/98A. Cancer. 2008 Feb 1;112(3):562–71.

101. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. Blood. 2006 May 1;107(9):3481–5.

102. Keating MJ, Smith TL, Gehan EA, McCredie KB, Bodey GP, Spitzer G, et al. Factors related to length of complete remission in adult acute leukemia. Cancer. 1980 Apr 15;45(8):2017–29.

103. Tsimberidou A-M, Kantarjian HM, Wen S, O'Brien S, Cortes J, Wierda WG, et al. The prognostic significance of serum beta2 microglobulin levels in acute myeloid leukemia and prognostic scores predicting survival: analysis of 1,180 patients. Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res. 2008 Feb 1;14(3):721–30.

104. Chen C-C, Yang C-F, Yang M-H, Lee K-D, Kwang W-K, You J-Y, et al. Pretreatment prognostic factors and treatment outcome in elderly patients with de novo acute myeloid leukemia. Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO. 2005 Aug;16(8):1366–73.

105. Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. Cancer Genet Cytogenet. 1984 Mar;11(3):332–50.

106. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). Blood. 2002 Dec 15;100(13):4325–36.

107. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. Blood. 2010 Jul 22;116(3):354–65.

108. Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2008 Oct 10;26(29):4791–7.

109. Burnett AK, Hills RK, Hunter AE, Milligan D, Kell WJ, Wheatley K, et al. The addition of gemtuzumab ozogamicin to low-dose Ara-C improves remission rate but does not significantly prolong survival in older patients with acute myeloid leukaemia: results from the LRF AML14 and NCRI AML16 pick-a-winner comparison. Leukemia. 2013 Jan;27(1):75–81.

110. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2008 May 1;358(18):1909–18.

111. Boissel N, Leroy H, Brethon B, Philippe N, de Botton S, Auvrignon A, et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). Leukemia. 2006 Jun;20(6):965–70.

112. Paschka P, Du J, Schlenk RF, Gaidzik VI, Bullinger L, Corbacioglu A, et al. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv(16) or t(16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). Blood. 2013 Jan 3;121(1):170–7.

113. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. Blood. 2001 Sep 15;98(6):1752–9.

114. Gale RE, Green C, Allen C, Mead AJ, Burnett AK, Hills RK, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. Blood. 2008 Mar 1;111(5):2776–84.

115. de Jonge HJM, Valk PJM, de Bont ESJM, Schuringa JJ, Ossenkoppele G, Vellenga E, et al. Prognostic impact of white blood cell count in intermediate risk acute myeloid leukemia: relevance of mutated NPM1 and FLT3-ITD. Haematologica. 2011 Sep;96(9):1310–7.

116. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, Ribera JM, Tormo M, Duarte R, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy. Blood. 2013 Apr 4;121(14):2734–8.

117. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. Blood. 2009 Sep 17;114(12):2386–92.

118. Kusec R, Jaksic O, Ostojic S, Kardum-Skelin I, Vrhovac R, Jaksic B. More on prognostic significance of FLT3/ITD size in acute myeloid leukemia (AML). Blood. 2006 Jul 1;108(1):405–406; author reply 406.

119. Daver N, Liu Dumlao T, Ravandi F, Pierce S, Borthakur G, Pemmaraju N, et al. Effect of NPM1 and FLT3 mutations on the outcomes of elderly patients with acute myeloid leukemia receiving standard chemotherapy. Clin Lymphoma Myeloma Leuk. 2013 Aug;13(4):435–40.

120. Serve H, Krug U, Wagner R, Sauerland MC, Heinecke A, Brunnberg U, et al. Sorafenib in combination with intensive chemotherapy in elderly patients with acute myeloid leukemia: results from a randomized, placebo-controlled trial. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2013 Sep 1;31(25):3110–8.

121. Whitman SP, Maharry K, Radmacher MD, Becker H, Mrózek K, Margeson D, et al. FLT3 internal tandem duplication associates with adverse outcome and gene- and microRNA-expression signatures in patients 60 years of age or older with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. Blood. 2010 Nov 4;116(18):3622–6.

122. Bacher U, Haferlach C, Kern W, Haferlach T, Schnittger S. Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters--an analysis of 3082 patients. Blood. 2008 Mar 1;111(5):2527–37.

123. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. N Engl J Med. 2005 Jan 20;352(3):254–66.

124. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. Blood. 2005 Dec 1;106(12):3740–6.

125. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrózek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Feb 1;28(4):596–604.

126. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). Blood. 2002 Oct 15;100(8):2717–23.

127. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. Blood. 2009 Mar 26;113(13):3088–91.

128. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Jun 1;28(16):2739–47.

129. Kayser S, Döhner K, Krauter J, Köhne C-H, Horst HA, Held G, et al. The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML. Blood. 2011 Feb 17;117(7):2137–45.

130. Thoennissen NH, Krug UO, Lee DHT, Kawamata N, Iwanski GB, Lasho T, et al. Prevalence and prognostic impact of allelic imbalances associated with leukemic transformation of Philadelphia chromosome-negative myeloproliferative neoplasms. Blood. 2010 Apr 8;115(14):2882–90.

131. van Dongen JJM, Lhermitte L, Böttcher S, Almeida J, van der Velden VHJ, Flores-Montero J, et al. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. Leukemia. 2012 Sep;26(9):1908–75.

132. Buccisano F, Maurillo L, Spagnoli A, Del Principe MI, Fraboni D, Panetta P, et al. Cytogenetic and molecular diagnostic characterization combined to postconsolidation minimal residual disease assessment by flow cytometry improves risk stratification in adult acute myeloid leukemia. Blood. 2010 Sep 30;116(13):2295–303.

133. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High prognostic impact of flow cytometric minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia: data from the HOVON/SAKK AML 42A study. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2013 Nov 1;31(31):3889–97.

134. Araki D, Wood BL, Othus M, Radich JP, Halpern AB, Zhou Y, et al. Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia: Time to Move Toward a Minimal Residual Disease-Based Definition of Complete Remission? J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2016 Feb 1;34(4):329–36.

135. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2012 Mar 22;366(12):1079–89.

136. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. Blood. 2013 Mar 21;121(12):2213–23.

137. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2011 Jul 1;29(19):2709–16.

138. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, Weiss T, Dicker F, Falini B, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. Blood. 2009 Sep 10;114(11):2220–31.

139. Papadaki C, Dufour A, Seibl M, Schneider S, Bohlander SK, Zellmeier E, et al. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia with NPM1 mutations by quantitative PCR: clonal evolution is a limiting factor. Br J Haematol. 2009 Feb;144(4):517–23.

140. Kottaridis PD, Gale RE, Langabeer SE, Frew ME, Bowen DT, Linch DC. Studies of FLT3 mutations in paired presentation and relapse samples from patients with acute myeloid leukemia: implications for the role of FLT3 mutations in leukemogenesis, minimal residual disease detection, and possible therapy with FLT3 inhibitors. Blood. 2002 Oct 1;100(7):2393–8.

