

UNIVERSITE DE LIMOGES

Faculté de Médecine

ANNÉE 2013

THÈSE N°

**Impact de l'expression du CD33 sur la réponse au  
gemtuzumab ozogamicin  
dans les leucémies aiguës myéloïdes**

**Nouveau protocole de cytométrie en flux pour une détermination standardisée  
de l'expression du CD33 dans les leucémies aiguës myéloïdes**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 1<sup>er</sup> Juillet 2013

par Guillaume OLOMBEL

né le 28 Janvier 1983, à CASTRES (81)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur (PU-PH).....Jean FEUILLARD

Mme le Professeur (PU-PH)..... Dominique BORDESSOULE

M. le Professeur (PU-PH).....Hervé DOMBRET

M. le Professeur (PU) .....Jean-Luc DUROUX

Mme le Docteur (PH)..... Estelle GUERIN

M. le Docteur (PH)..... Pascal TURLURE



**Impact de l'expression du CD33 sur la réponse au  
gemtuzumab ozogamicin  
dans les leucémies aiguës myéloïdes**

**Nouveau protocole de cytométrie en flux pour une détermination standardisée  
de l'expression du CD33 dans les leucémies aiguës myéloïdes**

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN MÉDECINE

présentée et soutenue publiquement

le 1<sup>er</sup> Juillet 2013

par Guillaume OLOMBEL

né le 28 Janvier 1983, à CASTRES (81)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE

M. le Professeur (PU-PH).....Jean FEUILLARD

Mme le Professeur (PU-PH)..... Dominique BORDESSOULE

M. le Professeur (PU-PH).....Hervé DOMBRET

M. le Professeur (PU) .....Jean-Luc DUROUX

Mme le Docteur (PH)..... Estelle GUERIN

M. le Docteur (PH)..... Pascal TURLURE

## Liste du corps enseignant

### UNIVERSITE de LIMOGES FACULTE de MEDECINE

#### TITRES des PROFESSEURS et MAITRES de CONFERENCES des UNIVERSITES pour la REDACTION des DEDICACES

<b>ABOYANS</b> Victor	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE
<b>ACHARD</b> Jean-Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>ADENIS</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE
<b>ALAIN</b> Sophie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>ALDIGIER</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE
<b>ARCHAMBEAUD</b> Françoise	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>ARNAUD</b> Jean-Paul	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>AUBARD</b> Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GYNECOLOGIE-OBSTETRIQUE Responsable de service
<b>AUBRY</b> Karine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L.
<b>BEDANE</b> Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier DERMATOLOGIE-VENERELOGIE Responsable de service

<b>BERTIN</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE Responsable de service de RHUMATOLOGIE
<b>BESSEDE</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier O.R.L. Responsable de service
<b>BONNAUD</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Doyen Honoraire
<b>BORDESSOULE</b> Dominique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service d'HEMATOLOGIE CLINIQUE et THERAPIE CELLULAIRE
<b>CHARISSOUX</b> Jean-Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE ORTHOPEDIQUE et TRAUMATOLOGIQUE
<b>CLAVERE</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOTHERAPIE Responsable de service
<b>CLEMENT</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PSYCHIATRIE d'ADULTES Responsable de service
<b>COGNE</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE Responsable de service
<b>COLOMBEAU</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE
<b>CORNU</b> Elisabeth	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE

<b>COURATIER</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE Responsable de service
<b>DANTOINE</b> Thierry	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GERIATRIE et BIOLOGIE du VIEILLISSEMENT Responsable de service
<b>DARDE</b> Marie-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE Responsable de service
<b>DAVIET</b> Jean-Christophe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION
<b>DESCAZEAUD</b> Aurélien	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE
<b>DESSPORT</b> Jean-Claude	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NUTRITION
<b>DRUET-CABANAC</b> Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE et SANTE au TRAVAIL Responsable de service
<b>DUMAS</b> Jean-Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier UROLOGIE Responsable de service
<b>ESSIG</b> Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEPHROLOGIE Responsable de service
<b>FAUCHAIS</b> Anne-Laure	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE Responsable de service
<b>FEISS</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION

<b>FEUILLARD</b> Jean	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE Responsable de service du Laboratoire d'HEMATOLOGIE
<b>FOURCADE</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE INFANTILE Responsable de service
<b>FUNALOT</b> Benoît	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>GAINANT</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>GUIGONIS</b> Vincent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE
<b>JACCARD</b> Arnaud	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEMATOLOGIE
<b>JAUBERTEAU-MARCHAN</b> M. Odile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier IMMUNOLOGIE
<b>LABROUSSE</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE et CYTOLOGIE PATHOLOGIQUES Responsable de service
<b>LACROIX</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE VASCULAIRE
<b>LASKAR</b> Marc	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE Responsable de service Assesseur
<b>LIENHARDT-ROUSSIE</b> Anne	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PEDIATRIE Responsable de service

<b>LOUSTAUD-RATTI</b> Véronique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier HEPATOLOGIE
<b>MABIT</b> Christian	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service d'ORTHOPEDIE-TRAUMATOLOGIE
<b>MAGY</b> Laurent	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE
<b>MARQUET</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE Responsable de service
<b>MATHONNET</b> Muriel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE DIGESTIVE
<b>MELLONI</b> Boris	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PNEUMOLOGIE Responsable de service
<b>MERLE</b> Louis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE
<b>MONTEIL</b> Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE Responsable de service
<b>MOREAU</b> Jean-Jacques	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROCHIRURGIE Responsable de service Assesseur
<b>MOULIES</b> Dominique	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE INFANTILE
<b>MOUNAYER</b> Charbel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RADIOLOGIE et IMAGERIE MEDICALE

<b>NATHAN-DENIZOT</b> Nathalie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANESTHESIOLOGIE-REANIMATION Responsable de service
<b>PARAF</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE LEGALE et DROIT de la SANTE Responsable de service
<b>PLOY</b> Marie-Cécile	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE Responsable de service
<b>PREUX</b> Pierre-Marie	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION Responsable de service du SIME Assesseur
<b>ROBERT</b> Pierre-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier OPHTALMOLOGIE Responsable de service
<b>SALLE</b> Jean-Yves	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE PHYSIQUE et de READAPTATION Responsable de service
<b>SAUTEREAU</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier GASTRO-ENTEROLOGIE ; HEPATOLOGIE Responsable de service
<b>STURTZ</b> Franck	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE Responsable de service
<b>TEISSIER-CLEMENT</b> Marie- Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ENDOCRINOLOGIE, DIABETE et MALADIES METABOLIQUES
<b>TREVES</b> Richard	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier RHUMATOLOGIE

<b>TUBIANA-MATHIEU</b> Nicole	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CANCEROLOGIE Responsable de service
<b>VALLAT</b> Jean-Michel	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier NEUROLOGIE
<b>VALLEIX</b> Denis	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE Responsable de service de CHIRURGIE DIGESTIVE et ENDOCRINIENNE Doyen
<b>VERGNENEGRE</b> Alain	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>VERGNE-SALLE</b> Pascale	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier THERAPEUTIQUE
<b>VIDAL</b> Elisabeth	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MEDECINE INTERNE
<b>VIGNON</b> Philippe	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier REANIMATION Responsable de service
<b>VINCENT</b> François	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE
<b>VIROT</b> Patrice	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CARDIOLOGIE Responsable de service
<b>WEINBRECK</b> Pierre	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier MALADIES INFECTIEUSES Responsable de service
<b>YARDIN</b> Catherine	Professeur des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE Responsable de service

<b>BUCHON</b> Daniel	Professeur des Universités MEDECINE GENERALE
<b>BUISSON</b> Jean-Gabriel	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>DUMOITIER</b> Nathalie	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>PREVOST</b> Martine	Professeur associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>AJZENBERG</b> Daniel	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
<b>ANTONINI</b> Marie-Thérèse	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHYSIOLOGIE Responsable de service
<b>BOURTHOUMIEU</b> Sylvie	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CYTOLOGIE et HISTOLOGIE
<b>BOUTEILLE</b> Bernard	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PARASITOLOGIE et MYCOLOGIE
<b>CHABLE</b> Hélène	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOCHIMIE et BIOLOGIE MOLECULAIRE
<b>DURAND-FONTANIER</b> Sylvaine	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier ANATOMIE
<b>ESCLAIRE</b> Françoise	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>HANTZ</b> Sébastien	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE
<b>LAROCHE</b> Marie-Laure	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE CLINIQUE

<b>LE GUYADER</b> Alexandre	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier CHIRURGIE THORACIQUE et CARDIOVASCULAIRE
<b>MARIN</b> Benoît	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier EPIDEMIOLOGIE, ECONOMIE de la SANTE et PREVENTION
<b>MOUNIER</b> Marcelle	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BACTERIOLOGIE-VIROLOGIE ; HYGIENE HOSPITALIERE
<b>PICARD</b> Nicolas	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier PHARMACOLOGIE FONDAMENTALE
<b>QUELVEN-BERTIN</b> Isabelle	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOPHYSIQUE et MEDECINE NUCLEAIRE
<b>TERRO</b> Faraj	Maître de Conférences des Universités-Praticien Hospitalier BIOLOGIE CELLULAIRE
<b>MENARD</b> Dominique	Maître de Conférences associé à mi-temps MEDECINE GENERALE
<b>BONNETBLANC</b> Jean-Marie	Professeur des Universités Emérite
<b>DENIS</b> François	Professeur des Universités Emérite
<b>SAUVAGE</b> Jean-Pierre	Professeur des Universités Emérite
<b>VANDROUX</b> Jean-Claude	Professeur des Universités Emérite

Le 15 Janvier 2013

## Remerciements

**A Monsieur le Professeur Jean FEUILLARD,**

pour m'avoir fait l'honneur de présider le jury de cette thèse,

pour votre soutien sans faille dans mon cursus d'interne de biologie médicale.

Veillez trouver ici l'expression de ma profonde reconnaissance.

**A Madame le Docteur Estelle GUERIN,**

pour m'avoir fait l'honneur de diriger cette thèse et être membre de ce jury,

pour ton dynamisme et ta disponibilité qui ont permis à cette thèse d'aboutir.

Sois assurée de tout mon respect et de ma plus profonde gratitude.

**A Monsieur le Professeur Hervé DOMBRET,**

pour le grand honneur que vous me faites en participant à ce jury,

pour la chance que l'on a eu, Estelle et moi, de vous voir collaborer à cette thèse.

Recevez mes remerciements les plus sincères.

**A Madame le Professeur Dominique BORDESSOULE,**

pour l'honneur que vous me faites en acceptant d'être membre de ce jury.

Soyez assurée de toute ma gratitude.

**A Monsieur le Professeur Jean-Luc DUROUX,**

pour avoir accepté d'évaluer cette thèse.

Recevez mes remerciements les plus chaleureux.

**A Monsieur le Docteur Pascal TURLURE,**

pour avoir prêté attention à ce travail et accepté de le juger.

Soyez assuré de mon profond respect.

A **tous les laboratoires** qui m'ont accueilli et à toutes les techniciennes et tous les techniciens qui m'ont supporté.

Au **laboratoire d'hématologie** sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour.

A la **sous-unité de cytométrie en flux** et son rôle fondamental dans mon épanouissement à la fois personnel et professionnel.

A mes **parents** et leur indéfectible soutien en toute circonstance.

A ma **tante et marraine Arlette** à qui je dédie ce travail en mémoire de son courage face à la leucémie.

A ma **famille entière**.

**A Patricia, ma future épouse : à son courage, à son amour.**

*"Humanum fuit errare, diabolicum est per animositatem in errore perseverare"*

("L'erreur est humaine, persister dans l'erreur par orgueil est diabolique")

Augustin d'Hippone (Saint Augustin), *Sermons* (164,14)

"Il faut distinguer la ténacité de l'obstination : savoir insister et persévérer au bon moment, savoir aussi se retirer et renoncer quand il le faut."

Shafique Keshavjee (Le roi, le sage et le bouffon)

"Sans la musique, la vie serait une erreur."

Friedrich Nietzsche

## Droits d'auteurs

Droits d'auteur réservés.

Toute reproduction sans accord exprès de l'auteur à des fins autres que strictement personnelles est prohibée.

OU



Cette création est mise à disposition selon le Contrat : « **Paternité-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification** » disponible en ligne  
<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.0/fr/>

## Liste des abréviations

<b>ALFA</b> : Acute Leukemia French Association	<b>GEIL</b> : Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies
<b>APC</b> : AlloPhycoCyanine	<b>GO</b> : gemtuzumab ozogamicin
<b>ARDS</b> : syndrome de détresse respiratoire aiguë	<b>GTLLF</b> : Groupe de Travail sur les Leucémies et les Lymphomes en Francophonie
<b>ATRA</b> : acide tout trans rétinoïque	<b>GVL</b> : greffon <i>versus</i> leucémie
<b>ATU</b> : autorisation temporaire d'utilisation	<b>HDAC</b> : histone déacétylase
<b>BP</b> : bande passante	<b>HR</b> : Hazard <i>ratio</i>
<b>CD</b> : Cluster of Differentiation	<b>ITIM</b> : Immunoreceptor <i>Tyrosine</i> -based Inhibition Motif
<b>CHU</b> : Centre Hospitalier Universitaire	<b>LAL</b> : leucémie aiguë lymphoblastique
<b>CMF</b> : cytométrie en flux	<b>LA</b> : leucémie aiguë
<b>CR</b> : rémission complète	<b>LAM</b> : leucémie aiguë myéloblastique
<b>CRp</b> : rémission complète sans rémission plaquettaire	<b>LMD</b> : List Mod Data
<b>CSH</b> : cellules souches hématopoïétiques	<b>LNS</b> : la norme supérieure
<b>DA</b> : daunorubicine	<b>LP</b> : long pass
<b>DFS</b> : survie sans maladie	<b>MFI</b> : mean fluorescence intensity
<b>DM</b> : miroir dichroïque	<b>MPO</b> : myéloperoxydase
<b>EDTA</b> : acide éthylène diamine tétraacétique	<b>MRC</b> : Medical Research Council
<b>EFS</b> : survie sans événement	<b>MVO</b> : maladie veino-occlusive
<b>ELN</b> : European Leukemia Net	<b>OMS</b> : Organisation Mondiale de la Santé
<b>ENS</b> : estérase non spécifique	<b>OR</b> : rémission globale
<b>FAB</b> : French American British	<b>PBS</b> : Phosphate Buffered Saline
<b>FACS</b> : Fluorescence-Activated Cell Sorter	<b>PCR</b> : Polymerase Chain Reaction
<b>FCS</b> : Flow Cytometry Standard	<b>PE</b> : PhycoErythrine
<b>FISH</b> : Fluorescence In Situ Hybridization	<b>PMT</b> : photomultiplicateur
<b>FITC</b> : isothiocyanate de fluorescéine	<b>RFS</b> : survie sans rechute
<b>FL</b> : détecteur de fluorescence	<b>SP</b> : short pass
<b>FS</b> : Forward Scatter	<b>SS</b> : Side Scatter
	<b>UV</b> : ultra-violet

## **Plan**

- 1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)**
- 2. Principes de cytométrie en flux (CMF)**
- 3. CD33, gemtuzumab ozogamicin (GO : MYLOTARG®) et premières avancées**
- 4. Etude de l'impact de l'expression du CD33 sur l'action du GO en vue de la mise en place d'un nouveau protocole de CMF**

## Introduction

Les leucémies aiguës constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes, caractérisées par la prolifération clonale de précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes et par une altération de l'hématopoïèse. On distingue deux grands types de leucémies aiguës en fonction de l'origine du précurseur hématopoïétique atteint : les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).

Dans la démarche de diagnostic et de suivi des leucémies aiguës, la cytométrie en flux (CMF) est actuellement devenue indispensable. C'est une technique qui, en biologie médicale, permet l'étude précise de cellules isolées entraînées par un flux liquide. Ainsi permet-elle la caractérisation individuelle, quantitative et qualitative, de particules en suspension dans un liquide, notamment les blastes, dans le cadre des leucémies aiguës. Des années 1960 à nos jours, la CMF n'a cessé de progresser pour finalement prendre une place indiscutable dans la pratique quotidienne en biologie médicale.

Cette thèse s'appuie donc sur la CMF et notre travail a consisté, dans un premier temps, à étudier l'expression du marqueur CD33 par les blastes des LAM des patients inclus dans le protocole ALFA-0701.

L'étude ALFA-0701 a prouvé l'efficacité de doses fractionnées de gemtuzumab ozogamicin (GO) sur la survie des patients atteints de LAM (1). Le GO est le premier anticorps monoclonal thérapeutique (anti-CD33) développé pour le traitement des LAM à la fin des années 1990. Actuellement, les cliniciens n'ont toutefois pas de réponse standardisée de CMF quant au niveau d'expression du CD33 par les blastes des LAM.

Par conséquent, dans un deuxième temps, notre travail a été de définir, par la CMF, un seuil d'expression du CD33 au-delà duquel l'efficacité du GO serait significativement meilleure sur la survie. D'autres facteurs (cytogénétique, biologie moléculaire) ont également été étudiés.

La problématique, quant à elle, est essentiellement venue de la difficulté de récupération des résultats de CMF et de l'absence de standardisation des automates de CMF entre eux.

La première partie de la thèse est donc consacrée à un rappel sur les LAM et la deuxième, sur la CMF. La troisième partie décrit le CD33, présente le GO et résume les principales études mettant en avant l'efficacité du GO. La quatrième partie étudie enfin l'expression du CD33 par les blastes des LAM des patients inclus dans le protocole ALFA-0701 et met en place, à destination de l'ensemble des centres faisant de la CMF, une standardisation pour la détermination de l'expression du CD33 par les blastes des LAM.

## 1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

### 1.1. Définition et critères diagnostiques

Les leucémies aiguës myéloïdes sont définies comme un ensemble de proliférations malignes aboutissant à l'accumulation dans la moelle, le sang et éventuellement d'autres organes, de précurseurs des cellules sanguines (blastes) de nature myéloïde (myéloblastes) avec blocage à un stade précoce de leur différenciation.

Le pourcentage de myéloblastes <sup>et/ou</sup> de monoblastes/promonocytes <sup>et/ou</sup> de mégacaryoblastes requis pour un diagnostic de LAM est de 20% ou plus. Le diagnostic de LAM peut aussi être fait quand le pourcentage de blastes dans le sang ou la moelle est inférieur à 20% et s'il y a association avec les anomalies cytogénétiques suivantes (2):

- translocation t(8;21)(q22;q22) (réarrangement des gènes RUNX1 et RUNX1T1) ;
- translocation t(16;16)(p13.1;q22) ou inversion inv(16)(p13.1q22) (réarrangement des gènes CFBF et MYH11) ;
- translocation t(15;17)(q22;q12) : leucémie aiguë promyélocytaire (réarrangement des gènes RARA et PML).

Le tableau clinique et notamment le rythme de progression de la maladie doivent cependant être pris en compte quand il s'agit de mettre en place un traitement (2).

Une analyse cytogénétique doit donc être pratiquée, avec caryotype conventionnel, hybridation in situ (FISH) et biologie moléculaire à la recherche de transcrits de fusion et de mutations de FLT3, NPM1 et CEBP $\alpha$  pour les LAM à caryotype normal.

### 1.2. Epidémiologie

En 2011 et en France métropolitaine, selon l'Institut national du cancer (Inca), l'incidence des leucémies aiguës, chez les adultes de vingt ans ou plus, tout sexe confondu, s'est élevée à 1,0 pour 100 000 personnes-années (20<sup>ème</sup> rang des cancers) et la mortalité, à 2,2 pour 100 000 personnes-années (12<sup>ème</sup> rang) (3).

Chez les enfants de moins de 15 ans et sur une période allant de 2004 à 2008, les leucémies aiguës ainsi que les syndromes myéloprolifératifs et myélodysplasiques ont eu une incidence de 0,44 pour 100 000 personnes-années (1<sup>er</sup> rang des cancers chez l'enfant de moins de 15 ans). En 2005, la mortalité a été de 0,64 pour 100 000 personnes-années (2<sup>ème</sup> rang chez les enfants de moins de 15 ans) (4).

Les leucémies aiguës myéloïdes représentent entre 80 % et 85 % de tous les cas de leucémies aiguës chez les personnes de plus de vingt ans (5). Leur incidence augmente régulièrement avec l'âge avec un âge médian de survenue de 65 ans, ce qui rend compte de leur fréquence chez les sujets âgés, terrain où elles ne peuvent pas être traitées de manière conventionnelle en raison de la toxicité des chimiothérapies utilisées.

Les facteurs de risque des leucémies aiguës myéloïdes restent encore peu connus. On parle de LAM secondaire lorsque celle-ci survient dans un contexte de facteur de risque identifié (6) :

- certaines maladies congénitales sont des facteurs prédisposants : trisomie 21, maladies associées à un défaut de réparation de l'ADN (maladie de Fanconi, ataxie-télangiectasie, syndrome de Bloom), syndrome de Klinefelter, syndrome de Wiskott-Aldrich ;
- exposition à des radiations ionisantes (antécédent de radiothérapie) ;
- exposition à des médicaments cytotoxiques dont les agents alkylants et les inhibiteurs de topo-isomérases ;
- exposition à des toxiques : benzène et ses dérivés, tabac, le rôle des pesticides et des solvants a été évoqué ;
- existence d'un syndrome myélodysplasique ou d'un syndrome myéloprolifératif.

Il est indispensable de rechercher les formes secondaires de leucémies aiguës myéloïdes, car il s'agit de maladies moins sensibles aux traitements, sujettes à un risque plus élevé de rechute, souvent précoce et qui justifient le développement d'approches thérapeutiques nouvelles.

### 1.3. Classification des LAM

La classification morphologique des hémopathies myéloïdes, proposée par le groupe franco-américano-britannique (FAB) en 1976 et modifiée en 1982, reposait sur une distinction des LAM selon des critères qualitatifs de morphologie et de cytochimie et quantitatifs de dénombrement de blastes dans le sang ou la moelle (7) (8) (voir tableau 1).

**Tableau 1** : classification FAB des LAM (8)

Type FAB	Nom
LAM 0	LAM indifférenciée
LAM 1	LAM peu différenciée
LAM 2	LAM avec différenciation
LAM 3	LA promyélocytaire
LAM 4	LAM myélo-monocytaire
LAM 5	LA monoblastique 5a/5b = sans/avec différenciation
LAM 6	LA érythroblastique
LAM 7	LA mégacaryoblastique

La classification actuellement utilisée est la classification OMS qui tient compte des anomalies chromosomiques récurrentes, de l'existence d'une myélodysplasie et du caractère secondaire de la leucémie (voir tableau 2).

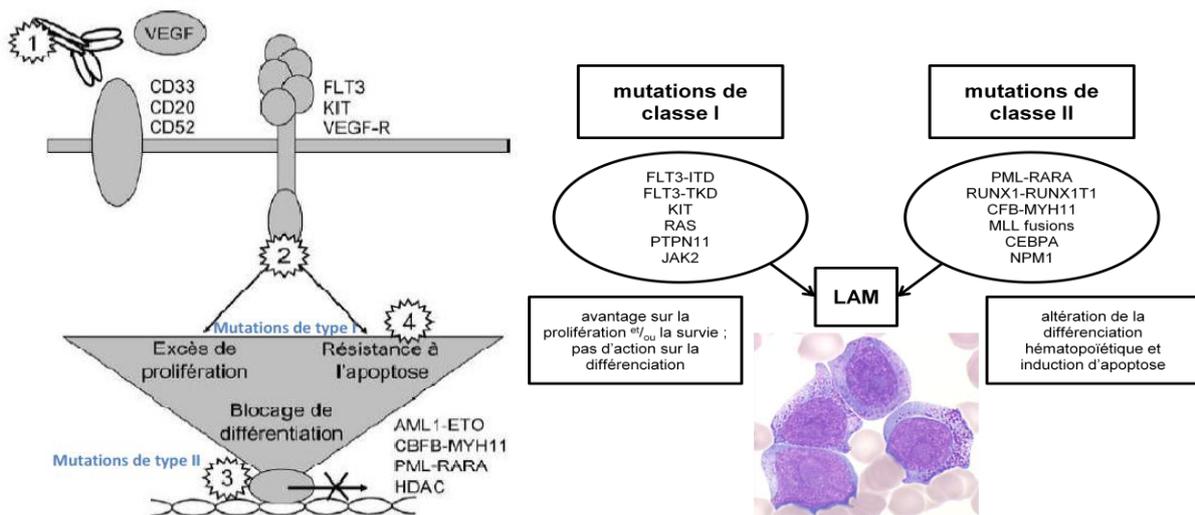
L'intégration des données de biologie moléculaire résiduelle et de maladie résiduelle est désormais indispensable à la stratification pronostique et la prise en charge des leucémies aiguës.

**Tableau 2** : classification OMS 2008 des leucémies aiguës myéloïdes (6)

<b>Leucémies aiguës myéloïdes</b>
<b>LAM avec translocations chromosomiques récurrentes</b>
■ LAM avec t (8;21)(q22;q22) ; ou équivalent moléculaire AML1(CBF $\alpha$ )-ETO
■ LAM avec t (15;17)(q22;q11-12) ; PML/RAR $\alpha$ et variantes
■ LAM avec inv(16)(p13;q22) ou t(16;16)(p13;q22) ; CBF $\beta$ /MYH11
■ LAM avec anomalies 11q23 (Impliquant gène MLL)
■ LAM avec t (6;9)(p23;q34) ; DEK-NUP214
■ LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; RPN1-EVI1
■ LAM avec t(1;22)(p13;q13) ; RBM15-MKL1
■ LAM avec mutation NPM1
■ LAM avec mutation CEBP $\alpha$
<b>LAM avec myélodysplasie « multilignée »</b>
■ Avec antécédent de syndrome myélodysplasique
■ Sans antécédent de syndrome myélodysplasique
<b>LAM et SMD « secondaires » à des thérapeutiques</b>
■ Après agent alkylant
■ Après épipodophyllotoxine
■ « Secondaires » à d'autres traitements
<b>LAM n'entrant pas dans les catégories précédentes</b>
■ LAM avec différenciation minimale (M0)
■ LAM sans maturation (M1)
■ LAM avec maturation (M2)
■ LAM « promyélocytaire » (M3)
■ LAM avec différenciation myélomonocytaire (M4)
■ LAM monocytaire (M5)
■ LAM avec différenciation érythroblastique (M6)
■ LAM avec différenciation mégacaryocytaire (M7)
■ LAM avec différenciation basophile
■ LAM avec myélofibrose
■ LAM biphénotypique
<b>LAM dans le cadre de la trisomie 21 (syndrome de Down)</b>

## 1.4. Physiopathologie des LAM : bases de la leucémogénèse

Dans un modèle de leucémogénèse à deux événements ("two-hit"), il existe une coopération entre des anomalies moléculaires responsables d'un arrêt de la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et d'autres anomalies conduisant à un excès de prolifération (2) (9) : la survenue d'une leucémie dans un précurseur hématopoïétique est tout d'abord secondaire à des anomalies de la transduction du signal responsables d'un excès de prolifération et d'une résistance à l'apoptose et, deuxièmement, à un blocage de la différenciation (voir figure 1). Les mutations de type I donnant un avantage prolifératif ou de survie sont identifiées dans 50% des LAM (mutations FLT3-ITD, mutations de c-KIT, de N-RAS, de K-RAS notamment) et peuvent être exclusives. Les anomalies de type II conduisant à un blocage de la différenciation peuvent être des translocations responsables de la production de transcrits de fusion impliquant des facteurs de transcription (CBFβ-MYH11, AML1-ETO, PML-RARα, TEL-AML1, NUP98-HOXA9, AML1-AMP19) ou des mutations ponctuelles (CEBPA, AML1, PU1) (voir figure 1).



**Figure 1** : schéma des mécanismes de leucémogénèse myéloïde et des principales cibles thérapeutiques (1 = anticorps monoclonaux, 2 = inhibiteurs de tyrosine kinase ou de transduction du signal, 3 = agents différenciants, 4 = inducteurs de l'apoptose) (2) (8)

Dans les dernières années, des mutations génétiques ont été identifiées dans les LAM avec cytogénétique normale. La proportion des adultes avec une LAM à cytogénétique normale *de novo* varient de 40 à 49% dans la plupart des grandes études de cytogénétique (2) (10). Certaines de ces mutations, comme celles de CEBPA et probablement NPM1, mettent en jeu des facteurs de transcription tandis que d'autres, notamment celles de FLT3 et NRAS/KRAS, affectent le signal de transduction. En résumé, ces anomalies génétiques

élucident progressivement la leucémogénèse, apportent une information pronostique et permettent le développement de thérapeutiques ciblées en complément des stratégies conventionnelles.

### **1.5. Facteurs pronostiques**

Les facteurs pronostiques continuent d'être étudiés par les différents groupes coopératifs impliqués dans le traitement des leucémies aiguës myéloïdes. L'ELN (European Leukemia Net) a regroupé en sous-groupes pronostiques les différentes leucémies aiguës au vu des résultats des différentes études. Ces sous-groupes pronostiques vont moduler le traitement proposé aux patients (allogreffe d'emblée ou non) (6) (11) (voir tableau 3).

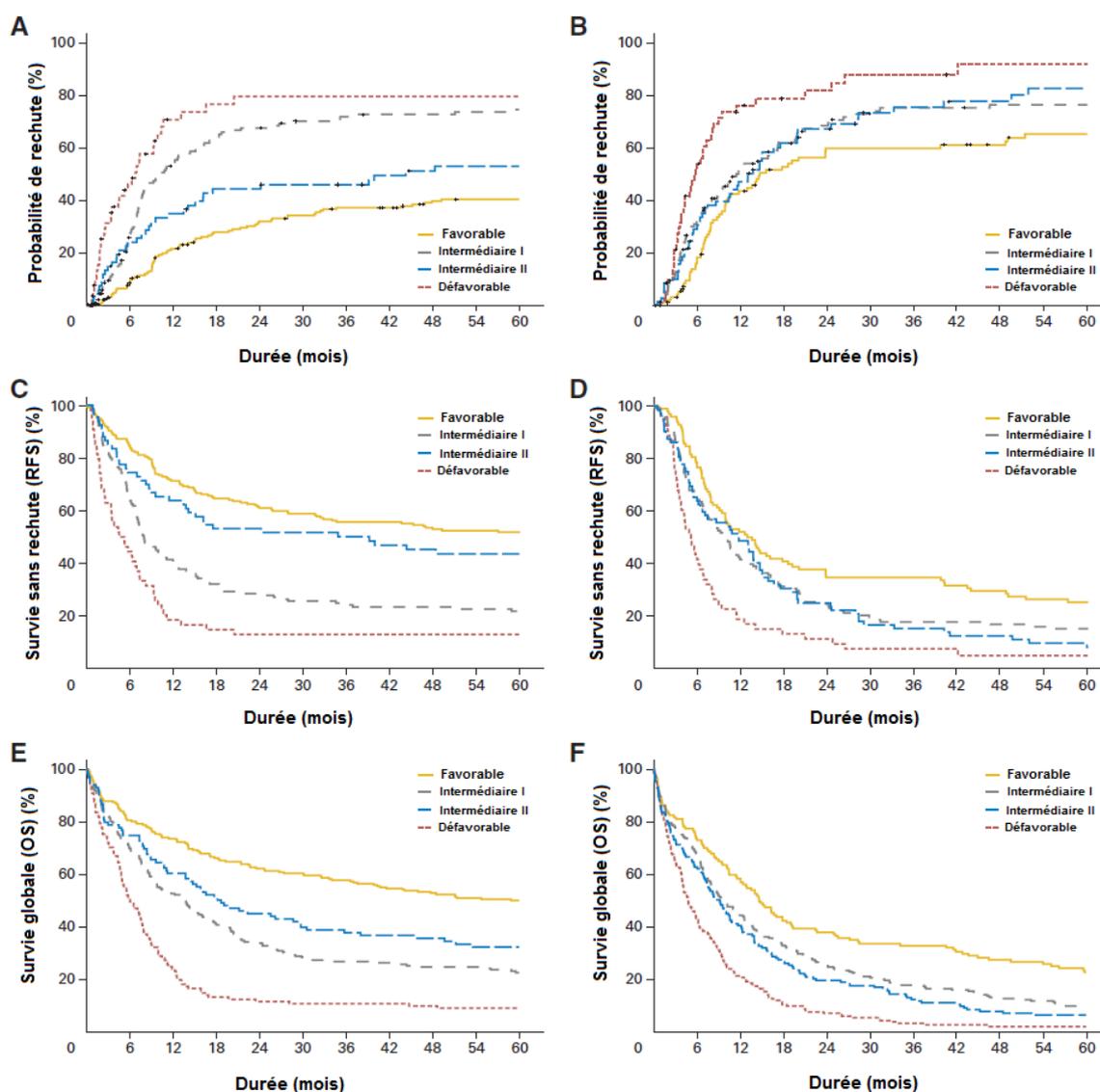
Selon une étude (11), la survie globale moyenne chez les patients de 60 ans ou moins est de 5.3 ans pour le groupe de risque favorable, 1.1 ans pour le groupe de risque intermédiaire I (IR-1), 1.6 ans pour le groupe de risque intermédiaire II (IR-2) et 6 mois pour le groupe de risque défavorable (différences de survie significatives entre les différents groupes pronostiques). Chez les patients de 60 ans ou moins, on constate que le pronostic du groupe IR-II est meilleur que celui du groupe IR-I (11). Ceci est expliqué par l'existence d'aberrations cytogénétiques de pronostic plus favorable, par exemple t(9;11), 9q- ou-y, présentes respectivement chez 14, 12 et 10 des 298 patients du groupe IR-II. Par ailleurs, une proportion plus élevée de patients FLT3-ITD positifs dans le groupe IR-I (20%) par rapport au groupe IR-II (6%) peut aussi justifier ces résultats (11).

Chez les patients de plus de 60 ans, la survie globale moyenne est de 1.2 ans pour le groupe de risque favorable, 9.5 mois pour le groupe de risque intermédiaire I, 9.2 mois pour le groupe de risque intermédiaire II et 4.8 mois pour le groupe de risque défavorable (11). Pour les patients de plus de 60 ans, aucune différence significative n'a été mise en évidence entre les groupes IR-1 et IR-2 (11) (voir figure 2).

Au final, la classification de l'ELN est actuellement la meilleure échelle de pronostic pour les patients de 60 ans ou moins et pour les patients de plus de 60 ans. Les patients sont répartis de manière plus détaillée et les différences de pronostic sont significatives entre les différents groupes (11).

**Tableau 3** : groupe pronostique des LAM selon l'ELN (6) (11)

Favorable	Intermédiaire I	Intermédiaire II	Défavorable
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ t (8;21)(q22;q22) RUNX1-RUNX1T1 = (AML1) CBF<math>\alpha</math>-ETO</li> <li>■ inv (16) (p13.1;q22) ou t (16;16) (p13.1;q22) CBF<math>\beta</math>-MYH11</li> <li>■ Mutation NPM1 sans mutation FLT3-ITD (caryotype normal)</li> <li>■ Mutation CEBP<math>\alpha</math> (caryotype normal)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Caryotype normal ET</li> <li>■ Mutation NPM1 et FLT3-ITD</li> <li>■ Pas de mutation NPM1 et mutation FLT3-ITD</li> <li>■ Pas de mutation NPM1 ni FLT3-ITD</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ t (9;11)(p22;q23) MLLT3-MLL</li> <li>■ Autre anomalie cytogénétique (ni favorable ni défavorable)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ inv (3) (q21;q26.2) ou t (3;3) (q21;q26.2) RPN1-EV11</li> <li>■ t (6;9)(p23;q34) DEK-NUP214</li> <li>■ t (v;11) (v;q23) réarrangement MLL</li> <li>■ - 5 or del (5q) ; - 7 ; abn (17p); caryotype complexe (ou monosomique)</li> </ul>



**Figure 2** : probabilité de rechute, survie sans rechute (RFS) et survie globale (OS) chez les adultes jeunes (A, C et E ; âgés de 18 à 60 ans) et chez les adultes de plus de 60 ans (B, D et F) avec LAM en fonction des catégories de risque de l'ELN (11)

## **1.6. Circonstances diagnostiques**

La découverte d'une leucémie aiguë peut être faite aussi bien dans un contexte d'urgence thérapeutique avec un tableau clinique et biologique évident que dans un contexte totalement asymptomatique et de manière fortuite. Il est donc primordial de repérer certains éléments cliniques et biologiques significatifs (6).

### **1.6.1. Insuffisance médullaire**

Les cellules blastiques médullaires en expansion vont être responsables de l'inhibition de l'hématopoïèse normale. Cette inhibition est responsable du déficit de production des trois principales lignées (érythrocytes, granuleux, plaquettes) (6).

#### **1.6.1.1. Lignée érythrocytaire : syndrome anémique**

Le syndrome anémique se traduit par une asthénie et très souvent une dyspnée à l'effort. Le patient peut décrire des bourdonnements d'oreille ou des lipothymies. À l'examen clinique, on peut mettre en évidence une pâleur cutanéomuqueuse et une tachycardie. Un angor et des modifications de l'électrocardiogramme (parfois révélateurs) doivent être particulièrement recherchés chez le sujet à risque (patient âgé, facteurs de risque cardiovasculaire associés). Le syndrome anémique peut être bien toléré s'il s'est constitué de manière lente. À l'inverse, il constitue la première plainte du patient si son apparition a été rapide (6).

#### **1.6.1.2. Lignée granuleuse : syndrome infectieux**

Le syndrome infectieux est lié à la neutropénie. La symptomatologie va de la fièvre isolée sans point d'appel à l'état de choc septique toxi-infectieux. Les présentations cliniques décrites comme évocatrices de neutropénie fébrile sont les angines nécrotiques et les pneumopathies graves et de survenue brutale (6).

#### **1.6.1.3. Lignée plaquettaire : syndrome hémorragique**

Le syndrome hémorragique est lié en premier lieu à la thrombopénie. Il peut se traduire par un purpura isolé et quelques ecchymoses banales ou bien être responsable d'un tableau clinique gravissime. Les signes de gravité à rechercher sont une atteinte des muqueuses (épistaxis, gingivorragies, bulles hémorragiques au niveau de la face interne des joues, méno-métrorragies) et des signes évoquant une hémorragie cérébro-méningée. La réalisation d'un fond d'œil en urgence permet d'évaluer les risques hémorragiques profonds.

La gravité du syndrome hémorragique (saignements aux points de ponction, hématomes spontanés) doit faire rechercher des troubles de l'hémostase secondaire, en particulier une coagulation intravasculaire disséminée qui nécessite une prise en charge en soins intensifs ou en réanimation (6).

## 1.6.2. Syndrome tumoral

Le syndrome tumoral est souvent absent. Dans le cas contraire, certains signes cliniques sont plus caractéristiques d'une leucémie aiguë lymphoïde et d'autres évoquent plutôt une LAM (6).

### 1.6.2.1. Syndrome tumoral évocateur d'une LAM

Il est moins fréquent et se voit surtout dans les leucémies aiguës à composante monoblastique :

- **les leucémides** : (voir figure 3) lésions tumorales cutanées arrondies, dures et parfois violacées. Elles peuvent apparaître rapidement dans les formes hyperleucocytaires ;



**Figure 3** : leucémides (6)

- **l'hypertrophie gingivale** : les gencives peuvent parfois recouvrir le collet et la couronne dentaire ;
- **les chloromes** : (voir figure 4) il s'agit de véritables tumeurs des parties molles constituées de cellules blastiques. Elles sont appelées ainsi (*khlôrós* = vert en grec ancien) en raison de leur coloration verdâtre lorsqu'elles sont exposées à l'air libre. Cette couleur est liée à leur richesse en myéloperoxydase. Les chloromes peuvent être responsables de manifestations compressives (compression médullaire, compression digestive, compression des voies urinaires) (6).



**Figure 4** : chlorome (The New England Journal of Medicine)

### 1.6.2.2. Syndrome tumoral présent à la fois dans les LAM et les LAL

**Les douleurs osseuses** : certains patients décrivent une douleur osseuse spontanée, non calmée par les antalgiques simples et accentuée par la pression. Ces douleurs réveillent souvent le patient la nuit. Leur localisation est habituellement au niveau du bassin, du sternum, des côtes ou des épiphyses fertiles. Elles peuvent mimer une ostéite ou un rhumatisme articulaire, faisant errer le diagnostic.