141. Burnett AK, Hills RK, Milligan DW, Goldstone AH, Prentice AG, McMullin M-F, et al. Attempts to optimize induction and consolidation treatment in acute myeloid leukemia: results of the MRC AML12 trial. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2010 Feb 1;28(4):586–95.

142. Fernandez HF, Sun Z, Yao X, Litzow MR, Luger SM, Paietta EM, et al. Anthracycline dose intensification in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2009 Sep 24;361(13):1249–59.

143. Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, Thiede C, Paoloni F, Vignetti M, et al. Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2016 Jul 11;

144. Byrd JC, Dodge RK, Carroll A, Baer MR, Edwards C, Stamberg J, et al. Patients with t(8;21)(q22;q22) and acute myeloid leukemia have superior failure-free and overall

survival when repetitive cycles of high-dose cytarabine are administered. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 1999 Dec;17(12):3767–75.

145. Byrd JC, Ruppert AS, Mrózek K, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Repetitive cycles of high-dose cytarabine benefit patients with acute myeloid leukemia and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22): results from CALGB 8461. J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol. 2004 Mar 15;22(6):1087–94.

146. Koreth J, Schlenk R, Kopecky KJ, Honda S, Sierra J, Djulbegovic BJ, et al. Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials. JAMA. 2009 Jun 10;301(22):2349–61.

147. Löwenberg B, Ossenkoppele GJ, van Putten W, Schouten HC, Graux C, Ferrant A, et al. High-dose daunorubicin in older patients with acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2009 Sep 24;361(13):1235–48.

148. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie J-N, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. Lancet Lond Engl. 2012 Apr 21;379(9825):1508–16.

149. Barrena S, Almeida J, Yunta M, López A, Fernández-Mosteirín N, Giralt M, et al. Aberrant expression of tetraspanin molecules in B-cell chronic lymphoproliferative disorders and its correlation with normal B-cell maturation. Leukemia. 2005 Aug;19(8):1376–83.

150. Luo RF, Zhao S, Tibshirani R, Myklebust JH, Sanyal M, Fernandez R, et al. CD81 protein is expressed at high levels in normal germinal center B cells and in subtypes of human lymphomas. Hum Pathol. 2010 Feb;41(2):271–80.

151. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Böttcher S, Ghia P, Zehnder JL, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2007 May;21(5):956–64.

152. Robak T, Robak P. Anti-CD37 antibodies for chronic lymphocytic leukemia. Expert Opin Biol Ther. 2014 May;14(5):651–61.

153. Pagel JM, Spurgeon SE, Byrd JC, Awan FT, Flinn IW, Lanasa MC, et al. Otlertuzumab (TRU-016), an anti-CD37 monospecific ADAPTIR(™) therapeutic protein, for relapsed or refractory NHL patients. Br J Haematol. 2015 Jan;168(1):38–45.

154. de Winde CM, Veenbergen S, Young KH, Xu-Monette ZY, Wang X-X, Xia Y, et al. Tetraspanin CD37 protects against the development of B cell lymphoma. J Clin Invest. 2016 Feb;126(2):653–66.

155. Nishida H, Yamazaki H, Yamada T, Iwata S, Dang NH, Inukai T, et al. CD9 correlates with cancer stem cell potentials in human B-acute lymphoblastic leukemia cells. Biochem Biophys Res Commun. 2009 Apr 24;382(1):57–62.

156. Gandemer V, Aubry M, Roussel M, Rio A-G, de Tayrac M, Vallee A, et al. CD9 expression can be used to predict childhood TEL/AML1-positive acute lymphoblastic leukemia: proposal for an accelerated diagnostic flowchart. Leuk Res. 2010 Apr;34(4):430–7.

157. Arnaud M-P, Vallée A, Robert G, Bonneau J, Leroy C, Varin-Blank N, et al. CD9, a key actor in the dissemination of lymphoblastic leukemia, modulating CXCR4-mediated migration via RAC1 signaling. Blood. 2015 Oct 8;126(15):1802–12.

158. Yoon S-O, Zhang X, Freedman AS, Zahrieh D, Lossos IS, Li L, et al. Down-regulation of CD9 expression and its correlation to tumor progression in B lymphomas. Am J Pathol. 2010 Jul;177(1):377–86.

159. Herr MJ, Longhurst CM, Baker B, Homayouni R, Speich HE, Kotha J, et al. Tetraspanin CD9 modulates human lymphoma cellular proliferation via histone deacetylase activity. Biochem Biophys Res Commun. 2014 May 16;447(4):616–20.

160. Dong T, Liu Z, Zhao S, Hu C, Liu Y, Ma W, et al. The Expression of CD9 and PIK3CD is Associated with Prognosis of Follicular Lymphoma. J Cancer. 2015;6(12):1222–9.

161. Tohami T, Drucker L, Shapiro H, Radnay J, Lishner M. Overexpression of tetraspanins affects multiple myeloma cell survival and invasive potential. FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol. 2007 Mar;21(3):691–9.

162. Paiva B, Paino T, Sayagues J-M, Garayoa M, San-Segundo L, Martín M, et al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. Blood. 2013 Nov 21;122(22):3591–8.

163. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. Leuk Res. 2014 Mar;38(3):371–6.

164. Paiva B, Gutiérrez N-C, Chen X, Vídriales M-B, Montalbán M-Á, Rosiñol L, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. Leukemia. 2012 Aug;26(8):1862–9.

165. Mateo G, Montalban MA, Vidriales M-B, Lahuerta JJ, Mateos MV, Gutierrez N, et al. Prognostic Value of Immunophenotyping in Multiple Myeloma: A Study by the PETHEMA/GEM Cooperative Study Groups on Patients Uniformly Treated With High-Dose Therapy. J Clin Oncol. 2008 Jun 1;26(16):2737–44.

166. Paiva B, Puig N, Cedena M-T, de Jong BG, Ruiz Y, Rapado I, et al. Differentiation stage of myeloma plasma cells: biological and clinical significance. Leukemia. 2016 Aug 1;

167. Burchert A, Notter M, Dietrich Menssen H, Schwartz S, Knauf W, Neubauer A, et al. CD82 (KAI1), a member of the tetraspan family, is expressed on early haemopoietic progenitor cells and up-regulated in distinct human leukaemias. Br J Haematol. 1999 Dec;107(3):494–504.

168. Termini CM, Lidke KA, Gillette JM. Tetraspanin CD82 Regulates the Spatiotemporal Dynamics of PKCα in Acute Myeloid Leukemia. Sci Rep. 2016;6:29859.

169. Nishioka C, Ikezoe T, Takeuchi A, Nobumoto A, Tsuda M, Yokoyama A. The novel function of CD82 and its impact on BCL2L12 via AKT/STAT5 signal pathway in acute myelogenous leukemia cells. Leukemia. 2015 Dec;29(12):2296–306.

170. Nishioka C, Ikezoe T, Yang J, Yokoyama A. Tetraspanin Family Member, CD82, Regulates Expression of EZH2 via Inactivation of p38 MAPK Signaling in Leukemia Cells. PloS One. 2015;10(5):e0125017.