Les **atteintes neuro-méningées** avec envahissement de la base du crâne se traduisent par une anesthésie de la houppe mentonnière. On peut noter une atteinte des paires crâniennes. Un tableau franc de méningite est plus rare et cet envahissement peut être asymptomatique.

L'**atteinte testiculaire** est bien plus fréquente lors des rechutes mais reste un élément clinique appartenant au syndrome tumoral à rechercher au diagnostic.

Le **syndrome de leucostase** doit être évoqué en cas de dyspnée et de troubles neurologiques accompagnant une hyperleucocytose blastique (6).

### 1.6.3. Anomalies de l'hémogramme

L'hémogramme est l'élément clé pour décider s'il faut suspecter le diagnostic de leucémie aiguë. Il peut montrer soit une hyperleucocytose avec blastose circulante, soit plusieurs cytopénies (6).

#### 1.6.3.1. Hyperleucocytose blastique

Typiquement, ce type de présentation s'accompagne d'une thrombopénie et d'une anémie normo ou macrocytaire arégénérative. L'hyperleucocytose blastique peut être modérée ou au contraire extrêmement élevée, constituant alors une urgence vitale. Les automates utilisés en routine peuvent identifier précisément les blastes mais le contrôle des lames au microscope par un cytologiste entraîné s'impose devant toute anomalie de la formule sanguine (6).

#### 1.6.3.2. Cytopénies

Une anémie normochrome arégénérative, souvent macrocytaire, une thrombopénie, une neutropénie (voire une agranulocytose) peuvent être les premiers signes révélateurs d'une leucémie aiguë, même en l'absence d'une blastose sanguine. L'atteinte de deux lignées ou plus doit être un signe d'alerte et doit imposer un bilan médullaire (6).

#### 1.6.3.3. Hémostase

Elle doit être explorée dans tous les cas, notamment à la recherche de signes de coagulation intravasculaire disséminée débutante ou déclarée (6).

## 1.7. Confirmation du diagnostic

### 1.7.1. Myélogramme

Le myélogramme est l'élément clé du diagnostic et de la classification des leucémies aiguës. Il est réalisé le plus souvent au niveau sternal ou au niveau de l'épine iliaque postérieure après anesthésie locale (ou anesthésie générale chez l'enfant). On prélève plusieurs échantillons pour analyse cytologique, cytochimique, immunophénotypique, cytogénétique et biologie moléculaire. L'analyse cytologique peut confirmer le diagnostic si elle montre une infiltration médullaire de 20% ou plus par des cellules blastiques (6).

### 1.7.2. Analyse cytochimique

On recherche une activité myéloperoxydase (MPO). Il faut 3% ou plus de cellules blastiques myéloperoxydase positives pour affirmer la différenciation myéloïde. Cependant, une réaction myéloperoxydase négative n'exclut pas une différenciation myéloïde car les monoblastes et les myéloblastes très précoces peuvent être MPO négatifs (12).

On peut également réaliser une coloration estérase non spécifique (ENS) pour distinguer les myéloblastes des monoblastes : les monoblastes et les monocytes présentent une activité cytoplasmique diffuse (ENS positive dans 80% ou plus des monoblastes et 20% ou plus des monocytes) (12).

### 1.7.3. Immunophénotypage

L'utilisation d'anticorps monoclonaux en cytométrie en flux (CMF) permet de caractériser les cellules blastiques par l'expression d'antigènes à la surface mais aussi intracellulaires (6) (13). L'immunophénotypage multiparamétrique est utilisé pour déterminer la lignée (myéloïde ou lymphoïde) d'une leucémie aiguë nouvellement diagnostiquée (12) (14).

Selon l'OMS (2), les marqueurs précoces d'une LAM sont le CD34, le CD38, le CD117, le CD133 et HLA-DR ; les marqueurs granuleux sont le CD13, le CD15, le CD16, le CD33, le CD65 et la MPO cytoplasmique ; les marqueurs monocytaires sont le CD11c, le CD14, le CD64, le lysozyme, le CD4, le CD11b, le CD36 et le NG2 homologue ; les marqueurs mégacaryoblastiques sont le CD41, le CD61 et le CD42 ; le marqueur érythroïde est le CD235a (2). Il n'y a pas de consensus général sur la limite au-delà de laquelle un marqueur est considéré comme positif. Pour la plupart des marqueurs, le seuil de 20 % ou plus des blastes exprimant le marqueur est retenu. Pour certains marqueurs (le CD3 cytoplasmique, la MPO, le CD34 et le CD117), le seuil est établi à 10 % (12).

L'immunophénotypage permet d'établir le diagnostic des LAM peu différenciées, des leucémies aiguës mégacaryoblastiques et des leucémies aiguës de lignée ambiguë. Les **LAM peu différenciées** sont des LAM sans preuves morphologiques et cytochimiques d'une différenciation myéloïde. Dans la plupart des cas, les antigènes précoces de l'hématopoïèse

sont exprimés (par exemple, CD34, CD38 et HLA-DR) mais pas les marqueurs de maturation myéloïde ou monocyttaire. Parfois, la CMF permet une détection positive de la myéloperoxydase intracytoplasmique sur une partie des blastes. Les **leucémies aiguës mégacaryoblastiques** sont des leucémies avec 20% ou plus de blastes dont 50% ou plus d'entre eux appartiennent à la lignée mégacaryocytaire. Les mégacaryoblastes expriment généralement une ou plusieurs des glycoprotéines plaquettaires (CD41<sup>et/ou</sup> CD61 et moins fréquemment CD42). Les **leucémies aiguës de lignée ambiguë** sont rares et incluent les leucémies ne montrant aucun signe de différenciation (c'est à dire, les leucémies aiguës indifférenciées) et les leucémies avec blastes exprimant les marqueurs de plus d'une lignée (c'est à dire, les leucémies aiguës de phénotype mixte). Les leucémies aiguës indifférenciées expriment le plus souvent les marqueurs HLA-DR, CD34<sup>et/ou</sup> CD38 mais, par définition, pas les marqueurs associés à une lignée en particulier (12).

Les leucémies aiguës de phénotype mixte peuvent montrer des blastes appartenant à plusieurs lignées différentes ou montrer une seule population de blastes mais exprimant des marqueurs de lignées différentes ou enfin montrer une combinaison des deux situations (12).

Selon l'OMS, les requis nécessaires pour diagnostiquer une leucémie aiguë de phénotype mixte sont (2) (15) :

- la positivité du marqueur myéloperoxydase **ou** la preuve d'une différenciation monocyttaire (deux marqueurs positifs minimum parmi les suivants : ENS, CD11c, CD14, CD64 et lysozyme) pour affirmer une différenciation myéloïde ;
- la positivité forte du marqueur CD19 avec un marqueur positif minimum parmi les suivants : CD79a, cCD22, CD10 **ou** la positivité faible du marqueur CD19 avec deux marqueurs positifs minimum parmi les suivants : CD79a, cCD22, CD10 pour affirmer l'appartenance à la lignée B ;
- la positivité intra-cytoplasmique ou de surface du marqueur CD3 pour affirmer l'appartenance à la lignée T.

#### 1.7.4. Caryotype médullaire

Il étudie les anomalies des chromosomes des cellules blastiques. Les cellules blastiques sont recueillies dans la moelle. Le prélèvement est mis en culture en présence d'un facteur mitogène. La mitose va ensuite être bloquée pour permettre une coloration et une analyse qualitative et quantitative des anomalies chromosomiques. Cette analyse est souvent complétée par une étude par FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) qui utilise des sondes fluorescentes pouvant se fixer sur une partie précise du chromosome ("chromosome painting").

Le caryotype apporte une aide (6) :

- **diagnostique** : certaines anomalies sont indispensables au diagnostic du sous-type de leucémie aiguë ;
- **pronostique** : c'est l'élément primordial pour la décision des modalités de prise en charge thérapeutique.

#### 1.7.5. Biologie moléculaire

C'est sans aucun doute le groupe des LAM à caryotype normal qui a le plus bénéficié des avancées moléculaires récentes. Les anomalies moléculaires à rechercher selon la classification pronostique de l'ELN sont :

- la duplication interne en tandem du récepteur tyrosine kinase FLT3 (FLT3-ITD) identifiée dans 30% des LAM à caryotype normal : FLT3-ITD a une valeur pronostique péjorative et est associé à une augmentation du taux de rechute ;
- les mutations de l'exon 12 du gène de la nucléophosmine (NPM1), à l'origine d'une expression cytoplasmique aberrante de la protéine correspondante : présentes dans environ 50% des LAM à caryotype normal, les mutations de NPM1 se sont révélées être un facteur de bon pronostic indépendant sur la survie globale et la survie sans événement ;
- les mutations de CEBP $\alpha$  (CCAAT / Enhancer Binding Protein alpha) présentes dans 9% des LAM et associées à une meilleure survie sans rechute et une meilleure survie globale (8).

### 1.8. Bilan et prise en charge des complications initiales

#### 1.8.1. Syndrome de lyse tumorale

Le syndrome de lyse tumorale est lié à la destruction (spontanée ou induite par la chimiothérapie) de cellules tumorales. Il s'aggrave lors de la mise en route du traitement et peut être particulièrement grave dans les leucémies hyperleucocytaires. Il est donc indispensable de le reconnaître et de le prévenir de manière systématique avant de démarrer une chimiothérapie d'induction (6).

##### 1.8.1.1. Diagnostic

Il associe (6) :

- insuffisance rénale aiguë ;
- hyperuricémie ;
- hyperphosphatémie ;
- hyperkaliémie (attention toutefois aux formes hyperleucocytaires avec fausse hypokaliémie : l'hyperleucocytose blastique induit une fausse hypokaliémie qu'il ne faut pas corriger).
- hypocalcémie ;
- élévation franche des LDH ;

### **1.8.1.2. Traitement**

L'hémodialyse est indispensable en cas d'insuffisance rénale aiguë sévère et peut être justifiée devant la seule gravité des désordres métaboliques. L'hyperuricémie (le risque étant la néphropathie uratique) nécessite une hyperhydratation et une alcalinisation des urines. La perfusion de bicarbonate de sodium est actuellement discutée car elle risque de provoquer la précipitation des cristaux d'urates dans les tubules. Il faut traiter par rasburicase pour diminuer le taux d'acide urique (6).

### **1.8.2. Coagulopathie de consommation**

La coagulation intravasculaire disséminée est une activation anormale de la coagulation. Elle aboutit à l'activation intravasculaire de la prothrombine en thrombine, entraînant une diffusion du processus de transformation du fibrinogène en fibrine et consommation des facteurs de la coagulation (fibrinogène, facteur V) et une réaction du système fibrinolytique. Elle est fréquente dans les LAM de type 3 (6).

#### **1.8.2.1. Diagnostic**

Elle peut être responsable de manifestations cliniques hémorragiques et thrombotiques. Les manifestations hémorragiques sont liées à la thrombopénie et aux déficits en facteurs de la coagulation. On recherche une atteinte des muqueuses, une atteinte rétinienne avec perte de la vue. Les saignements aux points de ponction sont évocateurs. La complication à redouter est l'hémorragie cérébro-méningée. Les manifestations thrombotiques peuvent être à l'origine d'un syndrome de détresse respiratoire aigu ou d'une insuffisance rénale (6).

#### **1.8.2.2. Traitement**

Elle nécessite un support transfusionnel (plaquettes, facteurs de coagulation en respectant l'équilibre entre facteurs pro et anticoagulants). Le rôle de l'héparinothérapie à faible dose est discuté (6).

### **1.8.3. Leucostase**

Lorsque la leucémie est très hyperleucocytaire ( $\geq 100$  Giga/L), l'envahissement sanguin par les cellules blastiques peut engendrer des troubles de la microcirculation et de la perfusion cellulaire. On parle de signes d'hyperviscosité ou de leucostase :

- défaillance respiratoire : aspect de pneumopathie alvéolo-interstitielle bilatérale à la radiographie, hypoxie, œdème pulmonaire lésionnel ;
- défaillance neurologique : confusion, convulsions liées à une anoxie cérébrale.

Dans la prise en charge de la leucostase, le rôle des cytophèreses est discuté. La chimiothérapie en urgence est nécessaire. L'utilisation de dexaméthasone a été proposée et devrait être évaluée (6).

#### 1.8.4. Neutropénie fébrile

Un tableau infectieux est fréquemment observé lorsque le taux de neutrophiles est inférieur à 500 éléments/mm<sup>3</sup>. Il peut s'agir d'une infection à point de départ identifié (pulmonaire le plus souvent) ou d'un véritable état de choc septique.

Ce tableau infectieux nécessite une prise en charge en urgence :

- assurer un bon abord vasculaire et corriger la volémie ;
- démarrer immédiatement une antibiothérapie intraveineuse à large spectre avant même une éventuelle documentation microbiologique (qu'il convient de rechercher par hémocultures et prélèvements orientés) (6).

### 1.9. Principes thérapeutiques des LAM

#### 1.9.1. Traitement des adultes jeunes : 18 à 60 ans

##### 1.9.1.1. Traitement d'induction

Trois jours d'une anthracycline (par exemple, daunorubicine à une dose d'au moins 60 mg/m<sup>2</sup> ou l'idarubicine à une dose de 10 à 12 mg/m<sup>2</sup> ou la mitoxantrone anthracènedione à une dose de 10 à 12 mg/m<sup>2</sup>) et sept jours de cytarabine (100 à 200 mg/m<sup>2</sup> en perfusion intra-veineuse continue) ("3+7") restent actuellement la norme pour le traitement d'induction. Le traitement d'induction doit être débuté le plus rapidement possible une fois que le diagnostic est posé. En effet, le résultat du traitement peut être affecté lorsque le traitement est initié au-delà de cinq jours (12).

##### 1.9.1.2. Traitement de post-rémission

Différents types de stratégies en post-rémission ont été évalués, y compris la chimiothérapie conventionnelle intensive, le traitement d'entretien prolongé et la transplantation autologue ou allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) après chimiothérapie à hautes doses. La chimiothérapie conventionnelle intensive repose sur l'utilisation de hautes doses de cytarabine (3 g/m<sup>2</sup>/12 heures à J1, J3 et J5). La transplantation autologue de CSH est considérée comme une option alternative chez les patients avec cytogénétique favorable ou intermédiaire, alors qu'elle ne peut pas être recommandée chez les patients avec cytogénétique à haut risque. La transplantation allogénique de CSH est associée aux plus faibles taux de rechute. Cet avantage s'explique par les doses élevées de la chimiothérapie de conditionnement et l'effet important du phénomène de greffon *versus* leucémie (GVL). Cependant, la mortalité liée au traitement demeure élevée. Par conséquent, la prise de décision clinique individuelle doit tenir compte du risque de la maladie (profils génétique, cytogénétique et moléculaire de la leucémie) et du risque de la transplantation elle-même (comorbidités) (12).

La stratégie de mise en place du traitement de post-rémission peut également s'appuyer sur la cytogénétique et la biologie moléculaire. Pour les LAM appartenant au

groupe de risque favorable de la classification ELN, des cycles répétitifs de hautes doses de cytarabine (3 g/m<sup>2</sup>/12 heures à J1, J3 et J5) sont considérés comme un choix raisonnable. Pour les LAM appartenant aux groupes de risque intermédiaire I et II de la classification ELN, des cycles répétitifs de hautes doses de cytarabine (3-4 cycles; 3 g/m<sup>2</sup>/12 heures à J1, J3 et J5) sont actuellement largement utilisés par de nombreux groupes coopératifs même si les résultats pour la plupart des sous-ensembles restent insatisfaisants. Enfin, pour les LAM appartenant au groupe de risque défavorable de la classification ELN, le traitement par chimiothérapie conventionnelle donne de mauvais résultats. La transplantation allogénique de CSH est actuellement considérée comme le traitement de choix pour les patients avec cytogénétique défavorable (12).

## **1.9.2. Traitement des patients âgés : 60 ans et plus**

### **1.9.2.1. Patients âgés de 60 à 74 ans**

Pour les patients avec *performans status* (*performans status* à 0 : capable d'une activité identique à celle précédant la maladie, sans aucune restriction ; à 1 : activité physique diminuée mais ambulatoire et capable de mener un travail ; à 2 : ambulatoire et capable de prendre soin de soi, incapable de travailler. Alité moins de 50% de son temps ; à 3 : capable de seulement quelques soins personnels. Alité ou en chaise plus de 50% du temps ; à 4 : incapable de prendre soin de lui-même, alité ou en chaise en permanence) inférieur à 2 et sans comorbidité, le traitement d'induction standard est une option envisageable avec des taux de rémission complète de 50% en moyenne et des taux de décès (décès en aplasie ou décès de cause indéterminée) inférieurs à 15%. Comme pour les adultes jeunes, le traitement d'induction repose généralement sur trois jours d'une anthracycline et sept jours de cytarabine. Une réduction des doses peut être envisagée au cas par cas (12).

Aucune recommandation claire ne peut être donnée concernant le traitement de post-rémission. Pour les patients sans cytogénétique défavorable, avec bon *performans status* et sans comorbidité significative, le traitement d'induction standard "3+7" suivie par des cycles répétitifs de consolidation à dose modeste (400 mg/m<sup>2</sup> en perfusion IV continue de J1 à J5) est acceptable. La transplantation allogénique de CSH est en cours d'étude (12).

### **1.9.2.2. Patients âgés de 75 ans ou plus**

Une alternative au traitement d'induction doit être recherchée pour les patients âgés de 75 ou plus avec *performans status* à 2 ou 3, des comorbidités ou encore une insuffisance d'organe. Dans un essai randomisé, la cytarabine à faible dose (20 mg deux fois par jour en sous-cutané pendant 10 jours) a été associée à une survie plus longue que l'hydroxyurée (à une dose suffisante pour garder le taux de globules blancs inférieur à 10 G/L) mais le bénéfice apporté par la cytarabine est mineur et l'hydroxyurée reste malgré tout une option

thérapeutique valable. En outre, il n'y a aucun avantage de la cytarabine à faible dose chez les patients avec cytogénétique défavorable. En réalité, le choix du traitement dépend beaucoup du souhait des patients (12).

### 1.9.3. Traitement des LAM en rechute

Pour la majorité des patients atteignant la rémission complète, la leucémie se reproduit dans les trois ans suivant le diagnostic. En général, le pronostic des patients en rechute est pauvre de même que les options thérapeutiques (12).

Un pilier du traitement de deuxième ligne (réinduction) est la cytarabine qui peut être utilisée à doses intermédiaires (1 g/m<sup>2</sup>) ou à fortes doses (2 à 3 g/m<sup>2</sup>) (12).

Après obtention d'une nouvelle rémission, la transplantation allogénique de CSH est actuellement le traitement de consolidation de choix. Si une transplantation allogénique n'est pas possible (par exemple, en l'absence d'un donneur compatible), une transplantation autologue est souvent considérée comme la deuxième meilleure option. Les patients ayant déjà eu une transplantation allogénique avant rechute arrêtent l'immunoprophylaxie et peuvent alors recevoir des perfusions de lymphocyte de donneurs. Ces transplantations ne sont pas possibles chez les patients ayant déjà eu une réaction du greffon contre l'hôte. Enfin, les patients avec rechute longue (plus d'un an après l'allogreffe) peuvent bénéficier d'une deuxième transplantation (12).

### 1.9.4. Thérapies ciblées moléculaires

Ces nouvelles thérapies ont pour objectif de rétablir la différenciation cellulaire (agents différentiants) ou d'inhiber le signal de prolifération et de rétablir l'apoptose. D'autres nouvelles molécules ciblent les molécules de surface, les récepteurs et les voies de signalisation cellulaires.

#### 1.9.4.1. Agents différentiants

De fortes doses d'**acide tout-trans rétinolique (ATRA)** dans les leucémies aiguës promyélocyaires rétablissent la fonction transcriptionnelle de l'acide rétinolique, induisant une différenciation et une apoptose des blastes. Depuis la fin des années 1980 où les premières rémissions de LA promyélocyaires ont été rapportées en monothérapie, l'ATRA a progressivement confirmé sa place en association avec la chimiothérapie conventionnelle en induction et en entretien de ces LA (16).

La méthylation de l'ADN est une modification épigénétique fréquente dans les cancers et celle-ci inhibe l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs. L'ADN méthyltransférase catalyse cette réaction et des inhibiteurs de cette enzyme comme l'**azacytidine** ou la **décitabine** ont été développés. L'azacytidine, qui a surtout été évaluée dans les syndromes

myélodysplasiques de haut risque, a également montré une efficacité dans des LAM pauciblastiques (17) mais aussi dans les LAM avec plus de 30% de blastes médullaires (18).

Un autre mécanisme épigénétique de régulation d'expression des gènes repose sur les modifications de protéines associées à la chromatine : les histones. Ce processus est, entre autres, contrôlé par les histones acétyltransférases et les histones déacétylases (HDAC). L'inhibition de l'activité HDAC permet l'acétylation des histones, entraînant une réexpression des gènes concernés. De nombreux **inhibiteurs d'HDAC** sont actuellement à l'étude et parmi eux, l'**acide valproïque** est à ce jour le mieux étudié dans les LAM. En monothérapie, l'effet de l'acide valproïque est surtout retrouvé dans les syndromes myélodysplasiques mais il a été montré une synergie avec les agents déméthylants (19) (20) et également une potentialisation par l'acide valproïque de l'effet du GO sur les blastes myéloïdes (21). Ceci ouvre donc la voie à de multiples possibilités d'associations. Un autre inhibiteur d'HDAC, l'**entinostat**, a montré une capacité à restaurer l'expression de gènes pro-apoptotiques dans des cellules leucémiques (22). L'entinostat a également montré une amélioration de la survie dans une étude menée sur un modèle murin avec LAM à cytogénétique normale (23). L'association d'inhibiteurs d'HDAC et d'inhibiteurs d'ADN méthyltransférase possède un effet synergique *in vitro*. L'activité de l'ATRA peut être augmentée par l'utilisation des inhibiteurs d'HDAC comme par les agents déméthylants (24).

#### 1.9.4.2. Inducteurs d'apoptose

L'hyper-expression de BCL-2 étant associée à un mauvais pronostic dans les LAM, l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens anti-BCL2 a été envisagée et montre une majoration *in vitro* de la sensibilité de cellules tumorales à la chimiothérapie. L'**oblimersen** est un anti-sens qui a montré une efficacité en monothérapie dans les LAM réfractaires ou en rechute, avec une bonne tolérance en association avec la chimiothérapie (25). Une autre étude de phase II a montré l'intérêt de l'association de l'oblimersen avec le GO (26).

#### 1.9.4.3. Les inhibiteurs de kinases

La mise en évidence de mutations de FLT3 dans les LAM a conduit au développement d'inhibiteurs spécifiques de cette kinase : le PKC-412, le CEP-710, le MLN518, le SU11248 sont actuellement en cours d'évaluation. Ces inhibiteurs ont montré une activité modérée en monothérapie et l'efficacité n'est pas toujours corrélée au statut mutationnel de FLT3. Des résultats préliminaires d'association avec la chimiothérapie sont plus encourageants (27). D'autres inhibiteurs de tyrosine kinase sont en développement : le **dasatinib** qui cible notamment KIT, est à l'étude dans les LAM CBF chimio-réfractaires (8).

Des **inhibiteurs du récepteur au VEGF** comme le SU5416 (**semaxinib**), qui inhibe également les récepteurs tyrosine kinase KIT et FLT3, sont en cours d'évaluation dans les

LAM. Les premiers résultats montrent une faible toxicité (28) et une efficacité souvent limitée en monothérapie. Des études en association avec des chimiothérapies standards sont actuellement en cours (29). Un autre récepteur tyrosine kinase, celui de l'EGF (Epidermal Growth Factor) est actuellement à l'étude dans les LAM. En effet, l'inhibition pharmacologique de l'EGFR possède un effet anti-tumoral clinique indéniable dans les tumeurs solides et le cas d'un patient atteint d'un cancer bronchique et d'une LAM ayant répondu à l'**erlotinib**, un nouvel inhibiteur de l'EGFR, a suscité l'intérêt pour cette molécule en hématologie (8).

Bien que les mutations du gène RAS ne soient pas constamment détectées dans les LAM, l'activation de RAS peut conduire à une prolifération cellulaire anormale. Les protéines Ras sont synthétisées sous forme de précurseurs dans le cytosol et doivent se lier à la membrane pour permettre la transmission des signaux de transduction. Cette liaison est sous la dépendance de l'enzyme farnésyl transférase contre laquelle des inhibiteurs ont été développés dans le but de bloquer les signaux prolifératifs passant par Ras. Le **tipifarnib** est le premier de ces inhibiteurs évalués en clinique et notamment dans les LAM (30). Une étude récente montre que l'addition de tipifarnib à une chimiothérapie par cytarabine à faible dose chez des patients âgés (moyenne d'âge à 74 ans) n'améliore pas la survie (31).

La kinase mTOR (mammalian target of rapamycin) impliquée dans la voie PI3K/Akt de la transduction du signal est activée dans de nombreux cancers y compris les LAM. Elle contrôle la traduction de nombreux ARN et est impliquée dans la progression dans le cycle cellulaire. La **rapamycine** est évaluée en combinaison à la chimiothérapie en première ligne dans la LAM (32) (33).

#### 1.9.4.4. Les anticorps monoclonaux

Une autre stratégie ciblée est représentée par les anticorps monoclonaux, dirigés spécifiquement contre des antigènes de surface des blastes myéloïdes.

Dans plus de 90% des cas, les blastes de LAM expriment l'antigène CD33. Des **anticorps anti-CD33** ont, par conséquent, été évalués comme agent thérapeutique soit sous une forme non modifiée soit couplés à des agents anti-leucémiques. L'association de l'anti-CD33 avec des radio-éléments (Iode 131, Yttrium 90) a été évaluée surtout dans le contexte d'allogreffe et il existe aussi un anti-CD33 lié à la gélonine dont l'effet cytotoxique provient de l'inactivation des sous-unités ribosomales par hydrolyse enzymatique. Mais l'anti-CD33 le plus utilisé dans les LAM est le **gemtuzumab ozogamicin** (GO) (1) (8).

Un **anti-CD44** a récemment montré une efficacité anti-leucémique. La glycoprotéine CD44 dont l'expression est augmentée dans les LAM, est une molécule d'adhésion permettant une interaction avec le microenvironnement médullaire. Elle aurait un rôle dans

l'auto-renouvellement des CSH. Le ciblage de CD44 modifie l'interaction entre cellule souche et niche hématopoïétique et altère l'hématopoïèse leucémique (34).

La mise en évidence du rôle de l'angiogénèse dans les LAM a également conduit à évaluer des thérapeutiques anti-angiogéniques, notamment le **bevacizumab**, un anticorps anti-VEGF (28). Les résultats d'une étude récente montrent que l'adjonction de bevacizumab à une chimiothérapie standard "3+7" n'améliore pas le pronostic des patients âgés (60 ans ou plus) (35).

## 2. Principes de cytométrie en flux

### 2.1. Fonctionnement d'un cytomètre en flux

#### 2.1.1. Historique

Les prémices de la cytométrie en flux (CMF) remontent à 1934 quand Andrew Moldavan essaie de dénombrer des cellules en suspension dans un tube capillaire en utilisant un faisceau lumineux interrompu par leur passage (36).

A partir de là, une succession de découvertes et d'innovations amènent la cytométrie moderne à utiliser des appareils compacts, rapides et performants (37) (38).

En 1953, Crossland-Taylor utilise la propriété de deux flux laminaires coaxiaux à ne pas se mélanger immédiatement pour aligner les cellules et mesure la lumière diffractée pour compter les éléments sanguins.

Dans les années 1960, Louis Kametsky construit l'un des premiers cytomètres qui utilise une lampe à UV pour exciter des cellules colorées (coloration de Feulgen et jaune naphthol S) et mesure deux paramètres : le contenu en acide nucléique par absorption à 260 nm et la taille par diffraction à 410 nm. A la même époque, Mack Fulwyler décrit des expériences avec un cytomètre mesurant la fluorescence et ayant pour source d'excitation lumineuse un laser à Argon (39) (40).

A la fin des années 1960 en Allemagne, Dittrich et Gohde produisent eux aussi leur propre cytomètre en utilisant, pour marquer les cellules, un colorant fluorescent qui s'intercale entre les brins d'acides nucléiques : le bromure d'éthyldium. Enfin, toujours fin des années 1960, début des années 1970, Leonard Herzenberg reprend l'appareil de Kametsky pour détecter non plus une absorption de lumière mais de la fluorescence : c'est la naissance du F.A.C.S. (Fluorescence-Activated Cell Sorter) qui sera amélioré quelques années plus tard par l'introduction du laser comme source de lumière (39) (41).

De façon concomitante, l'apparition des photomultiplicateurs (PMT) dans les années 1950 permet la détection des lumières transmises et émises de faible puissance au sein des cytomètres. D'autre part et toujours dans les années 1950, Coons et al. utilisent pour la première fois des anticorps couplés à une molécule fluorescente (l'isothiocyanate de fluorescéine ou FITC) pour mettre en évidence des antigènes pneumococques dans des tissus pulmonaires. L'immunophénotypage prend de l'ampleur après 1975 quand Georges J.F. Köhler et Cesar Milstein publient une technique permettant de produire des anticorps monoclonaux grâce à la découverte des hybridomes (39) (40).

La CMF est donc une technique d'analyse et/ou de tri cellulaires. Le principe de fonctionnement est le même pour tous les cytomètres.

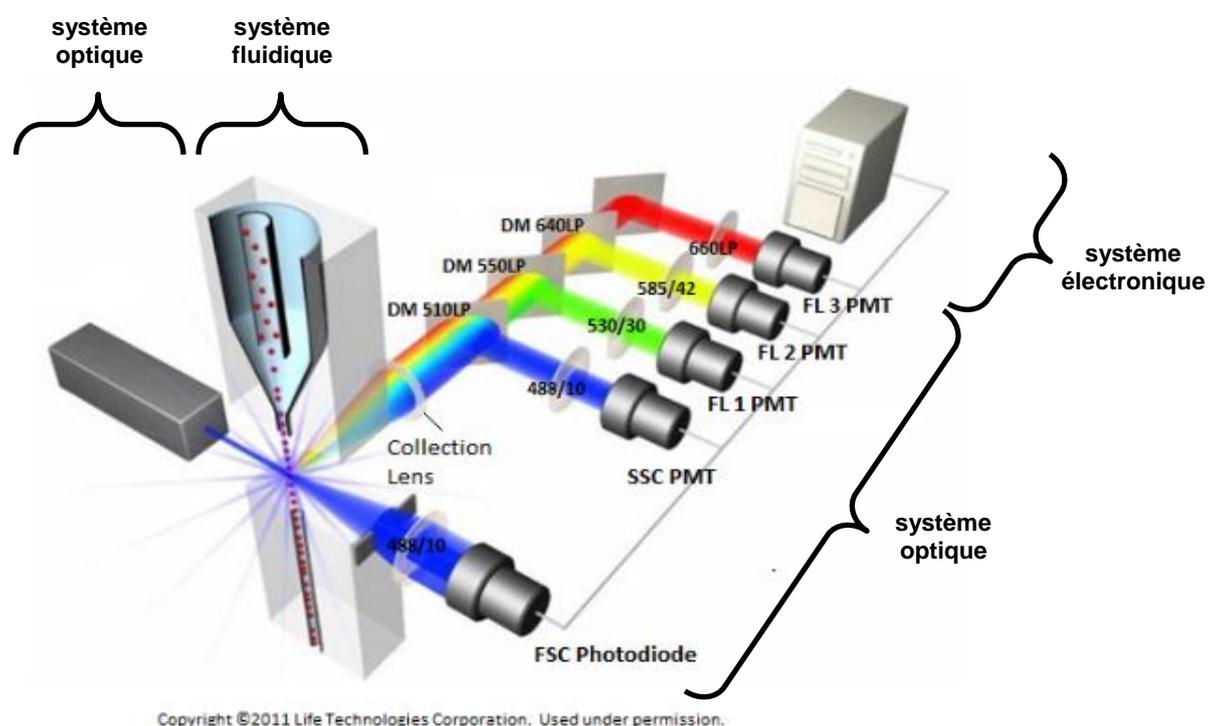
En hématologie biologique, le cytomètre en flux permet de réaliser un immunophénotype. Son objectif est de déterminer les caractéristiques immunologiques de

chaque cellule sanguine puis de les classer en populations homogènes. Pour cela, on utilise des anticorps monoclonaux (couplés à des fluorochromes ou molécules fluorescentes (42)) dirigés contre certains épitopes plus ou moins spécifiques des cellules que l'on cherche à analyser. Ces épitopes, membranaires ou cytoplasmiques, sont issus d'un grand nombre de familles moléculaires et sont regroupés sous le terme générique de « Cluster of Differentiation ou CD » (43). En nomenclature internationale, on les désigne par les initiales CD suivies d'un chiffre : par exemple CD45. L'immunophénotype d'un prélèvement sanguin ou médullaire est donc constitué par le panel des CD exprimés par les cellules de l'échantillon (44).

### 2.1.2. Composition d'un cytomètre

Le cytomètre en flux est un instrument complexe qui possède 3 systèmes : (voir figure 5)

- **le système fluide** qui entraîne et présente l'échantillon cellulaire devant le laser ;
- **le système optique** qui comprend les lasers comme source de lumière et les filtres optiques qui séparent la lumière émise et la dirigent vers les détecteurs ;
- **le système électronique** (45).



**Figure 5** : composants majeurs d'un cytomètre en flux (45)

**Légende** : PMT = photomultiplicateur ; DM = miroir dichroïque ; lens = lentille

### 2.1.3. Système fluïdique : la focalisation hydrodynamique

Le but de la focalisation hydrodynamique (voir figure 6) est de positionner l'échantillon au centre d'un liquide de gaine afin que le faisceau laser excitateur vienne frapper précisément les cellules en suspension une par une.

Pour cela, la suspension cellulaire est injectée à l'intérieur du flux de liquide de gaine à vitesse constante. Le liquide et la suspension ont des trajectoires parallèles mais des vitesses différentes : ils ne sont donc pas immédiatement miscibles. Le liquide de gaine, entraînant l'échantillon, s'écoule ensuite par une buse de faible diamètre. Le débit étant constant et le diamètre diminuant, la vitesse d'écoulement augmente. La suspension va alors avoir tendance à s'étirer et les cellules à se ranger plus ou moins en file indienne. En jouant sur le diamètre de la buse ainsi que sur la dilution de l'échantillon, on arrive à faire passer les cellules une par une devant le laser qui se trouve environ 1 mm après l'injecteur. Le débit d'injection de l'échantillon conditionne la qualité de la focalisation hydrodynamique puisque plus il est important, moins les cellules sont centrées dans le liquide de gaine (46) (47).

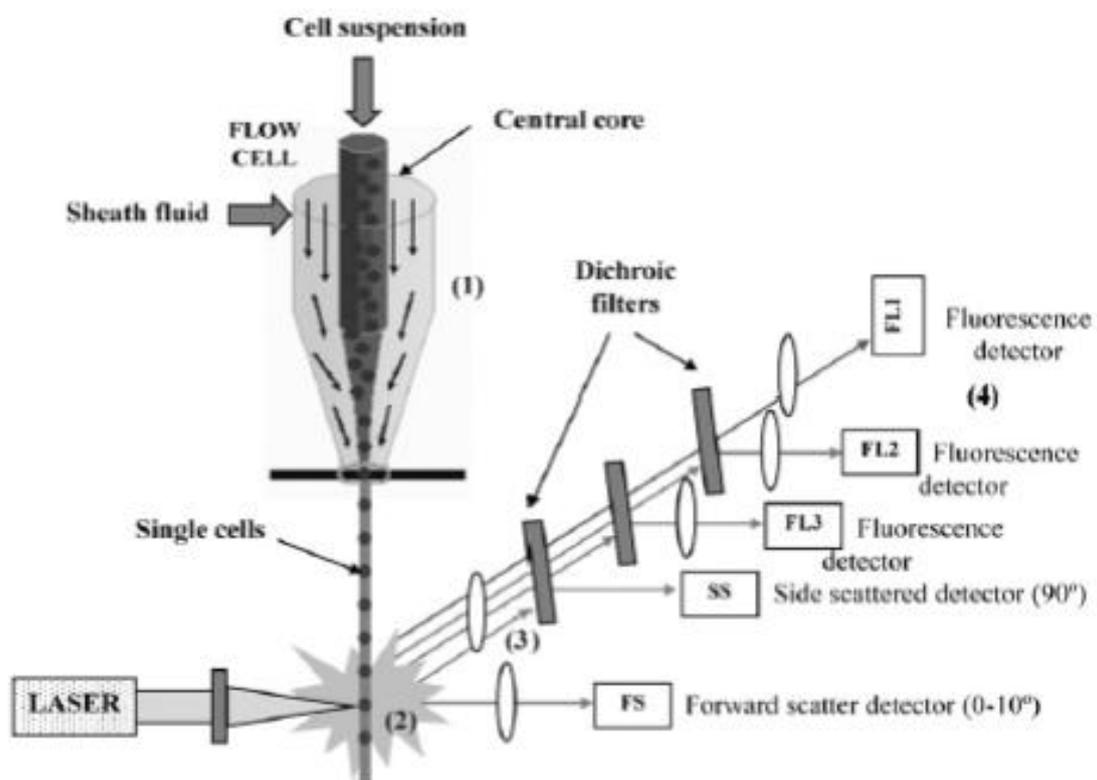


Figure 6 : focalisation hydrodynamique (48)

**Légende :** (1) focalisation hydro-dynamique ; (2) impact de la cellule par le laser ; (3) système optique ; (4) traitement du signal ; cell suspension = suspension cellulaire ; flow cell = flux cellulaire ; central core = colonne centrale ; sheath fluid = liquide de gaine ; single cells = cellules uniques ; dichroic filters = filtres dichroïques ; fluorescence detector = détecteur de fluorescence.

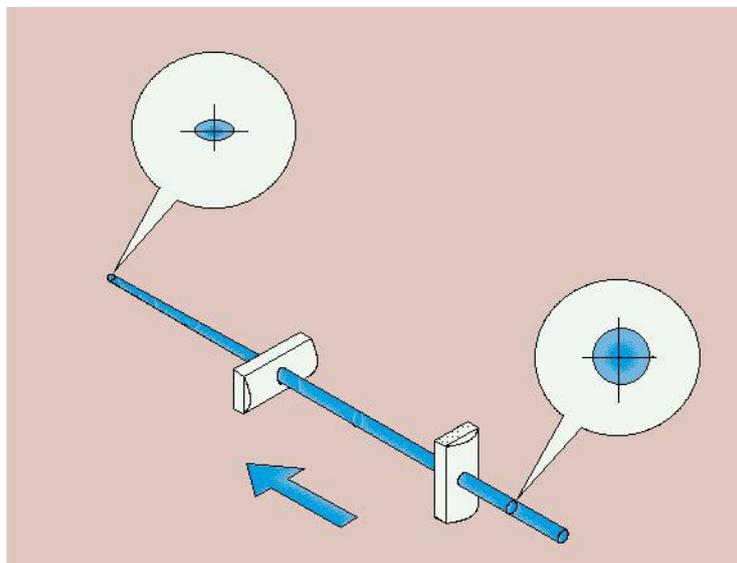
#### 2.1.4. Système optique

Le système optique, ou banc optique, comprend une source lumineuse d'excitation qui frappe les cellules marquées par des molécules fluorescentes. Les cellules diffusent donc de la lumière incidente et émettent de la fluorescence. Un système collecteur composé de miroirs dichroïques et de filtres achemine ensuite toute cette lumière vers des détecteurs : les photomultiplicateurs ou PMT pour « photomultiplier tube » (49).