171. Marjon KD, Termini CM, Karlen KL, Saito-Reis C, Soria CE, Lidke KA, et al. Tetraspanin CD82 regulates bone marrow homing of acute myeloid leukemia by modulating the molecular organization of N-cadherin. Oncogene. 2016 Aug 4;35(31):4132–40.

172. Kwon HY, Bajaj J, Ito T, Blevins A, Konuma T, Weeks J, et al. Tetraspanin 3 Is Required for the Development and Propagation of Acute Myelogenous Leukemia. Cell Stem Cell. 2015 Aug 6;17(2):152–64.

173. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. Nat Rev Cancer. 2014 Jan;14(1):49–60.

174. Vences-Catalán F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo C-C, Levy R, et al. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 2015 Nov 1;75(21):4517–26.

175. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood. 1998 Oct 1;92(7):2322–33.

176. Maecker HT, McCoy JP, Nussenblatt R. Standardizing immunophenotyping for the Human Immunology Project. Nat Rev Immunol. 2012 Mar;12(3):191–200.

177. Virgo PF, Gibbs GJ. Flow cytometry in clinical pathology. Ann Clin Biochem. 2012 Jan;49(Pt 1):17–28.

178. Cunningham RE. Flow Cytometry. In: Rapley R, Walker JM, editors. Molecular Biomethods Handbook [Internet]. Totowa, NJ: Humana Press; 1998 [cited 2016 Jul 26]. p. 653–67. Available from: http://link.springer.com/10.1007/978-1-59259-642-3_49

179. Tse C, Capeau J. [Real time PCR methodology for quantification of nucleic acids]. Ann Biol Clin (Paris). 2003 Jun;61(3):279–93.

180. Feller N, Kelder A, Westra G, Ossenkoppele GJ, Schuurhuis GJ. Positive selection for CD90 as a purging option in acute myeloid leukemia stem cell transplants. Cytometry B Clin Cytom. 2008 Jan;74(1):9–16.

181. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015 Sep 17;373(12):1136–52.

182. Burnett AK. Treatment of acute myeloid leukemia: are we making progress? Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program. 2012;2012:1–6.

183. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2016 Jun 9;374(23):2209–21.

184. Jaroslav P, Martina H, Jirí S, Hana K, Petr S, Tomás K, et al. Expression of cyclins D1, D2, and D3 and Ki-67 in Leukemia. Leuk Lymphoma. 2005 Nov;46(11):1605–12.

185. Mazzocca A, Liotta F, Carloni V. Tetraspanin CD81-regulated cell motility plays a critical role in intrahepatic metastasis of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2008 Jul;135(1):244–256.e1.

186. Zhang XA, Bontrager AL, Hemler ME. Transmembrane-4 superfamily proteins associate with activated protein kinase C (PKC) and link PKC to specific beta(1) integrins. J Biol Chem. 2001 Jul 6;276(27):25005–13.

187. Tejera E, Rocha-Perugini V, López-Martín S, Pérez-Hernández D, Bachir AI, Horwitz AR, et al. CD81 regulates cell migration through its association with Rac GTPase. Mol Biol Cell. 2013 Feb;24(3):261–73.

188. Martínez del Hoyo G, Ramírez-Huesca M, Levy S, Boucheix C, Rubinstein E, Minguito de la Escalera M, et al. CD81 controls immunity to Listeria infection through rac-dependent inhibition of proinflammatory mediator release and activation of cytotoxic T cells. J Immunol Baltim Md 1950. 2015 Jun 15;194(12):6090–101.

189. Lindqvist CM, Nordlund J, Ekman D, Johansson A, Moghadam BT, Raine A, et al. The mutational landscape in pediatric acute lymphoblastic leukemia deciphered by whole genome sequencing. Hum Mutat. 2015 Jan;36(1):118–28.

190. Henrich K-O, Schwab M, Westermann F. 1p36 tumor suppression--a matter of dosage? Cancer Res. 2012 Dec 1;72(23):6079–88.

191. Jaju RJ, Fidler C, Haas OA, Strickson AJ, Watkins F, Clark K, et al. A novel gene, NSD1, is fused to NUP98 in the t(5;11)(q35;p15.5) in de novo childhood acute myeloid leukemia. Blood. 2001 Aug 15;98(4):1264–7.

192. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. Blood. 2011 Sep 29;118(13):3645–56.

193. McNerney ME, Brown CD, Wang X, Bartom ET, Karmakar S, Bandlamudi C, et al. CUX1 is a haploinsufficient tumor suppressor gene on chromosome 7 frequently inactivated in acute myeloid leukemia. Blood. 2013 Feb 7;121(6):975–83.

194. Au-Yeung N, Mandhana R, Horvath CM. Transcriptional regulation by STAT1 and STAT2 in the interferon JAK-STAT pathway. JAK-STAT. 2013 Jul 1;2(3):e23931.

195. Heuser M, Sly LM, Argiropoulos B, Kuchenbauer F, Lai C, Weng A, et al. Modeling the functional heterogeneity of leukemia stem cells: role of STAT5 in leukemia stem cell self-renewal. Blood. 2009 Nov 5;114(19):3983–93.

196. Jiang L-J, Zhang N-N, Ding F, Li X-Y, Chen L, Zhang H-X, et al. RA-inducible gene-I induction augments STAT1 activation to inhibit leukemia cell proliferation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2011 Feb 1;108(5):1897–902.

197. Malin S, McManus S, Busslinger M. STAT5 in B cell development and leukemia. Curr Opin Immunol. 2010 Apr;22(2):168–76.

198. Bruserud Ø, Nepstad I, Hauge M, Hatfield KJ, Reikvam H. STAT3 as a possible therapeutic target in human malignancies: lessons from acute myeloid leukemia. Expert Rev Hematol. 2015 Feb;8(1):29–41.

199. Palumbo GA, Parrinello N, Fargione G, Cardillo K, Chiarenza A, Berretta S, et al. CD200 expression may help in differential diagnosis between mantle cell lymphoma and B-cell chronic lymphocytic leukemia. Leuk Res. 2009 Sep;33(9):1212–6.

200. Gerber JM, Zeidner JF, Morse S, Blackford AL, Perkins B, Yanagisawa B, et al. Association of acute myeloid leukemia's most immature phenotype with risk groups and outcomes. Haematologica. 2016 May;101(5):607–16.

201. Buccisano F, Rossi FM, Venditti A, Del Poeta G, Cox MC, Abbruzzese E, et al. CD90/Thy-1 is preferentially expressed on blast cells of high risk acute myeloid leukaemias. Br J Haematol. 2004 Apr;125(2):203–12.

202. Kersten B, Valkering M, Wouters R, van Amerongen R, Hanekamp D, Kwidama Z, et al. CD45RA, a specific marker for leukaemia stem cell sub-populations in acute myeloid leukaemia. Br J Haematol. 2016 Apr;173(2):219–35.

ANNEXE

Article publié dans *Oncotarget*

Tetraspanin CD81 is an adverse prognostic marker in acute myeloid leukemia

Thomas Boyer[1,2,], Soizic Guihard[2,], Christophe Roumier[1], Pauline Peyrouze[2], Fanny Gonzales[2], Céline Berthon[2,3], Bruno Quesnel[2,3], Claude Preudhomme[1,2], Hélène Behal[5], Alain Duhamel[5], Catherine Roche-Lestienne[2,4], Meyling Cheok[2]

[1] Hematology laboratory, Biology and Pathology Center, CHRU Lille

[2]Jean-Pierre AUBERT Research Center, UMR-S1172, Lille

[3] Department of Hematology, Claude Huriez hospital, CHRU Lille

[4] Institute of Medical Genetics, Jeanne de Flandre hospital, CHRU Lille

[5]Department of biostatistics, Univ. Lille, CHU Lille, EA 2694 - Santé publique: épidémiologie et qualité des soins, F-59000 Lille, France

Word counts: 2261 (abstract: 166, main text: 2095); 3 figures, 2 tables, 20 references

Key words: acute myeloid leukemia, prognosis, CD81, tetraspanin, flow cytometry

Corresponding Author:

Meyling Cheok, MS Pharm, PhD

Institute for Cancer Research in Lille, INSERM UMR-S1172,

Department of Hematology, Lille University Hospital

1, Place de Verdun, 59045 LILLE cedex, FRANCE

Phone: +33 (0)3 20 16 92 20, Fax: +33 (0)3 20 16 92 29

e-mail: meyling.cheok@inserm.fr

Abstract

CD81 is a cell surface protein which belongs to the tetraspanin family. While in multiple myeloma its expression on plasma cells is associated with worse prognosis, this has not yet been explored in acute myeloid leukemia (AML). We measured membrane expression of CD81 on AML cells at diagnosis, evaluated its association with AML characteristics and its influence on patient outcome after intensive chemotherapy in a cohort of 134 patients. CD81 was detected in 92/134 (69%) patients. Patients with AML expressing CD81 had elevated leukocyte count (P=0.02) and were more likely classified as intermediate or adverse-risk by cytogenetics (P<0.001). CD81 expression had a negative impact on survival (event-free survival, overall survival and relapse-free survival) in univariate (P<0.001) and in multivariate analyses (P=0.001, 0.003 and <0.001, respectively). CD81 has a negative impact on OS in patients with *NPM1* mutation (P=0.01) and in patients ELN-favorable (P=0.002). In conclusion, this cell surface marker may be a new prognostic marker for diagnostic risk classification and a potential therapeutic target for drug development in AML.

Introduction

CD81 antigen belongs to the tetraspanin family (33 members in mammals), which are cell surface transmembrane proteins. This antigen was originally discovered as a target of an antiproliferative antibody and subsequently named TAPA-1 [1]. It associates with other proteins in dynamic membrane entities called tetraspanin-enriched microdomains (TEMs) and partners may vary according to cell type (e.g., CD19 in B cells) [2]. Various cellular functions are linked to CD81 (i.e., BCR signaling in B cells [3], B-T cell interaction [4] and cell entry receptor function for different infectious diseases [5]). Furthermore, recent studies showed that tetraspanins are implicated at several stages of carcinogenesis as well as in metastasis and angiogenesis [6]. Interestingly, Vences-Catalàn and colleagues have demonstrated a dominant role of CD81 affecting metastasis and immunomodulation in cancer [7]. Targeting of CD81 may decrease fusion of metastatic colon carcinoma cells and may improve sensitivity to chemotherapeutic agents [8]. Specifically, CD81 may be important in hematopoiesis as it allows hematopoietic stem cells to re-enter to quiescence [9]. In hematologic malignancies, CD81 has mostly been studied in multiple myeloma where its expression on plasma cells is associated with worse progression free survival (PFS) and overall survival (OS) [10]. Yet, the prognostic value of CD81 has not been addressed in myeloid malignancies, such as AML.

AML is a leading cause of leukemia-related mortality, characterized by maturation arrest and subsequent accumulation of blast cells at various stages of incomplete differentiation, and by reduced production of healthy hematopoietic elements [11]. Importantly, AML is a heterogeneous disease at both the phenotypic and molecular level with a variety of distinct genetic alterations giving rise to the disease. Currently, the combination of three days of daunorubicin and seven days of cytarabine is still accepted as the cornerstone of induction

treatment allowing complete remission in younger patients in 70-80% of the cases [12]. Nevertheless, relapse still occurs in approximately half of the patients diagnosed with AML and the 5-year overall survival rate is only about 40% [11].

Over the past few years, identification of new prognostic remains important; especially those potentially refining therapeutic options. The development of prognostic markers is particularly important in AML with normal cytogenetics (CN AML) and currently, three molecular markers (*NPM1*- and *CEBPA* mutations and *FLT3* internal tandem duplication (*FLT3-ITD*)) are used in clinical practice [13]. Prognostic value of CD81 expression in multiple myeloma and its use as a marker in minimal residual disease (MRD) in chronic lymphocytic leukemia (CLL) are well established [14]. In this study, we analyzed the association of CD81 with other biological factors and its effects on patient outcomes.

Results

CD81 cell surface expression on normal and AML blast cells

CD81 is homogenously expressed on physiologic myeloblasts in normal bone marrows (BM) (32%; range=21 to 42%; n=11; Figure 1A). In contrast, expression of CD81 on AML blasts is more heterogeneous (range=0.1 to 100%, n=134) and significantly higher (47%; P<0.001; Figure 1B). Interestingly, we observed two types of AML firstly, 43% of AML with high CD81 expression (more than 50% of blasts, Figure 2A) and secondly, 31% of AML had no CD81 expression commonly defined as less than 20% of blasts [15] (Figure 2B). While all physiologic myeloblasts showed intermediate CD81 expression, only 25% of AML were found in that range (Figure 2C).

Association of CD81 with prognostic factors in AML

A total of 134 patients were included in our study with ages ranging from 18 to 78 years. We compared patient characteristics between AML blasts positive vs. negative for CD81 expression (Table 1). Expression of CD81 was found in the majority of AML (92 of 134, 69%), but no CD81 expression was associated with favorable characteristics (i.e., younger age, lower WBC and favorable cytogenetics). In contrast, positive CD81 expression was associated with FAB types M1 and M5 and unfavorable cytogenetics (Table 1). No difference was found for sex, hemoglobin level, platelet count, *FLT3-ITD* and *NPM1* mutational status. CD81 positive AML tended to include more AML with *FLT3-ITD* mutation (P=0.06). Patients with AML with CD81 positive blast cells were of higher age, had higher white blood cell counts (WBC) at diagnosis (P=0.02) and were more likely to have AML with intermediate or adverse-risk cytogenetics (P<0.001).

Relevance of CD81 as a prognostic marker in AML

At the time of analysis, we counted 40 uncensored deaths and median overall survival was 3.5 years. As expected, unfavorable cytogenetics was associated with poorer OS (hazard ratio [HR]=2.75, 95% confidence interval [CI]=1.48-5.09, P=0.006). *NPM1* mutations were significantly associated with better survival (HR=0.61, 95%CI=0.31-1.20, P=0.03) and *FLT3-ITD* mutation showed no impact on OS (P=0.40).