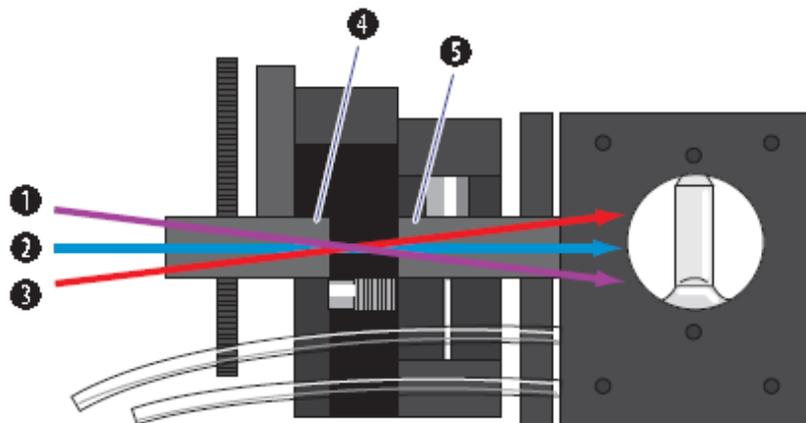
##### 2.1.4.1. Le faisceau lumineux excitateur

L'excitation lumineuse des cellules doit se faire par un faisceau facilement focalisable, de grande stabilité et de grande brillance. Le faisceau laser présente, en plus de ces propriétés qui conditionnent la précision et la sensibilité des résultats, un monochromatisme qui simplifie le filtrage. Cependant, la répartition de la lumière dans le faisceau étant gaussienne, elle nécessite un excellent centrage de l'échantillon dans le faisceau, d'où la focalisation hydrodynamique vue précédemment (46).

De plus, le faisceau en sortie du laser possède un diamètre approximatif de  $700\ \mu\text{m}$  ; il faut donc le faire passer par des lentilles de focalisation (voir figure 7) afin d'en réduire la taille jusqu' à  $10\ \mu\text{m} \times 80\ \mu\text{m}$  et d'en concentrer les photons pour gagner en précision et en sensibilité (40).



**Figure 7 : focalisation du laser**  
(Beckman Coulter®)



**Figure 8** : focalisation des 3 lasers (50)

(Beckman Coulter®)

**Légende** : (1) faisceau laser violet ; (2) faisceau laser bleu ; (3) faisceau laser rouge ; (4) lentille horizontale de mise en forme du faisceau ; (5) lentille verticale de mise en forme du faisceau

Actuellement, les lasers les plus utilisés sont les lasers argon-ion refroidis à l'air qui émettent dans le bleu à 488 nm mais ils tendent à être supplantés par les diodes laser. Selon les modèles de cytomètre, on peut trouver de un à plusieurs lasers (bleu, rouge et violet par exemple) permettant de multiplier le nombre de fluorochromes simultanément excitable (40) (voir figure 8).

#### 2.1.4.2. Les paramètres analysés

Lorsqu'une cellule, entraînée par le flux de liquide, traverse le faisceau laser exciteur, elle émet un certain nombre de signaux lumineux qui sont utilisés comme données sources par le cytomètre.

Ces signaux lumineux sont de deux types (51) :

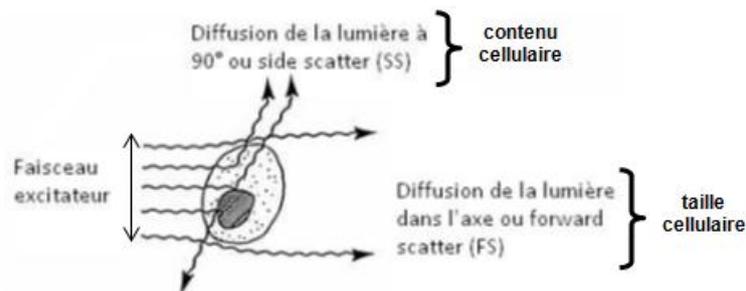
- ceux liés à la diffusion de la lumière dans l'axe et aux grands angles;
- ceux liés à l'émission de fluorescence.

#### 2.1.4.2.1. La diffusion de la lumière dans l'axe

Quand la cellule est frappée par le faisceau laser, elle diffuse une partie de la lumière reçue par sa surface membranaire. Cette diffusion de lumière est due à un phénomène de diffraction et est liée à la **taille de la cellule** (voir figure 9). Elle a la même longueur d'onde que le faisceau excitateur et est recueillie dans l'axe du laser. On l'appelle donc lumière diffusée aux petits angles ou « **forward scatter** » (**FS**) (46).

#### 2.1.4.2.2. La diffusion de la lumière aux grands angles

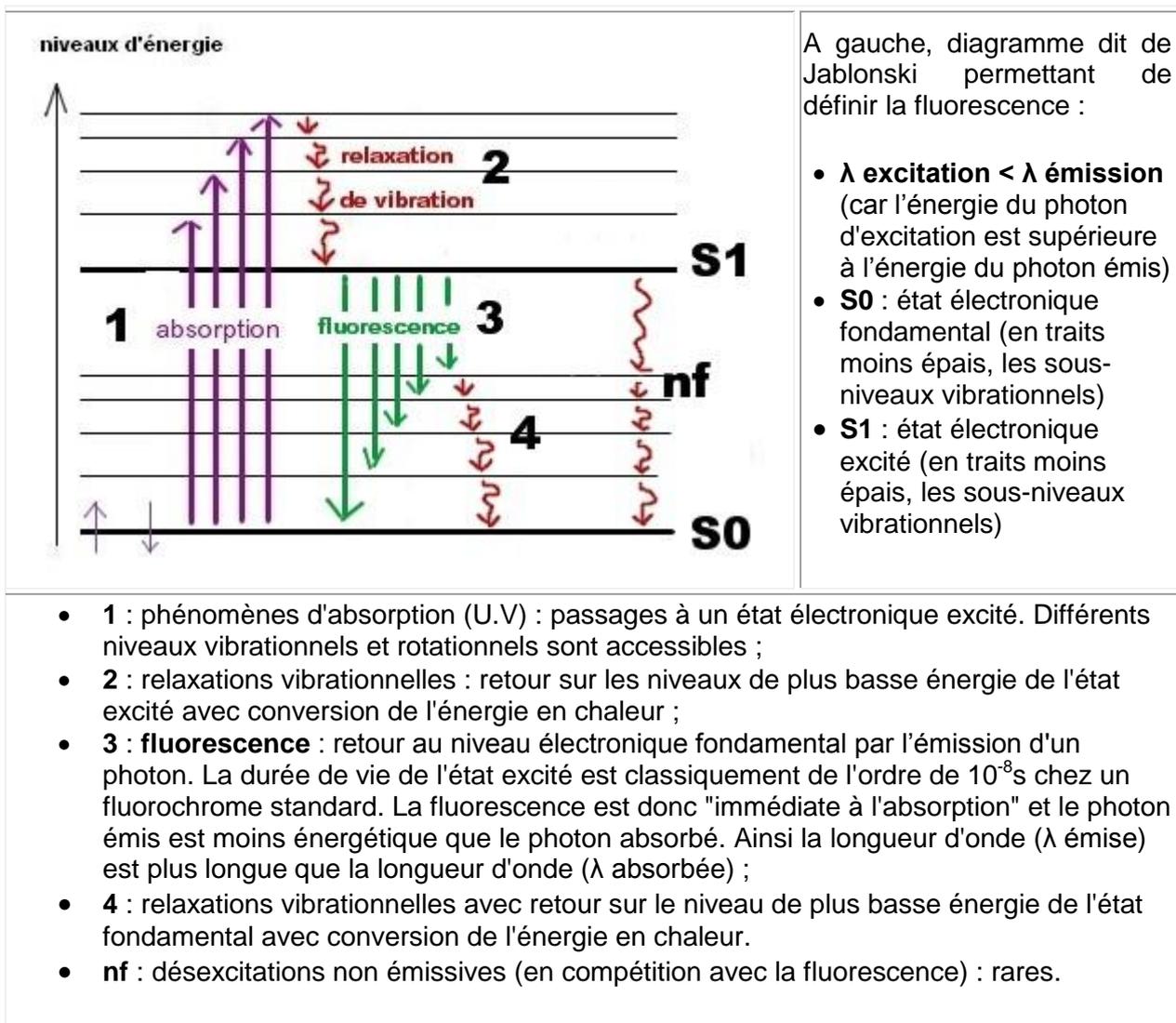
Une autre partie de la lumière reçue par la cellule traverse la membrane et est diffusée dans toutes les directions de l'espace par les organites intracellulaires. Cette diffusion est essentiellement due à des phénomènes de réfraction et de réflexion ; la lumière a donc la même longueur d'onde que le laser. Elle mesure l'hétérogénéité du **contenu cellulaire** (on pourrait dire sa « granulosité »). Elle est recueillie par un PMT placé perpendiculairement au flux lumineux excitateur (voir figure 9). On l'appelle diffusion aux grands angles ou « **side scatter** » (**SS**) (46).



**Figure 9** : diffusion de la lumière par la cellule (49)

#### 2.1.4.2.3. La fluorescence

La fluorescence est un phénomène lumineux au cours duquel une molécule (un fluorochrome dans le cas de l'immunophénotypage) absorbe de l'énergie lumineuse puis la restitue mais à une longueur d'onde supérieure à celle qui a été absorbée (voir figure 10). Au niveau moléculaire, les photons excitateurs provoquent une augmentation du niveau énergétique de certains électrons de la molécule fluorescente qui, en revenant à leur état basal, réémettent des photons de moindre énergie (52).



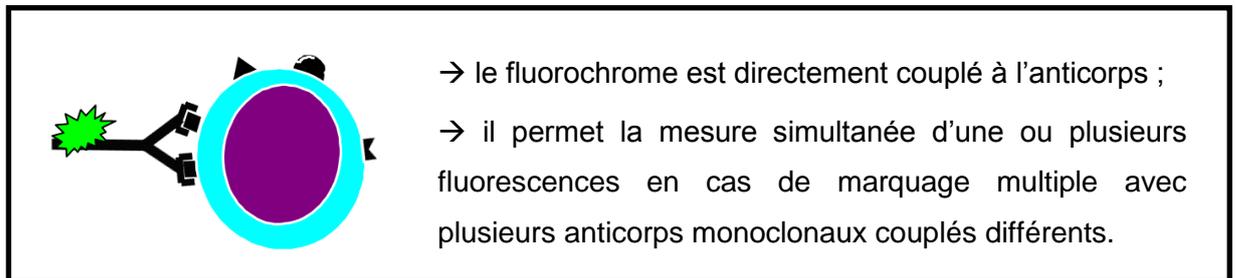
**Figure 10** : principes de base de la fluorescence (52)

La fluorescence est émise dans toutes les directions de l'espace ; elle est alors mesurée comme le side scatter, à  $90^\circ$  de l'axe du faisceau excitateur. Ce dernier étant beaucoup plus lumineux n'interfère donc pas dans la détection.

En hématologie, la fluorescence mesurée est le fait d'anticorps monoclonaux spécifiques de certains épitopes des cellules sanguines marqués par des fluorochromes. La fluorescence est donc spécifique de certaines molécules exprimées par la cellule. Pour finir, il faut préciser que chaque fluorochrome a un spectre d'absorption et une longueur d'onde d'émission qui lui sont propres (49).

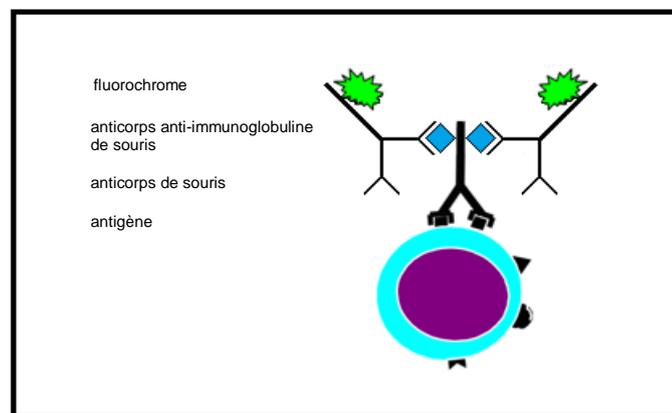
Les méthodes d'immunofluorescence se répartissent en deux groupes :

- les **réactions directes** où l'anticorps monoclonal est **directement couplé à un fluorochrome** (voir figure 11) :



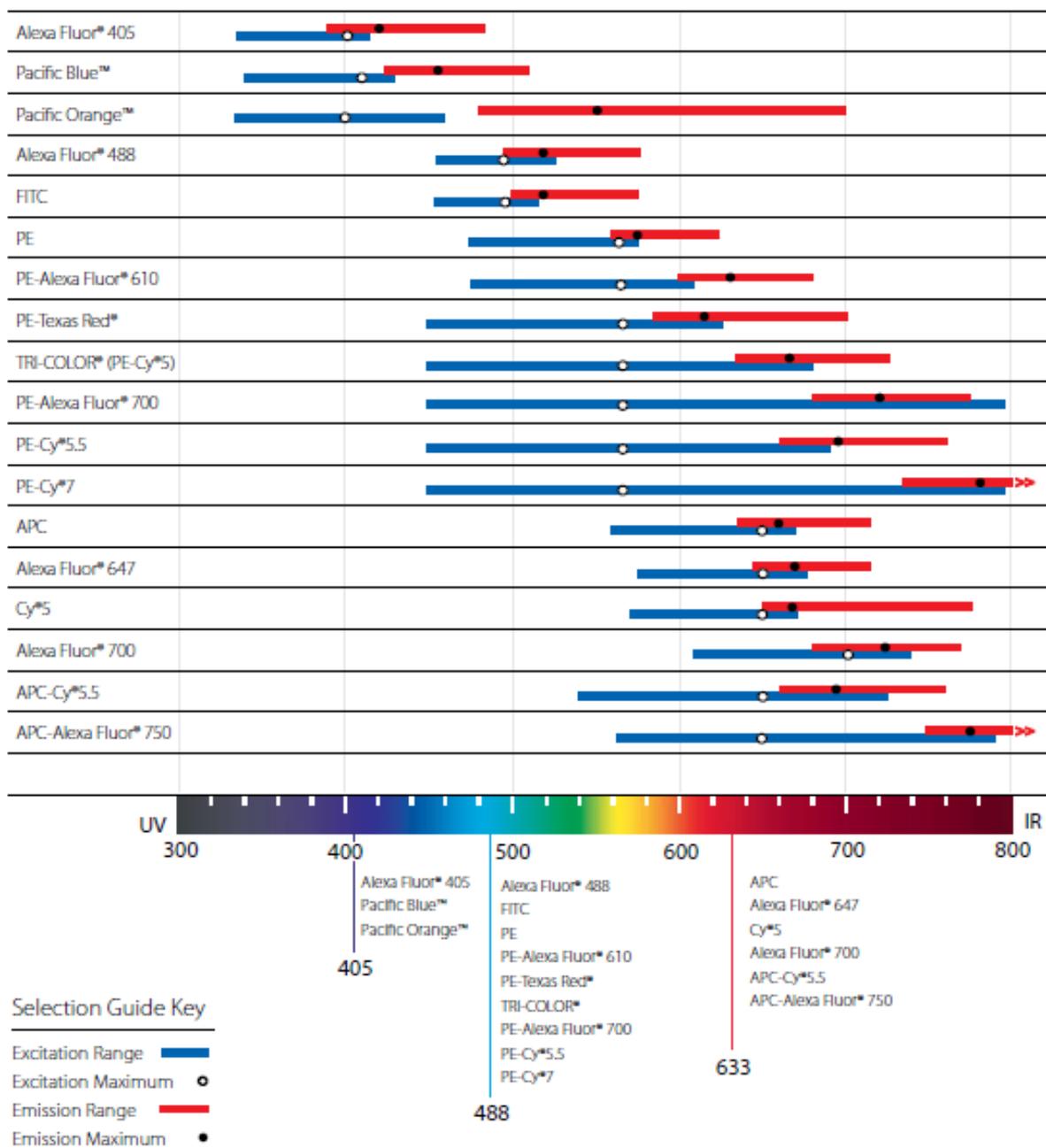
**Figure 11** : marquage direct

- les **réactions indirectes** où l'anticorps monoclonal est révélé par un **second réactif couplé au fluorochrome** (voir figure 12) :



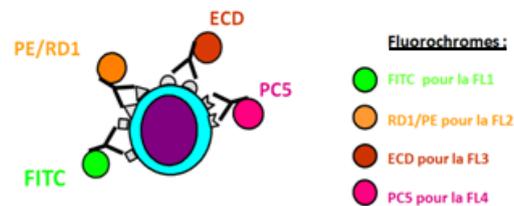
**Figure 12** : marquage indirect

Ces deux méthodes font appel à des réactifs fluorescents : les fluorochromes. Un exemple de spectres d'émission de fluorochromes utilisés en immunofluorescence est représenté **figure 13**.



**Figure 13** : principaux fluorochromes (bandes bleues : longueurs d'excitation et bandes rouges : longueurs d'émissions) (53)

Pour les marquages multiples, plusieurs fluorochromes sont utilisés simultanément (voir figure 14).



**Figure 14** : marquage direct multiple

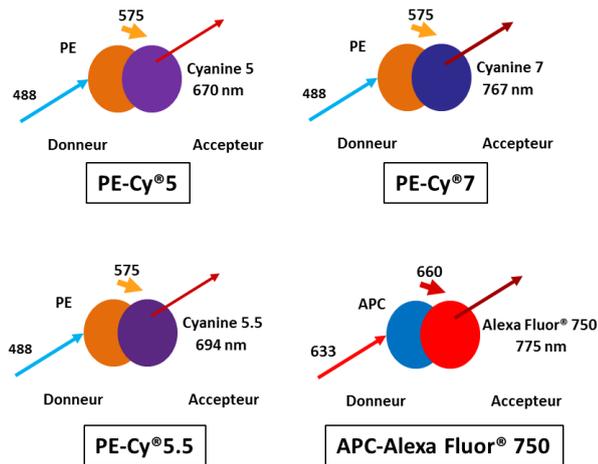
Dans ce cas, il faut que :

- leurs longueurs d'onde d'excitation correspondent à la source lumineuse du cytomètre (en général 488 nm pour les cytomètres les plus courants) ;
- leurs longueurs d'onde d'émission soient suffisamment éloignées pour que leurs signaux soient analysés séparément.

L'obstacle majeur dans les analyses multiparamétriques est constitué par le chevauchement important des spectres d'émission des fluorochromes employés pour révéler les anticorps monoclonaux. L'introduction d'un second laser, voire un troisième, a permis de vaincre une telle interférence en rendant possible l'excitation de plusieurs fluorochromes à des spectres d'excitation et d'émission bien distincts.

Actuellement, la nécessité d'un troisième marqueur pour caractériser les populations cellulaires a conduit à l'élaboration de nouveaux fluorochromes. Il s'agit des fluorochromes tandems. **Un tandem est constitué de deux molécules fluorescentes couplées par une liaison chimique** : (voir figure 15)

- une 1<sup>ère</sup> molécule, excitable par le laser 488 nm, joue le rôle de donneuse d'énergie ;
- le transfert d'énergie s'effectue *via* la liaison chimique liant les deux fluorochromes ;
- une 2<sup>ème</sup> molécule, acceptrice, reçoit l'énergie uniquement *via* la liaison chimique car elle n'est pas excitable à 488 nm. Elle réémet un signal à une longueur d'onde supérieure à celle de la molécule donneuse.