CD81 expression on blast cells negatively affected EFS, OS and RFS (P<0.001). Multivariate analysis validated the worse prognosis of AML with CD81 expression on EFS, OS and RFS (Table 2).

CD81 expression on physiologic myeloblasts in normal BM did not exceed 40% (Figure 1B). Furthermore, CD81 expression on AML blast cells showed a bimodal distribution with a mean of 47%. Thus, we determined three groups of patients based upon CD81 expression on blast cells: $CD81^{-}$ (<20%, n=42), $CD81^{+}$ (20 to 50%, n=34) and $CD81^{++}$ (>50%, n=59). A worse survival was associated with a higher expression of CD81 considering OS, EFS and RFS (P<0.001) compared to those CD81-low (Figure 3).

Interestingly, among the *NPM1* mutated patients, blasts CD81 greater than 20% showed significant inferior OS (P=0.01, Figure 4A) but had no impact on EFS (P=0.24) or RFS (P=0.22). Considering ELN risk categories, subset analyses revealed a significant prognosis impact of CD81 expression for OS in ELN-favorable patients (P=0.002, Figure 4B) whereas no impact was found in other categories.

Discussion

AML is a very heterogeneous disease and prognostic factors have become increasingly important in order to propose appropriate therapy. Currently, cytogenetic analysis is most important for AML risk classification [11] and, according to standard recommendations three risk groups are defined: favorable, intermediate and adverse [16]. In CN AML, prognostic tools are particularly relevant and subgroups have been defined, based on the mutational status of genes such as *FLT3-ITD*, *NPM1*, *CEBPA*, *IDH 1/2*, *ASXL1* or *TET2* [17]. Nevertheless, new prognostic factors are needed to better discriminate patients with AML. In this study, we evaluated the prognostic impact of CD81 expression in a cohort of 134 adult patients treated with intensive chemotherapy for AML. We found an expression of CD81 in 69% of all AML cases and with a higher frequency in AML with *FLT3-ITD* mutation (p=0.06). Expression of CD81 was associated with a worse clinical outcome as it negatively affected survival (EFS, OS and RFS) in univariate and multivariate analyses. Furthermore, this negative impact is even stronger with high CD81 expressing blast cells.

In multiple myeloma, detection of CD81 positive plasma cells was an independent negative prognostic factor for PFS and OS [10]. This study by Paiva et al investigated CD81 expression by MFC in 230 patients with plasma cell myeloma (PCM) and found a positive expression in 45% of the patients. The adverse impact of CD81 was then validated in an additional 325 transplant-candidate PCM patients. Moreover, dim or negative CD81 expression was only observed in abnormal plasma cells [18]. In another study, circulating plasma cells showed significant down-regulation of integrins and activating molecules including CD81; this finding suggests a potential role in plasma cell homing for CD81 [10].

AML with more than 20% of CD81 positive blast cells showed a significant adverse prognosis for EFS, OS and RFS. In our study, patients with more than 20% positive CD81 blasts were

older, had higher white blood count and showed an association with intermediate and adverse-risk cytogenetics compared with patients with less than 20% CD81 blasts. In ELN-favorable group, a percentage of CD81 over 20% had a significant negative impact on OS (P=0.002): this data is particularly interesting as it allows discriminating patients in this low-risk group. Further studies will be needed to determine whether this subgroup of patients with AML will benefit from dose-intensified chemotherapy.

CD81 definitely exerts a negative impact on survival outcome in AML patients. Nevertheless, the mechanisms by which CD81 induces poor prognosis in AML are yet unknown. However, as we did not find any difference between patients with $CD81^+$ vs. $CD81^-$ AML in achieving complete remission (CR) after remission induction therapy, the mechanism is less likely to be chemotherapy resistance induced by CD81 expression on leukemic blasts. Though, we did note a trend for higher CD81 expression in AML of patients who did not achieve CR A larger cohort of patients is necessary to prove significance of CD81 expression on relapse within subgroups of AML. Furthermore, patients with CD81 positive expression presented with higher WBC at diagnosis, which may be explained by a defect in blast cell homing. Therefore, the role of CD81 in blast cell homing needs to be determined in AML, similarly this effect has been described in multiple myeloma. CD81 is physiologically implicated in the re-entry of hematopoietic stem cells into the quiescent state in order to control self renewal after induced proliferation. In leukemic blasts however, any alteration of this function may influence tumor dormancy and treatment outcome in patients with AML with different levels of CD81 expression.

Finally, our study provided the rational for novel therapeutic approaches targeting CD81 to be considered. Accordingly, anti-CD81 have demonstrated in vivo efficacy in HCV [19] and

Plasmodium falciparum [20] infections. Future independent studies are needed to confirm prognostic impact of CD81 in AML.

Materials and Methods

Patients

One hundred and thirty four patients with AML treated by intensive chemotherapy were included in this study. All patients were treated in the department of hematology of Lille hospital. Signed informed consent was obtained from each patient in accordance with the declaration of Helsinki. Cytogenetic risk was determined according to standard criteria [21]. Complete remission (CR) criteria were defined in agreement with the European Leukemia Net recommendation [13].

Multiparameter Flow Cytometry (MFC)

Diagnostic blast cells were obtained from fresh or thawed cryopreserved BM aspirates after red blood cell lysis. Of note, MFC results were not different between fresh and frozen BM cells done for five patients (data not shown). Each sample was washed twice with phosphate buffered saline and stained separately for 30 min at room temperature with two antibody panels. The first antibody panel contained: anti-CD36-FITC (clone FA6-152, Iotest, Beckman Coulter Inc., Brea, CA, USA), anti-CD81-PE (clone JS24, Beckman Coulter), anti-CD33-PC5.5 (clone D3HL60.251, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD123-PC7 (clone SSDCLY107D2, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD34-AA700 (clone 581, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD38-PB (clone LS198-4-3, Iotest, Beckman Coulter), and anti- CD45-KO (clone J.33, Iotest, Beckman Coulter).

The second antibody panel included: anti-CD7-FITC (clone 8H8.1, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD13-PE (clone SJ1D1, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD19-ECD (clone J3-119, Iotest,

Beckman Coulter), anti-CD33 PC5.5 (clone D3HL60.251, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD117-APC (clone 104D2D1, Iotest, Beckman Coulter), anti-CD34-AA700 (clone 581, Iotest, Beckman Coulter), anti-HLA-DR-PB (clone Immu-357, Iotest, Beckman Coulter), and anti-CD45-KO (clone J.33, Iotest, Beckman Coulter). A minimum of 5 x 10^5 events were acquired.

Blast cells were gated as $CD45^{dim}$, SSC^{low}, $CD33^{+}$ and lymphocytes ($CD45^{bright}$, SSC^{low}, $CD33^{-}$), monocytes ($CD45^{int/bright}$, SSC^{int}, $CD33^{bright}$) and mature myelomonocytic cells ($CD45^{int}$, SSC^{high}, $CD33^{dim/neg}$) were excluded.

Isotype control (clone 7T4-IF5, Iotest, Beckman Coulter) was used to better define the threshold of CD81 positive-stained cells. Results are reported as percent of positive blast cells. If more than 20% of the blast population is stained, the AML sample is considered CD81 positive [22].

Measurements were performed on a Navios flow cytometer and analyzed with Kaluza software (Beckman-Coulter). The cytometer settings were daily tested for optical alignment, fluidic stability, optical detector sensitivity and standardization using adapted fluorospheres (Flowset targets™ and Flowcheck™, Beckman-Coulter) [22].

Statistical analysis

The distribution of quantitative variables was verified graphically and by a Shapiro-Wilk test and the comparison between normal and AML BM sample on CD81 expression was tested using the Student t-test. Differences between patients with less than 20% of expression of CD81 and those with more than 20% of expression of CD81 on baseline quantitative variables were assessed by Student t- or Mann-Whitney U-test and qualitative variables were compared using Chi-square or Fisher Exact test.

Quantitative variables associated with either overall survival (OS), event-free survival (EFS) or relapse-free survival (RFS) were tested with the Cox model. For patients who underwent bone marrow transplantation, survival was censored at the date of transplantation, and for patients alive, survival was censored at the date of last known alive. The association between expression of CD81 and OS, EFS and RFS was adjusted by cytogenetic risk, age at diagnosis and *NPM1+/FLT3-ITD-* status. OS, EFS and RFS were described by the Kaplan Meier method stratified by expression of CD81 according to greater than or equal to 20%, commonly defined as the bottom detection limit [15] and greater than or equal to 50%, defined as CD81 over-expressing AML (i.e., top quartile).

All statistical tests were two-tailed and the significance level was set to 0.05. Statistical analysis was performed with SAS software version 9.3 (SAS Institute, Cary, NC, USA).

Acknowledgements

The authors thank all medical staff and patients participating in this study and Cécile Frimat for data management support.

Grant support

This work was supported by the Ligue Contre le Cancer (North Center), ARC foundation, SIRIC Oncolille, and French National Cancer Institute.

Figure Legends

Figure 1. CD81 expression on normal and AML blast cells

A. Normal bone marrow sample overlay of mean fluorescence intensity histograms of CD81 on blast cells. Isotype control is colored in black. **B**. Comparison of CD81 expression on blast cells between normal bone marrow samples (n=11) and diagnostic bone marrow from patients with de novo AML (n=134).

Figure 2. Primary AML have varying CD81 expression on blast cells

Representative examples of mean fluorescence intensity histograms of different types of AML according to CD81 expression: **A**. Example of high CD81 blast expression ($CD81^{++}$) **B.** Example of negative CD81 blast expression ($CD81^{-}$); **C**. intermediate CD81 blast expression ($CD81^{+}$). Isotype control corresponds to the red histogram.

Figure 3. High CD81 expression on blast cells predicts poor outcome in AML

Survival curves of **A.** OS, **B.** EFS, **C.** RFS stratified by CD81 expression measured in diagnostic bone marrow of AML patients. Shown is the survival of patients with AML either $CD81^{-}$ in green (less than 20%), $CD81^{+}$ in black (20 to 50%), or $CD81^{++}$ in red (greater than 50%). Numbers at risk at each year of follow-up are given. P-values based on logrank test.

Figure 4. Effect of CD81 expression on Overall Survival in favorable-risk patients

Curve shown in black illustrates overall survival of patients with $CD81^{-}$ AML (less than 20%), $CD81^{+}$ in red (greater than 20%) for **A.** ELN-favorable risk group and **B**. *NPM1* mutated patients. Numbers at risk at each year of follow-up are given. P-values based on logrank test.

Tables

Table 1 Patient characteristics

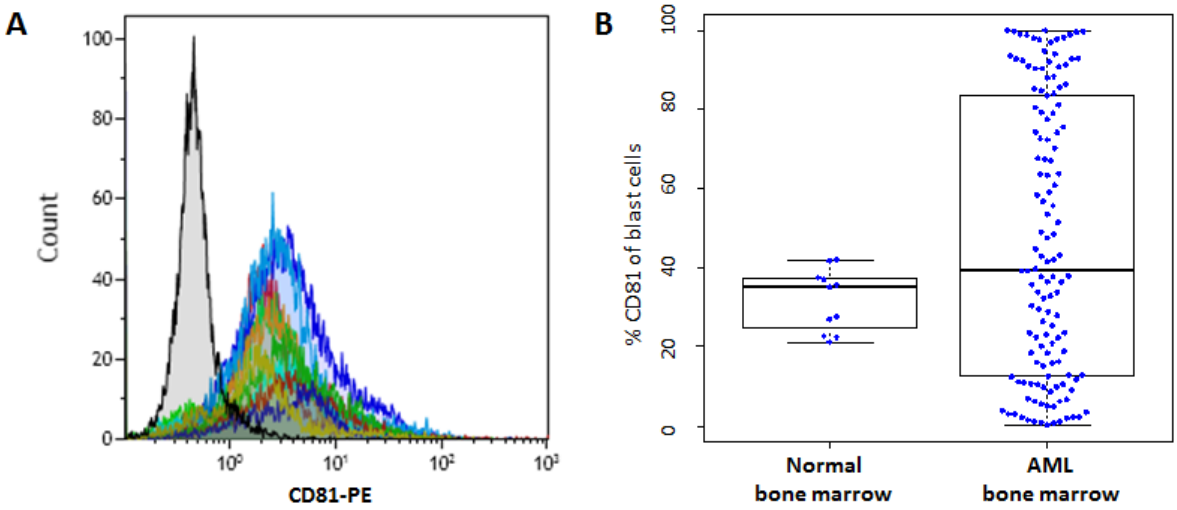
	All patients (n=134)	< 20% CD81$^-$ Blasts (n=42)	> 20% CD81$^+$ Blasts (n=92)	P-value
Gender [M/F]	79/56	24/18	54/38	0.83
Age [years]$^\$$	51.1±16.0	46.9±16.4	53.0±15.5	**0.04**
WBC [G/L]*	28 (1-325)	14 (2-198)	45(1-325)	**0.02**
FAB type				**<0.0001**
M0	3% (4/101)	3% (1/35)	4% (3/66)	
M1	22% (22/101)	14% (5/35)	26% (17/66)	
M2	28% (28/101)	49% (17/35)	17% (11/66)	
M4	26% (26/101)	31% (11/35)	23% (15/66)	
M5	19% (19/101)	3% (1/35)	27% (18/66)	
M6	2% (2/101)	0% (0/35)	3% (2/66)	
Hemoglobin level [g/dL]$^\$$	9.5±2.2	9.5±2.3	9.4±2.1	0.81
Platelet count [G/L]*	59 (7-864)	70 (12-864)	58 (7-670)	0.96
Cytogenetic risk, (n/N)				**<0.0001**
Favorable	11% (14/131)	28% (12/42)	2% (2/89)	
Intermediate	75% (98/131)	55% (23/42)	84% (75/89)	
Unfavorable	14% (19/131)	17% (7/42)	14% (12/89)	
FLT3-ITD, (n/N)	28% (36/129)	17% (7/41)	33% (29/88)	0.06
NPM1 mut, (n/N)	34% (43/125)	28% (10/36)	37% (33/89)	0.32