**Figure 15** : principaux fluorochromes tandems

(d'après Beckman Coulter® ; PE : PhycoErythrine ; APC : AlloPhycoCyanine ; 488 : laser Argon à 488 nm ; 633 : laser à 633nm)

#### 2.1.4.2.4. La collecte des signaux lumineux

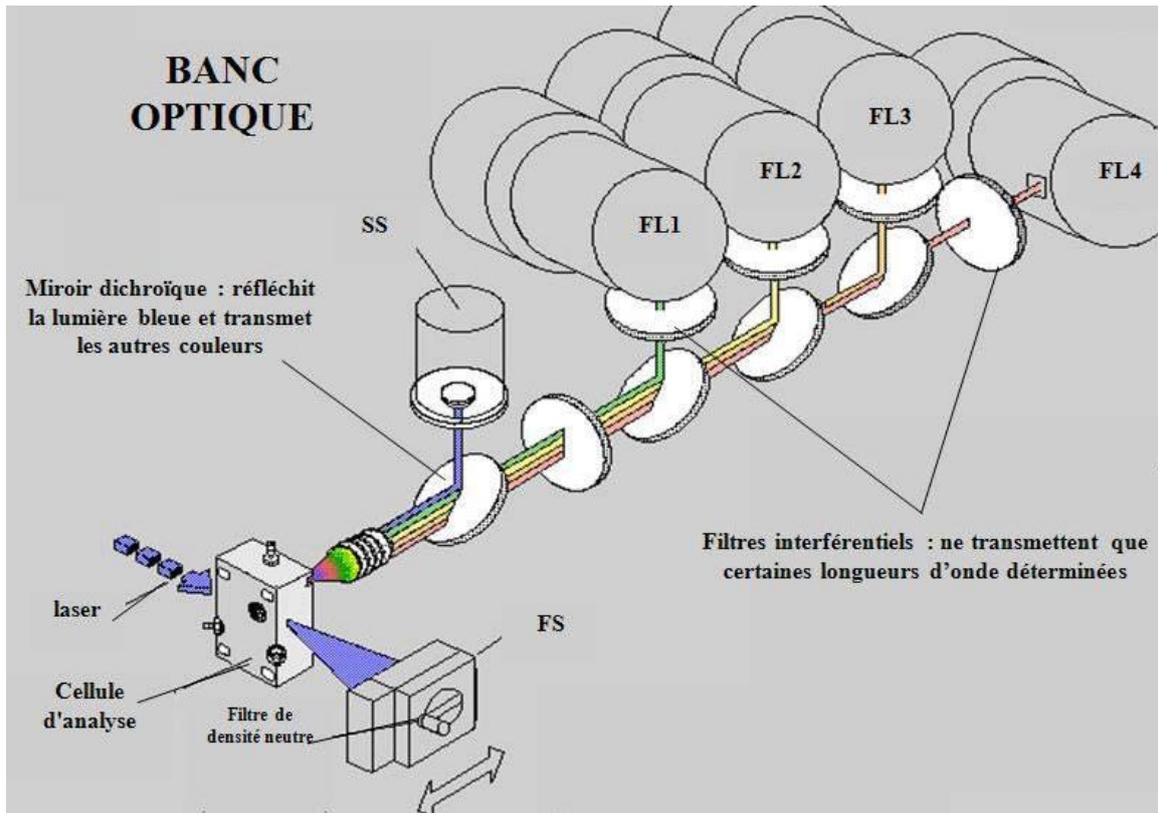
Les trois types de signaux lumineux sont mesurés dans deux directions de l'espace :

- le FS dans l'axe du laser ;
- le SS et la fluorescence perpendiculairement à l'axe du laser.

Pour le FS, il n'y a pas de problème pour la mesure du signal puisque qu'il n'est constitué que d'une seule longueur d'onde.

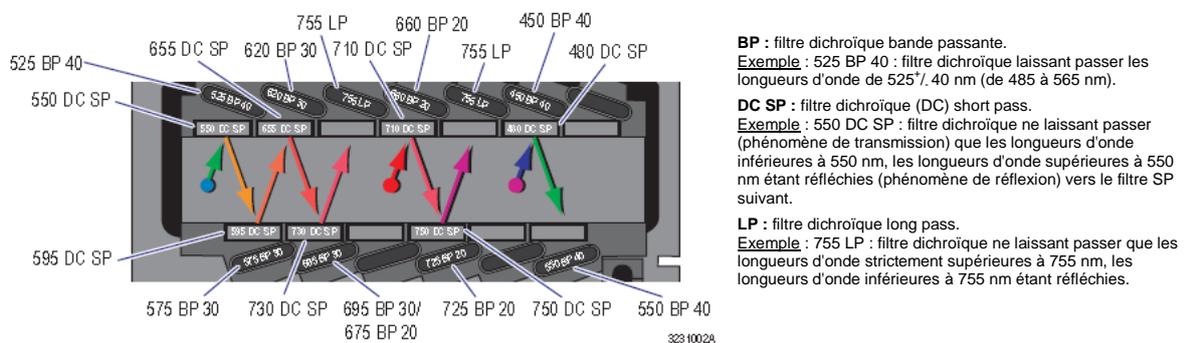
En revanche, à 90°, il faut « démêler » les différents types de signaux lumineux (voir figure 16) : le SS associé à une ou plusieurs fluorescences (en fonction du nombre de fluorochromes). Pour cela, on place sur le banc optique des miroirs dichroïques et des filtres interférentiels qui ne laissent passer qu'une partie de la lumière, afin d'acheminer jusqu'aux différents PMT, des faisceaux lumineux monochromatiques. Les miroirs dichroïques réfléchissent certaines longueurs d'ondes et transmettent les autres ; ils permettent donc de dévier une partie de la lumière vers un PMT.

Les filtres interférentiels bloquent certaines longueurs d'onde et permettent ainsi de purifier la lumière afin qu'elle soit quasi monochromatique en arrivant aux PMT (41) (47).



**Figure 16** : banc optique classique  
(Beckman Coulter®)

Sur les automates plus récents (voir figure 17), les positions des filtres dichroïques ont été efficacement conçues pour réduire le nombre de surfaces optiques que la lumière fluorescente doit traverser pour atteindre les détecteurs de lumière. Leurs emplacements par rapport à l'axe optique ont également été optimisés pour que la lumière passe systématiquement à travers chaque filtre.



**Figure 17** : banc optique récent (cytomètre NAVIOS®) (50)  
(Beckman Coulter®)

## 2.1.5. Du système optique au système électronique

### 2.1.5.1. Les photomultiplicateurs (PMT)

Les signaux lumineux sont recueillis par des photo-détecteurs et doivent maintenant être convertis en signaux électriques puis en données assimilables par un programme informatique.

La conversion est assurée par des détecteurs appelés photomultiplicateurs (ou PMT pour « photomultiplier tube »). Les PMT sont également dénommés FL<sub>n</sub> (1 < n < 10), FL signifiant détecteur de fluorescence. En pratique, un nom d'anticorps <sup>et/ou</sup> de son fluorochrome sont associés au PMT correspondant (exemple : FL1 = FITC ; FL2 = CD14 PE). Le principe de fonctionnement en est simple : les photons du faisceau lumineux sont acheminés vers le PMT et frappent ce dernier, générant ainsi la production d'un courant électrique. La quantité de courant générée dépend du nombre de photons frappant le PMT et va être amplifiée afin d'être comprise entre 0 et 10 V (46) (49).

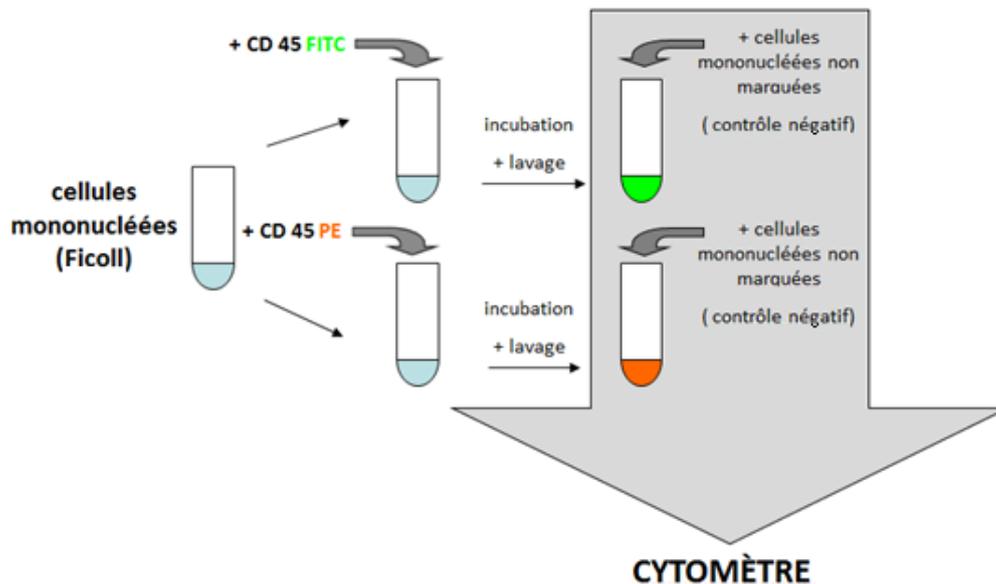
Il existe un autre type de détecteur de signal lumineux : la photodiode. Elle est moins sensible que le PMT et est donc utilisée pour recueillir le signal FS qui possède une intensité lumineuse beaucoup plus importante que le signal SS ou la fluorescence puisqu'il est émis dans l'axe du laser (49).

Les signaux électriques produits, s'ils sont supérieurs à un certain seuil préalablement fixé (le "threshold"), sont ensuite digitalisés avant de pouvoir être assimilés par l'informatique.

### 2.1.5.2. Réglage des PMT

Au préalable, il faut régler le cytomètre. Techniquement, nous ne parlerons ici que des réglages nécessaires à l'acquisition des données.

Pour régler le voltage et le gain des PMT, il faut passer une suspension de cellules marquées avec l'isotype correspondant au marquage que l'on souhaite observer ensuite. On définit grâce à ce marquage isotypique la limite entre les événements "positifs" et "négatifs" selon qu'ils dépassent ou non ce seuil. Pour que cette limite soit facile à mettre en œuvre, il faut obtenir de la suspension qu'elle produise un signal ni trop fort, pour laisser de la marge aux événements positifs d'apparaître, ni trop faible, pour pouvoir observer l'ensemble du nuage négatif (voir figure 18).



**Figure 18** : préparation cellulaire pour le réglage des PMT

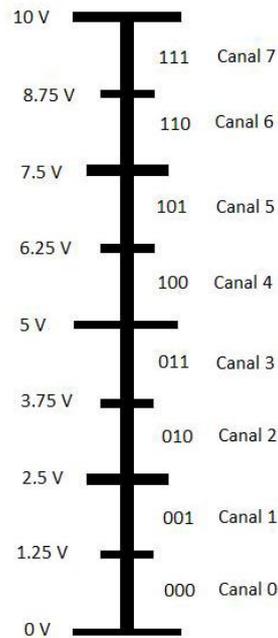
## 2.1.6. Système électronique

### 2.1.6.1. Le convertisseur analogique-digital

Le convertisseur analogique-digital permet de convertir un signal électrique continu en un numéro de canal discret généralement compris entre 0 et 1023 (correspond à un convertisseur 10 bits). À chaque cellule passant devant le faisceau laser et générant une impulsion électrique est attribué un numéro de canal. Ce numéro de canal est ensuite codé en bits (nombres binaires composés de 0 et de 1) qui sont utilisables par l'unité informatique (40) (46) (voir figure 19).

Exemple d'un convertisseur 3 bits :  
 3 bits =  $2 \times 2 \times 2 = 8$  combinaisons  
 de 0 et de 1 = 8 canaux différents.  
 $10 \text{ V} / 8 = 1.25 \text{ V}$ , donc chaque  
 canal couvre une plage de 1.25 V.

Une cellule générant une  
 impulsion de 3.988 V va se classer  
 dans le canal 3 entre les bornes  
 3.75 et 5 V.

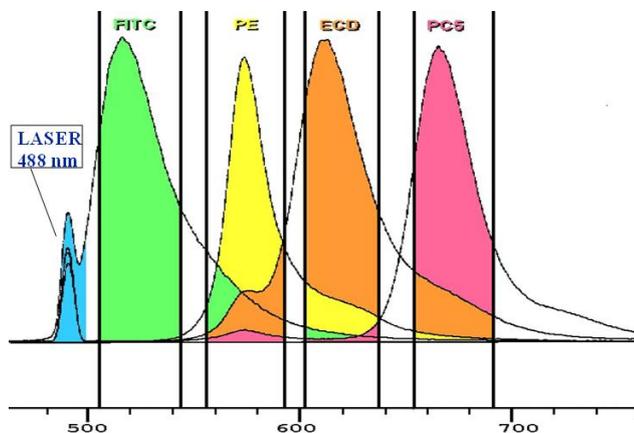


**Figure 19** : exemple de conversion analogique-digitale

Les données concernant chaque cellule sont enregistrées par le logiciel d'exploitation du cytomètre sous forme de fichiers portant l'extension LMD (List Mode Data) ou FCS (Flow Cytometry Standard) (49). Ces fichiers LMD ou FCS peuvent par la suite être retraités à distance de la session d'acquisition des données grâce à des logiciels informatiques spécifiques comme Kaluza<sup>®</sup>, Infinicyt<sup>®</sup>, Flow Jo<sup>®</sup>, CXP<sup>®</sup> ou Diva<sup>®</sup>.

### 2.1.6.2. La compensation du signal

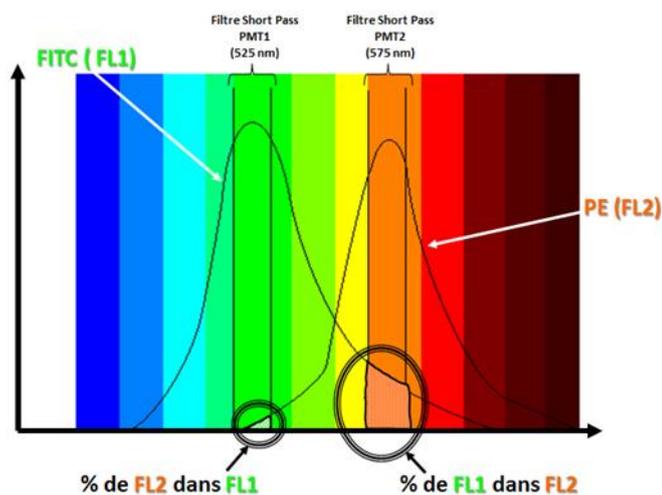
Les chevauchements des spectres d'émission des divers fluorochromes utilisés en cytométrie nécessitent l'emploi de compensations électroniques de fluorescence afin de soustraire la superposition de deux signaux de fluorescence (voir figures 20 et 21).



**Figure 20** : vue d'ensemble des fuites de fluorescence

Les compensations résultent de deux insuffisances. D'une part, les fluorochromes utilisés n'ont pas une raie d'émission fine, mais un spectre large ; d'autre part les trajets optiques des rayons lumineux ne permettent de sélectionner que des plages de longueurs d'onde. Il en résulte que certains fluorochromes vont émettre de la lumière dans des longueurs d'ondes captées par un PMT qui ne leur est pas destiné. Pour certains fluorochromes au spectre d'émission très large, ce phénomène peut polluer de nombreux PMT. Le problème posé est donc subtil : un signal fort dans un PMT<sub>1</sub> peut provoquer un signal dans un PMT<sub>2</sub> sans qu'aucun événement ne soit positif pour la couleur destinée au PMT<sub>2</sub>.

La solution informatique est simple en théorie: pour corriger l'intensité lumineuse émise par un fluorochrome (FITC par exemple) et perçue en trop par un PMT (PMT<sub>2</sub> par exemple), on soustrait cet excès d'intensité (pourcentage de FITC dans le PMT<sub>2</sub>) (voir figure 21).

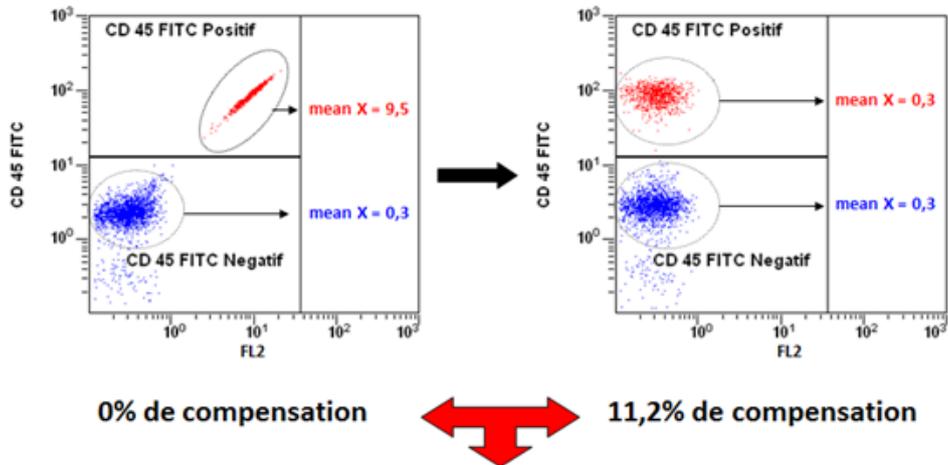


**Figure 21** : fuite de fluorescence entre deux fluorochromes (FITC et PE)  
(Beckman Coulter®)

Ainsi, sans compensation de fluorescence, une population cellulaire marquée en fluorescence verte (FITC) mais non marquée en fluorescence orange (PE) est positionnée sur la bissectrice de l'histogramme biparamétrique des deux fluorescences (voir figure 22).

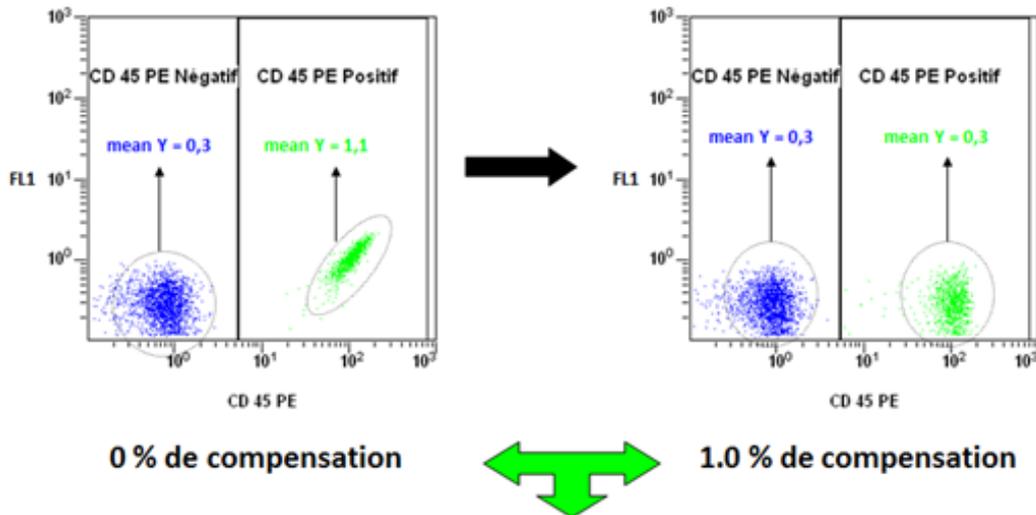
Le système de compensation permet de soustraire artificiellement la fluorescence orange qui résulte de la fuite de fluorescence du FITC dans le canal de la PE (voir figure 22).

### TUBE CD 45 FITC



$$FL2_{\text{vraie}} = FL2_{\text{mesurée}} - 11,2 \% FL1$$

### TUBE CD 45 PE



$$FL1_{\text{vraie}} = FL1_{\text{mesurée}} - 1 \% FL2$$

**Figure 22** : exemples de compensations (FL1 = FITC ; FL2 = PE)

Chaque pourcentage de compensation sera ainsi déterminé par l'analyse des cellules simplement marquées par les divers colorants. En pratique, on obtient une matrice de compensation puisque le signal de chaque PMT doit être compensé pour les signaux de chacun des autres.

## 2.2. Traitement des données

### 2.2.1. Représentation des données

Pour chaque cellule, on récupère essentiellement trois types de données :

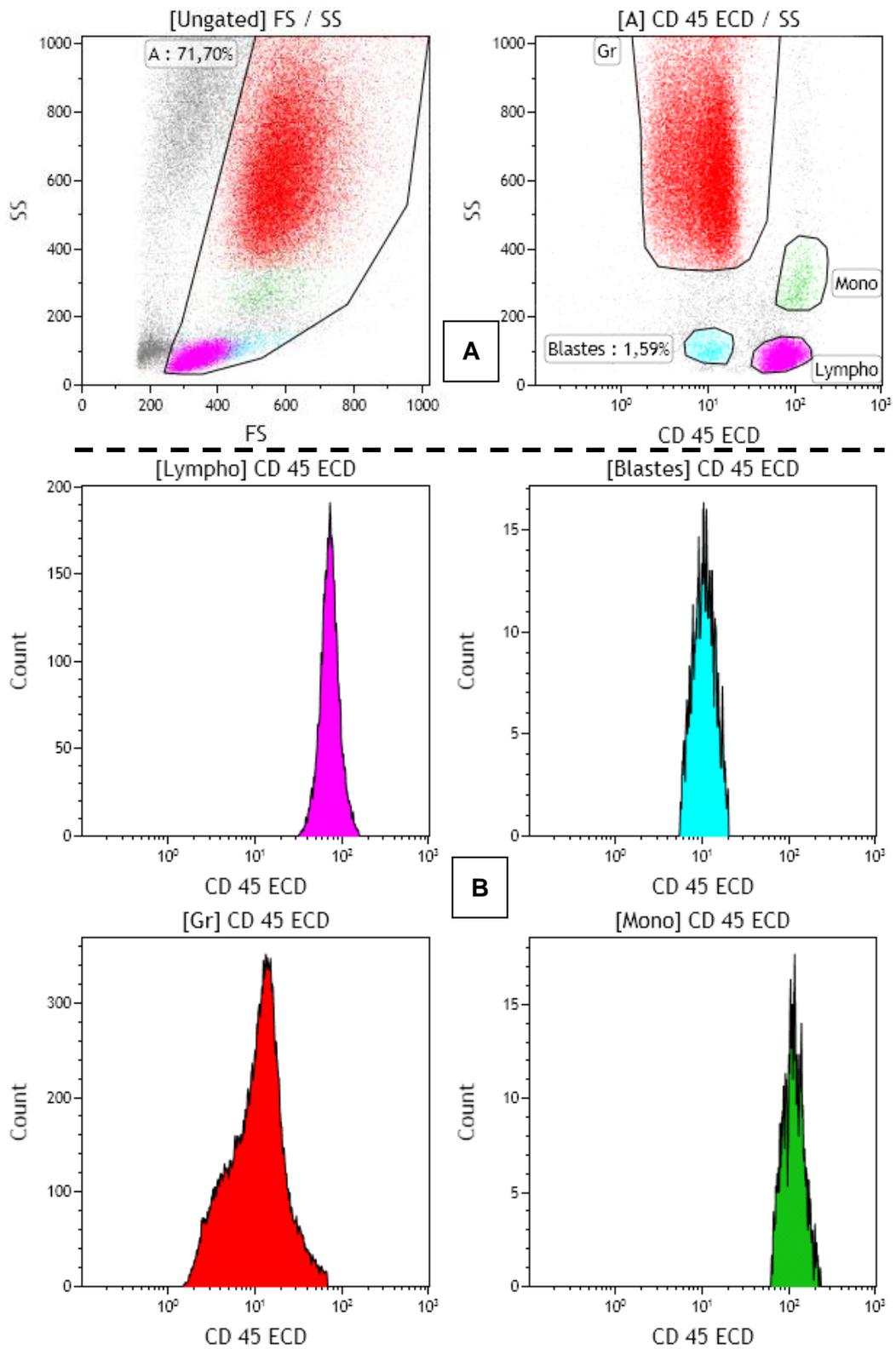
- le forward scatter (FS) qui correspond à la taille de la cellule ;
- le side scatter (SS) qui correspond à sa complexité interne ;
- une ou plusieurs fluorescences qui correspondent aux épitopes de la cellule reconnus par les anticorps monoclonaux.

Chacun de ces paramètres a une valeur comprise entre 0 et 1023. Or entre 10 000 et 1 000 000 « d'événements » ou de cellules sont en général analysés pour les prélèvements sanguins et médullaires. Le but de l'analyse informatique est donc de représenter clairement chacun des paramètres pour tous les événements étudiés.

Deux types de représentations sont classiquement utilisés (47) (voir figure 23):

- les **nuages de points** (ou dot-plots) qui montrent l'expression de deux paramètres l'un par rapport à l'autre (les axes représentant alors les intensités de fluorescence) ;
- les **histogrammes mono-paramétriques** qui montrent l'intensité de fluorescence en abscisse et le nombre d'événements en ordonnée.

Remarque : pour ce qui est des échelles au niveau des axes, on a coutume d'utiliser pour la lumière transmise (FS et SS) une échelle linéaire et pour la fluorescence une échelle logarithmique. C'est logique puisque la lumière transmise est puissante et se répartit sur tous les canaux alors que la fluorescence est faible et a tendance à s'afficher vers l'origine. De plus, les différences d'intensité de fluorescence entre cellules faiblement marquées et cellules fortement marquées rendent l'échelle linéaire inadaptée à leur représentation (les événements sont tassés aux extrémités des axes). L'utilisation d'axes logarithmiques permet alors de relativiser ces différences et d'afficher correctement toutes les cellules.



**Figure 23 : A :** dot-plots (biparamétriques) et **B :** histogrammes (mono-paramétriques) (Kaluza®)

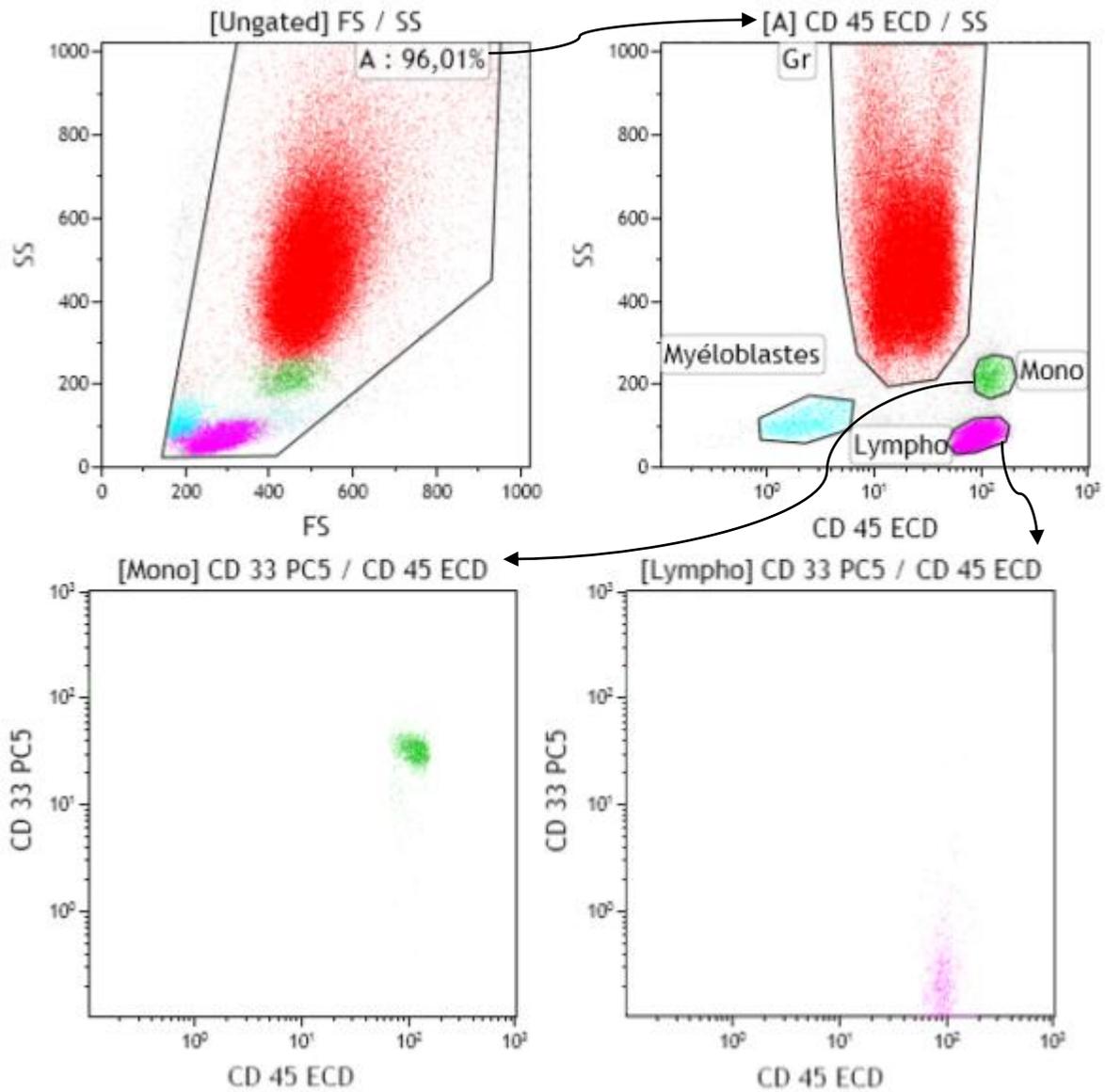
**Légende :** [Mono] = monocytes, [Gr] = granuleux, [Lympho] = lymphocytes et [Blastes] = myéloblastes

Les principes de représentation des données sont simples. Cependant, si l'on tient compte du fait qu'un cytomètre en flux peut maintenant détecter dix fluorescences simultanées (soit douze paramètres en comptant le forward scatter et le side scatter), il convient d'avoir une approche rigoureuse (voire stéréotypée) dans la stratégie d'analyse d'un prélèvement sanguin ou médullaire. En effet, aux douze paramètres analysés, correspondent soixante-six histogrammes possibles. Ceci explique l'existence de deux nouvelles formes de présentation des résultats à savoir le mode RADAR dans le logiciel Kaluza<sup>®</sup> et le mode ACP dans le logiciel Infinicyt<sup>®</sup>.

## **2.2.2. Principes généraux de la stratégie d'analyse**

### **2.2.2.1. Le concept de fenêtrage**

Le principe fondamental de l'analyse informatique en CMF s'appelle le fenêtrage (ou gating) et pourrait se traduire par conditionnement. Le but du fenêtrage est de sélectionner une population cellulaire homogène pour ensuite travailler sur cette population isolément du reste des cellules. Pour cela, on peut tracer un nouveau graphique et assujettir la population affichée sur ce dernier à une fenêtre (ou "gate") existante (voir figure 24). On peut donc déterminer l'immunophénotype de la population cellulaire d'intérêt (en fonction de la pathologie recherchée, par exemple).

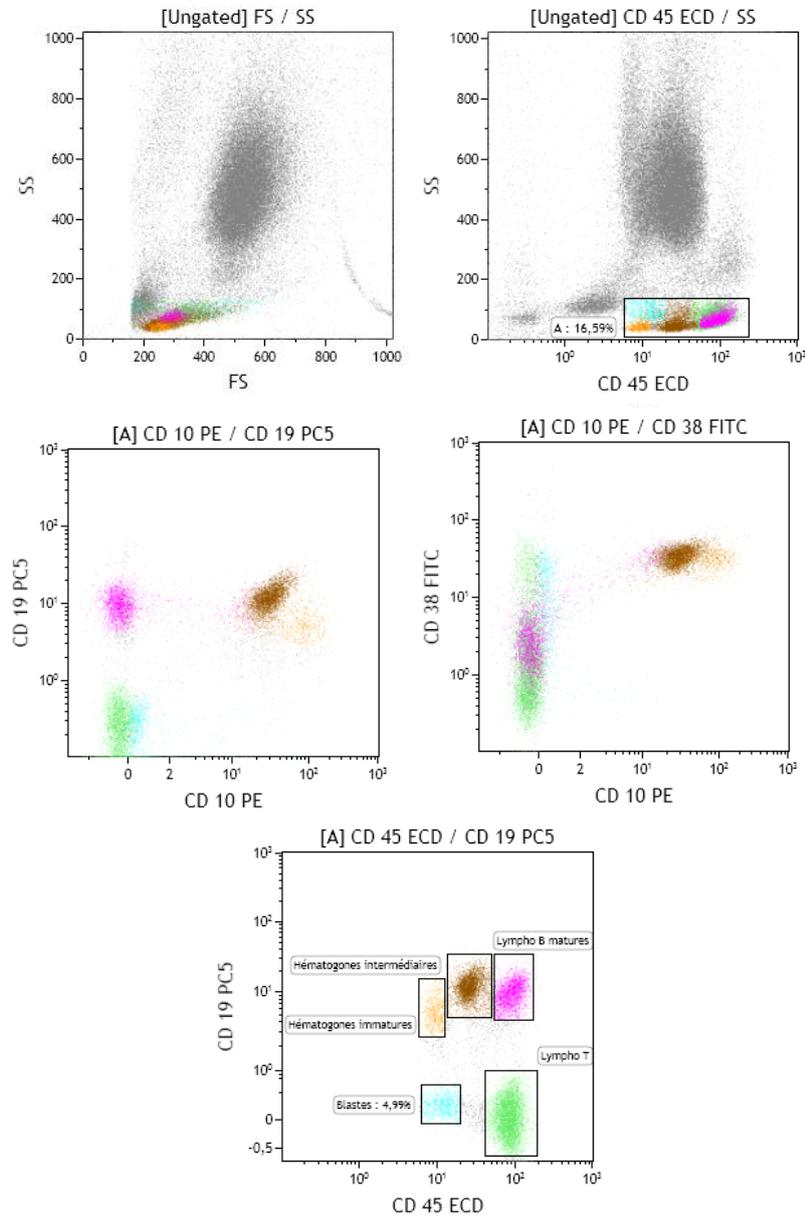


**Figure 24** : réalisation d'une fenêtre puis conditionnement d'un nouveau dot-plot sur cette fenêtre avec Kaluza®

**Légende** : [Mono] = monocytes, [Gr] = granuleux, [Lympho] = lymphocytes et [Myéloblastes] = myéloblastes

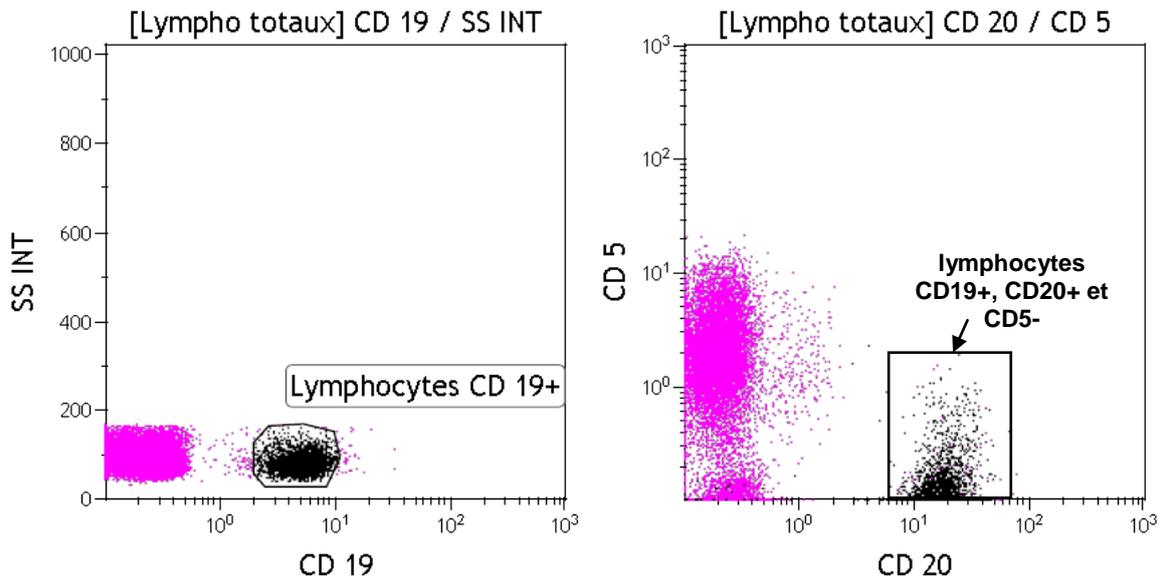
Il existe différents types de fenêtrage :

- le rétro-fenêtrage (ou back-gating) (voir figure 25) : il consiste en la réalisation d'une fenêtre de conditionnement sur un graphique afin d'identifier les cellules sélectionnées au sein de populations isolées sur des graphiques précédents ;



**Figure 25** : rétro-fenêtrage réalisé à partir du dot-plot CD19/CD45 : visualisation de la position et de la maturation des hématogones en lymphocytes B

- le fenêtrage croisé (ou cross-gating) (voir figure 26) : c'est une technique d'analyse introduite par le GTLLF (Groupe de Travail sur les Leucémies et les Lymphomes en Francophonie) et le GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies). Elle consiste en la visualisation de trois paramètres correspondant à de la fluorescence sur un même dot-plot (54).

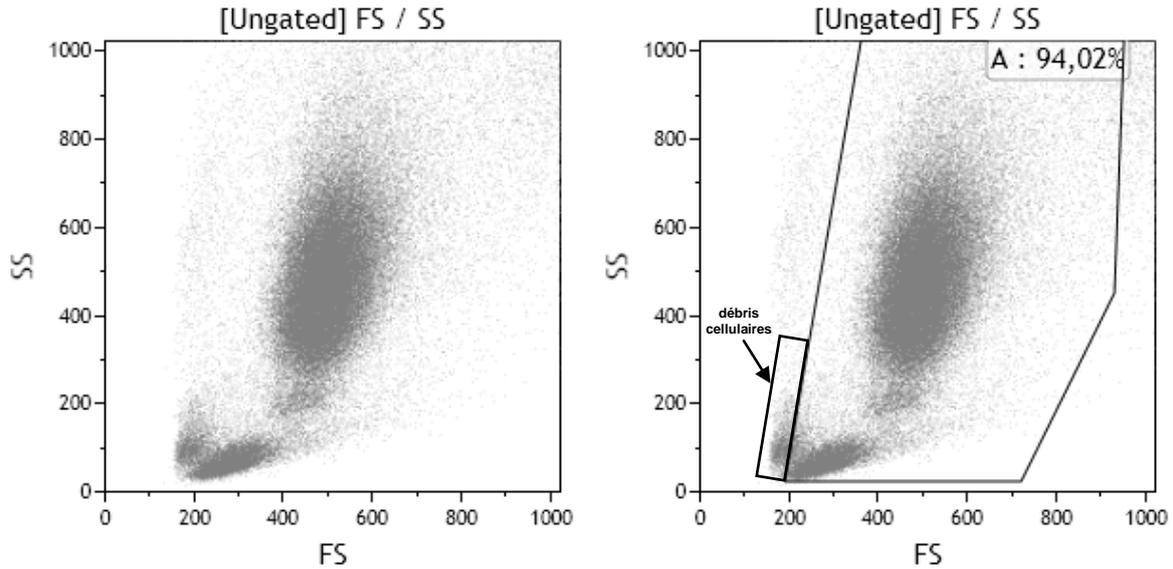


**Figure 26** : fenêtrage croisé permettant d'afficher sur un même graphique les lymphocytes CD19+, CD20+ et CD5- (Kaluza®)

### 2.2.2.2. Stratégie consensus

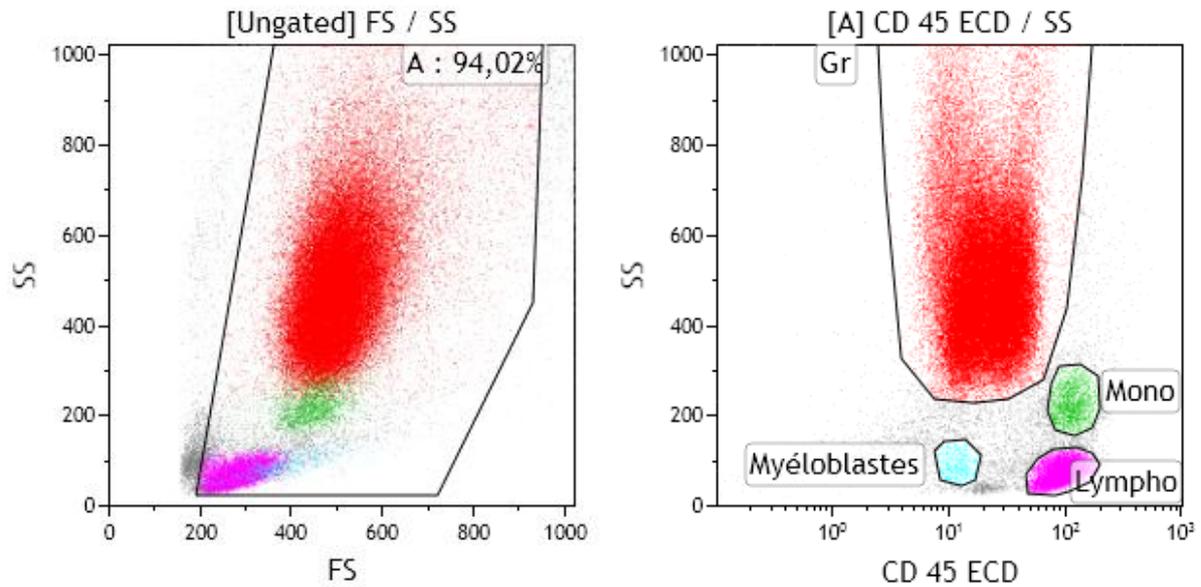
Comme cela a déjà été spécifié précédemment, les cytomètres en flux peuvent maintenant réaliser des analyses sur douze paramètres. De plus, le nombre d'événements étudiés pouvant facilement monter jusqu'à 1 000 000, il faut donc aborder ces immunophénotypes complexes avec une stratégie claire et surtout reproductible. Nous nous basons donc sur la proposition de consensus publiés conjointement par le GTLLF et le GEIL en Janvier 2010 (54).