*median with range in parenthesis; $^\$$mean ± SD: standard deviation; WBC: white blood cell count; M: male; F: female; NA: not applicable

Table 2 Hazard ratio of CD81 adjusted on cytogenetic risk, age at diagnosis and *NPM1*+/*FLT3-ITD*- status

	HR (95% CI)	***p*-value**
EFS	3.45 (1.5-7.8)	**0.003**
OS	4.14 (1.69-10.14)	**0.002**
RFS	9.46 (2.66-33.71)	**0.0005**

Figure 1


A
Count
100
80
60
40
20
0
CD81-PE
B
% CD81 of blast cells
100
80
60
40
20
0
Normal
bone marrow
AML
bone marrow

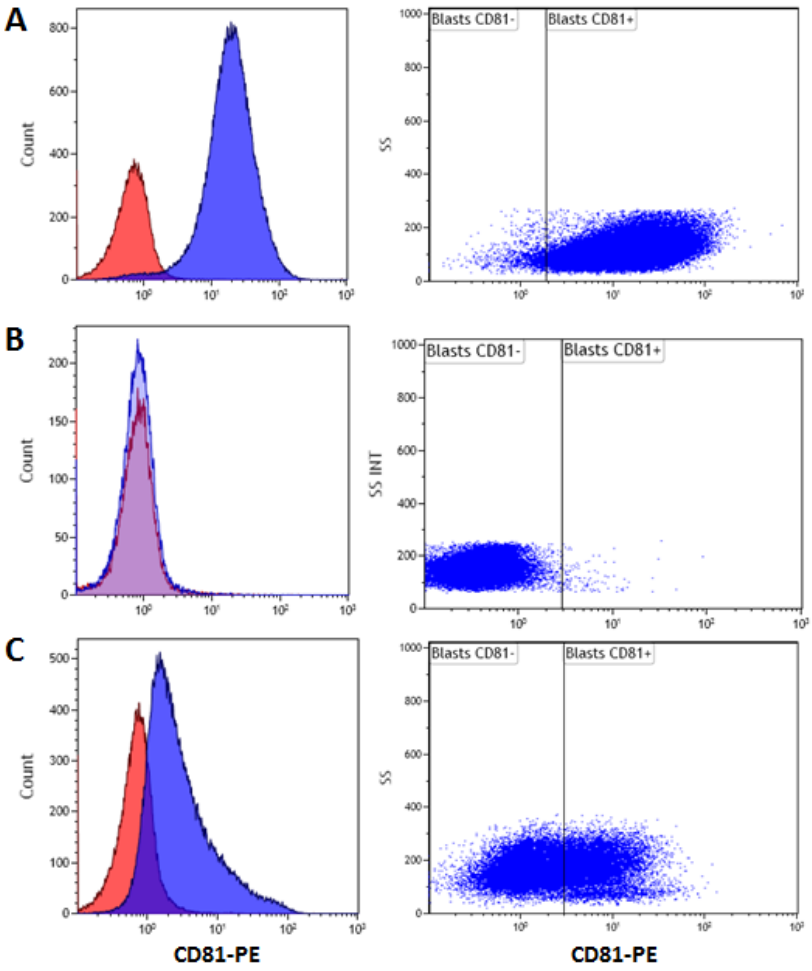


Figure 2

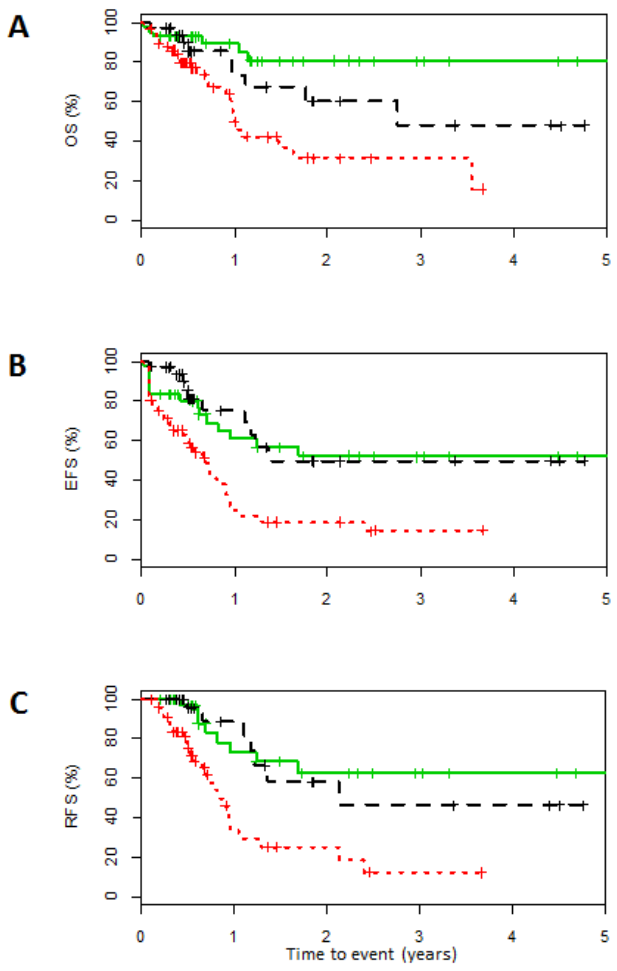

A
OS (%)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
B
EFS (%)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
C
RFS (%)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
Time to event (years)

Figure 3

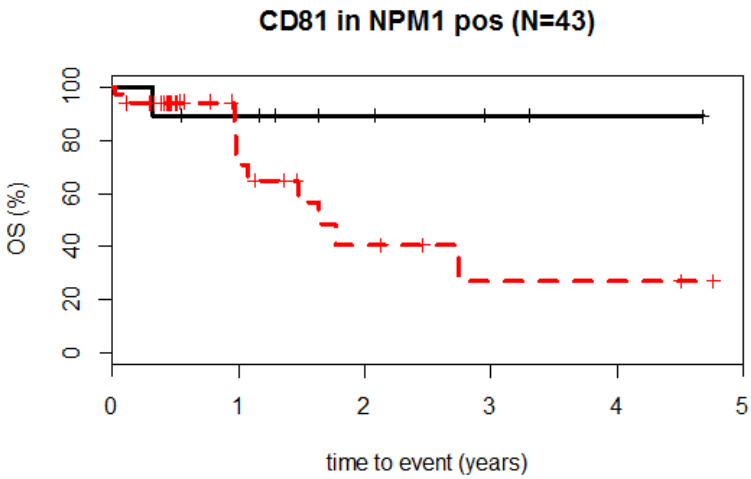
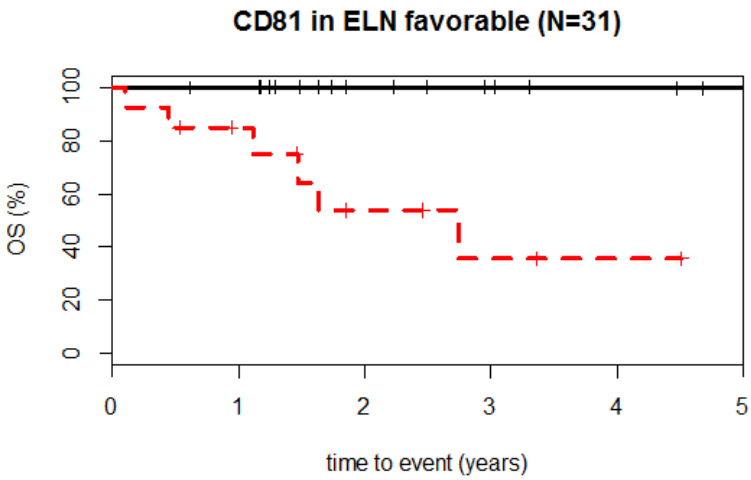

CD81 in NPM1 pos (N=43)
OS (%)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
time to event (years)

Figure 4


CD81 in ELN favorable (N=31)
OS (%)
0
20
40
60
80
100
0
1
2
3
4
5
time to event (years)

References:

1. Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R and Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. Mol Cell Biol. 1990; 10(8):4007-4015.

2. Levy S. Function of the tetraspanin molecule CD81 in B and T cells. Immunol Res. 2014; 58(2-3):179-185.

3. Mattila PK, Feest C, Depoil D, Treanor B, Montaner B, Otipoby KL, Carter R, Justement LB, Bruckbauer A and Batista FD. The actin and tetraspanin networks organize receptor nanoclusters to regulate B cell receptor-mediated signaling. Immunity. 2013; 38(3):461-474.

4. Mittelbrunn M, Yanez-Mo M, Sancho D, Ursa A and Sanchez-Madrid F. Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC. J Immunol. 2002; 169(12):6691-6695.

5. Charrin S, le Naour F, Silvie O, Milhiet PE, Boucheix C and Rubinstein E. Lateral organization of membrane proteins: tetraspanins spin their web. Biochem J. 2009; 420(2):133-154.

6. Hemler ME. Tetraspanin proteins promote multiple cancer stages. Nat Rev Cancer. 2014; 14(1):49-60.

7. Vences-Catalan F, Rajapaksa R, Srivastava MK, Marabelle A, Kuo CC, Levy R and Levy S. Tetraspanin CD81 promotes tumor growth and metastasis by modulating the functions of T regulatory and myeloid-derived suppressor cells. Cancer Res. 2015; 75(21):4517-4526.

8. Carloni V, Mazzocca A, Mello T, Galli A and Capaccioli S. Cell fusion promotes chemoresistance in metastatic colon carcinoma. Oncogene. 2013; 32(21):2649-2660.

9. Lin KK, Rossi L, Boles NC, Hall BE, George TC and Goodell MA. CD81 is essential for the re-entry of hematopoietic stem cells to quiescence following stress-induced proliferation via deactivation of the Akt pathway. PLoS Biol. 2011; 9(9):e1001148.

10. Paiva B, Gutierrez NC, Chen X, Vidriales MB, Montalban MA, Rosinol L, Oriol A, Martinez-Lopez J, Mateos MV, Lopez-Corral L, Diaz-Rodriguez E, Perez JJ, Fernandez-Redondo E, de Arriba F,

Palomera L, Bengoechea E, et al. Clinical significance of CD81 expression by clonal plasma cells in high-risk smoldering and symptomatic multiple myeloma patients. Leukemia. 2012; 26(8):1862-1869.

11. Deschler B and Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. Cancer. 2006; 107(9):2099-2107.

12. Dohner H, Weisdorf DJ and Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 2015; 373(12):1136-1152.

13. Dohner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Buchner T, Burnett AK, Dombret H, Fenaux P, Grimwade D, Larson RA, Lo-Coco F, Naoe T, Niederwieser D, Ossenkoppele GJ, Sanz MA, Sierra J, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. Blood. 2010; 115(3):453-474.

14. Rawstron AC, Villamor N, Ritgen M, Bottcher S, Ghia P, Zehnder JL, Lozanski G, Colomer D, Moreno C, Geuna M, Evans PA, Natkunam Y, Coutre SE, Avery ED, Rassenti LZ, Kipps TJ, et al. International standardized approach for flow cytometric residual disease monitoring in chronic lymphocytic leukaemia. Leukemia. 2007; 21(5):956-964.

15. Jaffe ES, Harris NL, Stein H and Vardiman JV. (2001). World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. International Agency for Research on Cancer, IARC Press, Lyon).

16. Patel JP, Gonen M, Figueroa ME, Fernandez H, Sun Z, Racevskis J, Van VP, Dolgalev I, Thomas S, Aminova O, Huberman K, Cheng J, Viale A, Socci ND, Heguy A, Cherry A, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. N Engl J Med. 2012; 366(12):1079-1089.

17. Tembhare PR, Yuan CM, Venzon D, Braylan R, Korde N, Manasanch E, Zuchlinsky D, Calvo K, Kurlander R, Bhutani M, Tageja N, Maric I, Mulquin M, Roschewski M, Kwok M, Liewehr D, et al. Flow cytometric differentiation of abnormal and normal plasma cells in the bone marrow in patients with multiple myeloma and its precursor diseases. Leuk Res. 2014; 38(3):371-376.

18. Paiva B, Paino T, Sayagues JM, Garayoa M, San-Segundo L, Martin M, Mota I, Sanchez ML, Barcena P, Aires-Mejia I, Corchete L, Jimenez C, Garcia-Sanz R, Gutierrez NC, Ocio EM, Mateos MV, et

al. Detailed characterization of multiple myeloma circulating tumor cells shows unique phenotypic, cytogenetic, functional, and circadian distribution profile. Blood. 2013; 122(22):3591-3598.

19. Ji C, Liu Y, Pamulapati C, Bohini S, Fertig G, Schraeml M, Rubas W, Brandt M, Ries S, Ma H and Klumpp K. Prevention of hepatitis C virus infection and spread in human liver chimeric mice by an anti-CD81 monoclonal antibody. Hepatology. 2015; 61(4):1136-1144.

20. Foquet L, Hermsen CC, Verhoye L, van Gemert GJ, Cortese R, Nicosia A, Sauerwein RW, Leroux-Roels G and Meuleman P. Anti-CD81 but not anti-SR-BI blocks Plasmodium falciparum liver infection in a humanized mouse model. J Antimicrob Chemother. 2015; 70(6):1784-1787.

21. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, Rees J, Hann I, Stevens R, Burnett A and Goldstone A. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. Blood. 1998; 92(7):2322-2333.

22. Guery T, Roumier C, Berthon C, Renneville A, Preudhomme C and Quesnel B. B7-H3 protein expression in acute myeloid leukemia. Cancer Med. 2015; 4(12):1879-1883.