La première étape de cette stratégie (voir figure 27) consiste en un dot-plot montrant en abscisse le forward scatter et en ordonnée le side scatter (c'est l'histogramme taille/structure). Il permet d'éliminer les débris cellulaires (dus à la lyse des globules rouges par exemple) grâce à la réalisation d'une fenêtre intitulée "live gate".



**Figure 27** : réalisation d'une "live gate" ([A]) sur dot-plot taille/structure (Kaluza<sup>®</sup>)

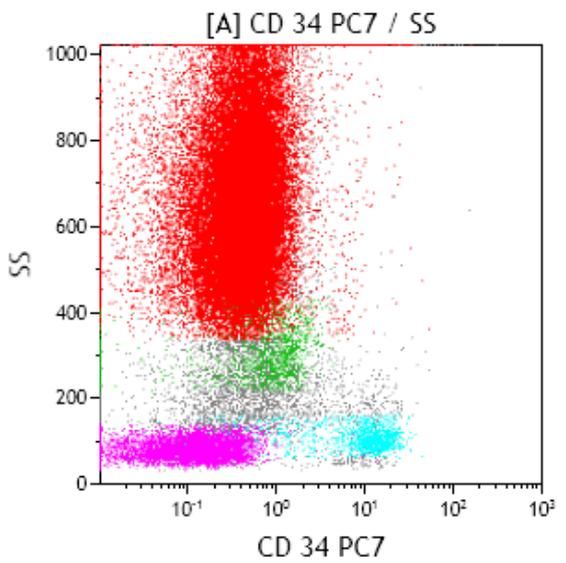
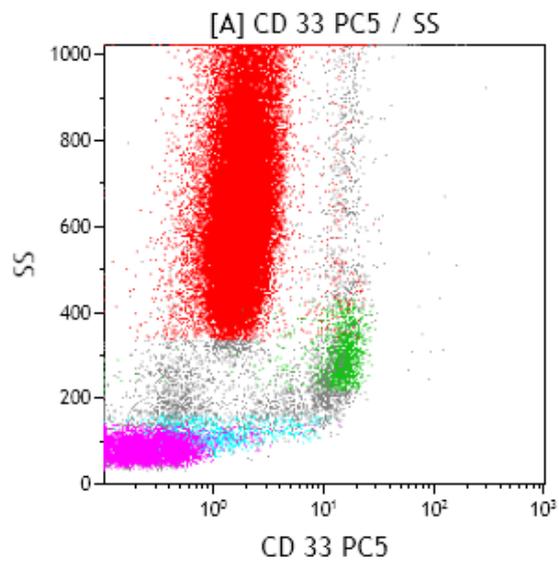
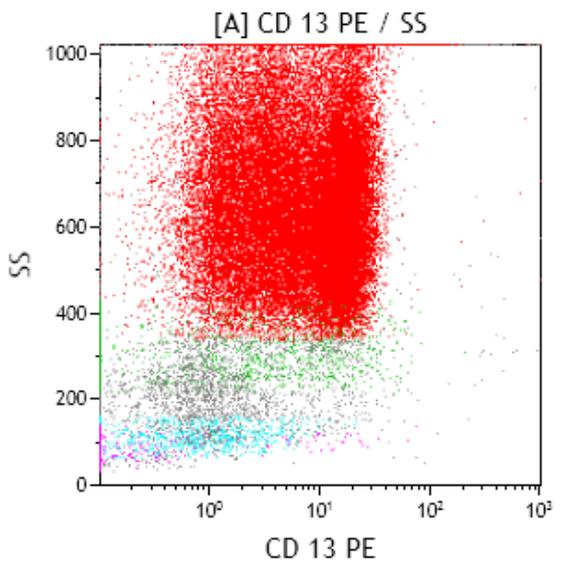
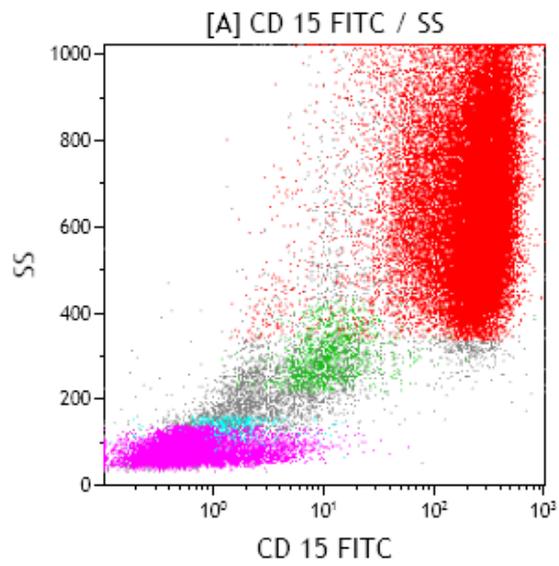
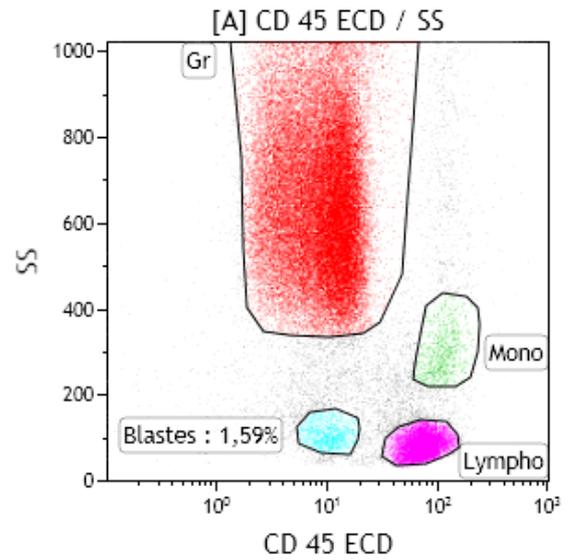
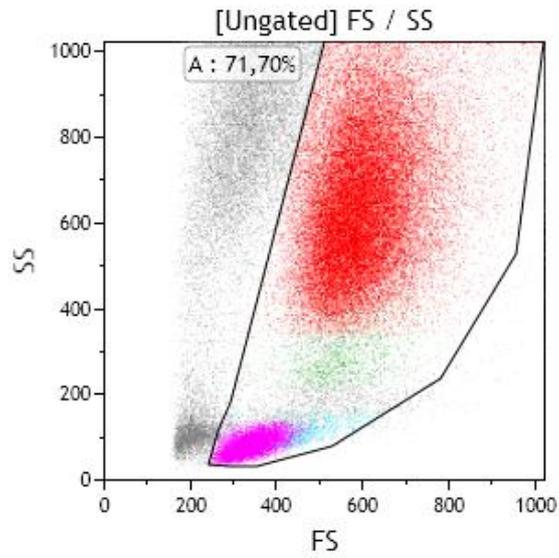
Le deuxième graphique fondamental est le dot-plot CD 45/SS conditionné sur la "live gate" (voir figure 28). Grâce à lui, les trois principales populations cellulaires du sang et de la moelle (granulocytes, monocytes et lymphocytes) peuvent être identifiées de manière simple et rapide. En se basant sur le consensus établi par le GTLLF et le GEIL, nous représentons les granulocytes en rouge, les monocytes en vert et les lymphocytes en fuchsia. Le reste des cellules non caractérisables d'emblée est dénommé « Bermudes » et est représenté en cyan (54) (55). Il faut bien comprendre que Bermudes est une zone d'extrême importance, puisqu'elle va, la plupart du temps, abriter les cellules anormales et les cellules immatures lors de l'étude du sang ou de la moelle. Cependant, la différenciation cellulaire étant un processus continu, on retrouve, pour une lignée (la lignée granuleuse par exemple) des cellules immatures dans Bermudes puis des cellules plus matures à la jonction avec la zone des granulocytes et enfin, des cellules tout à fait matures dans la zone des granulocytes. Les schémas de différenciation cellulaire ont donc conduit le GTLLF et le GEIL à définir des fenêtres de fusions : granulober, monober et lymphober (pour granulocytes/Bermudes, monocytes/Bermudes et lymphocytes/Bermudes). Ces fenêtres sont majoritairement utilisées lors de l'analyse de la moelle car elle contient tous les stades de différenciation des cellules hématopoïétiques, à l'inverse du sang, où seules les formes les plus matures sont normalement présentes.

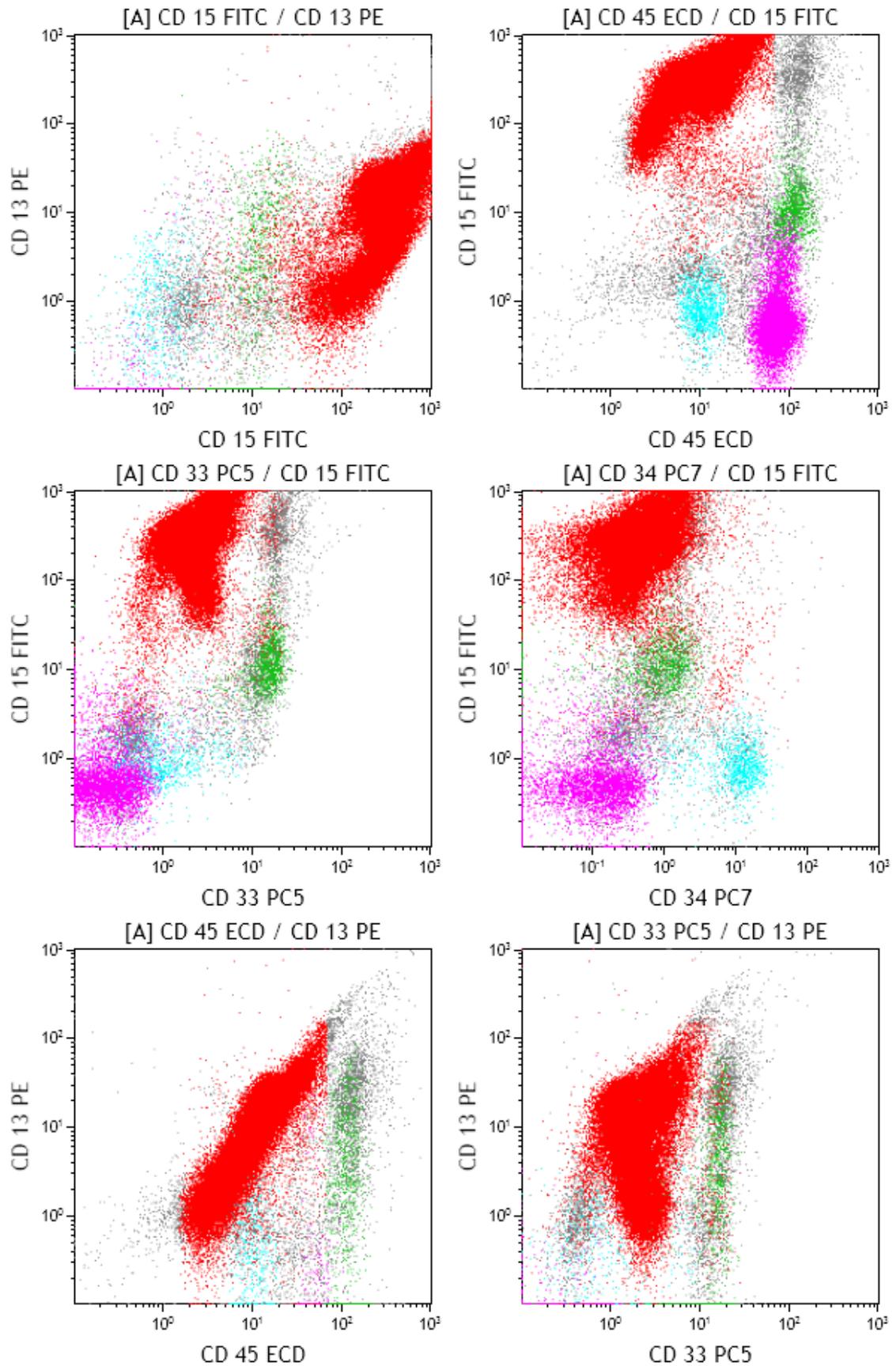


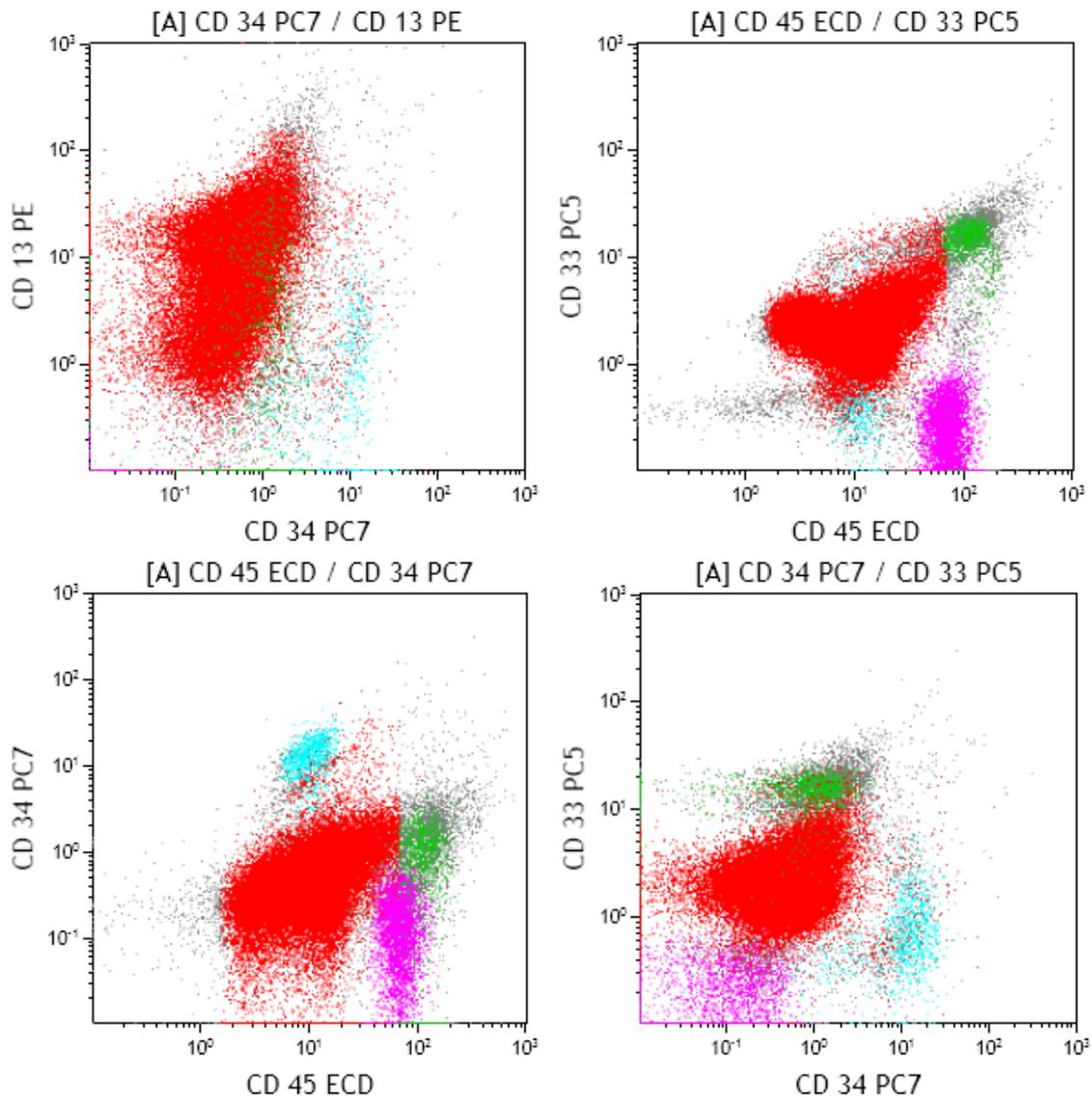
**Figure 28** : stratégie de fenêtrage sur un dot-plot CD45/structure

**Légende** : [Mono] = monocytes, [Gr] = granuleux, [Lympho] = lymphocytes et [Myéloblastes] = myéloblastes

Par la suite, on réalise un dot-plot CD X/SS pour chaque paramètre étudié afin de visualiser la positivité du CD X pour chacune des trois populations (granulocytes, lymphocytes, monocytes). Enfin, chacun des paramètres d'intérêt sera représenté l'un par rapport à l'autre (CD X/CD Y). Une page d'analyse stéréotypée peut ainsi être obtenue pour chaque panel d'anticorps testé (voir figure 29).







**Figure 29** : analyse systématique en cinq couleurs (FITC, PE, ECD, PC5, PC7)

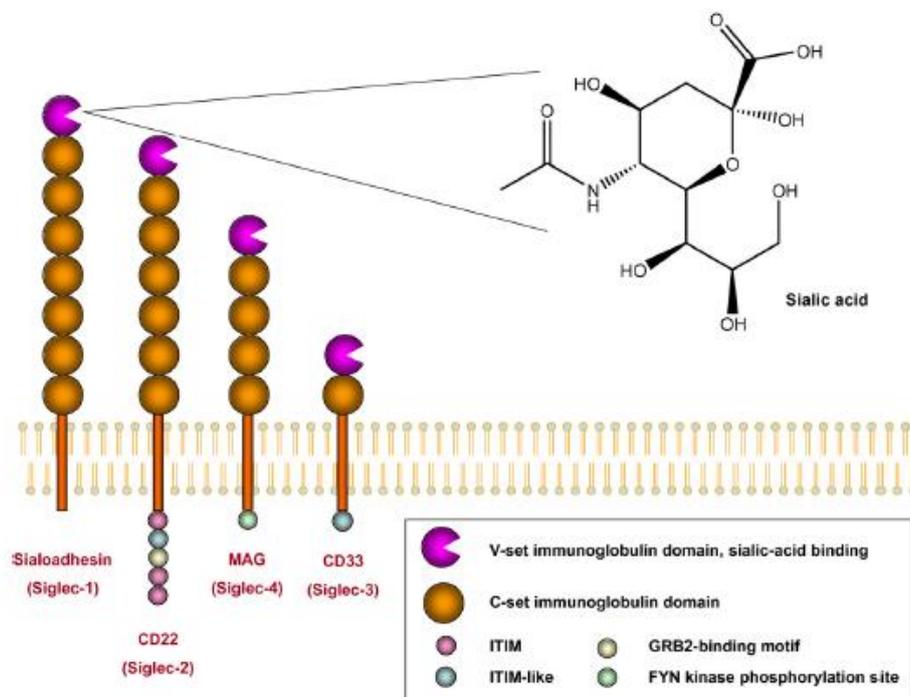
**Légende** : [Mono] = monocytes, [Gr] = granuleux, [Lympho] = lymphocytes et  
[Blastes] = myéloblastes

La stratégie d'analyse précédemment décrite constitue la base de ce que peuvent réaliser tous les logiciels d'exploitation des résultats de CMF depuis les années 2000 (56).

### 3. CD33, gemtuzumab ozogamicin (GO : MYLOTARG®) et premières avancées

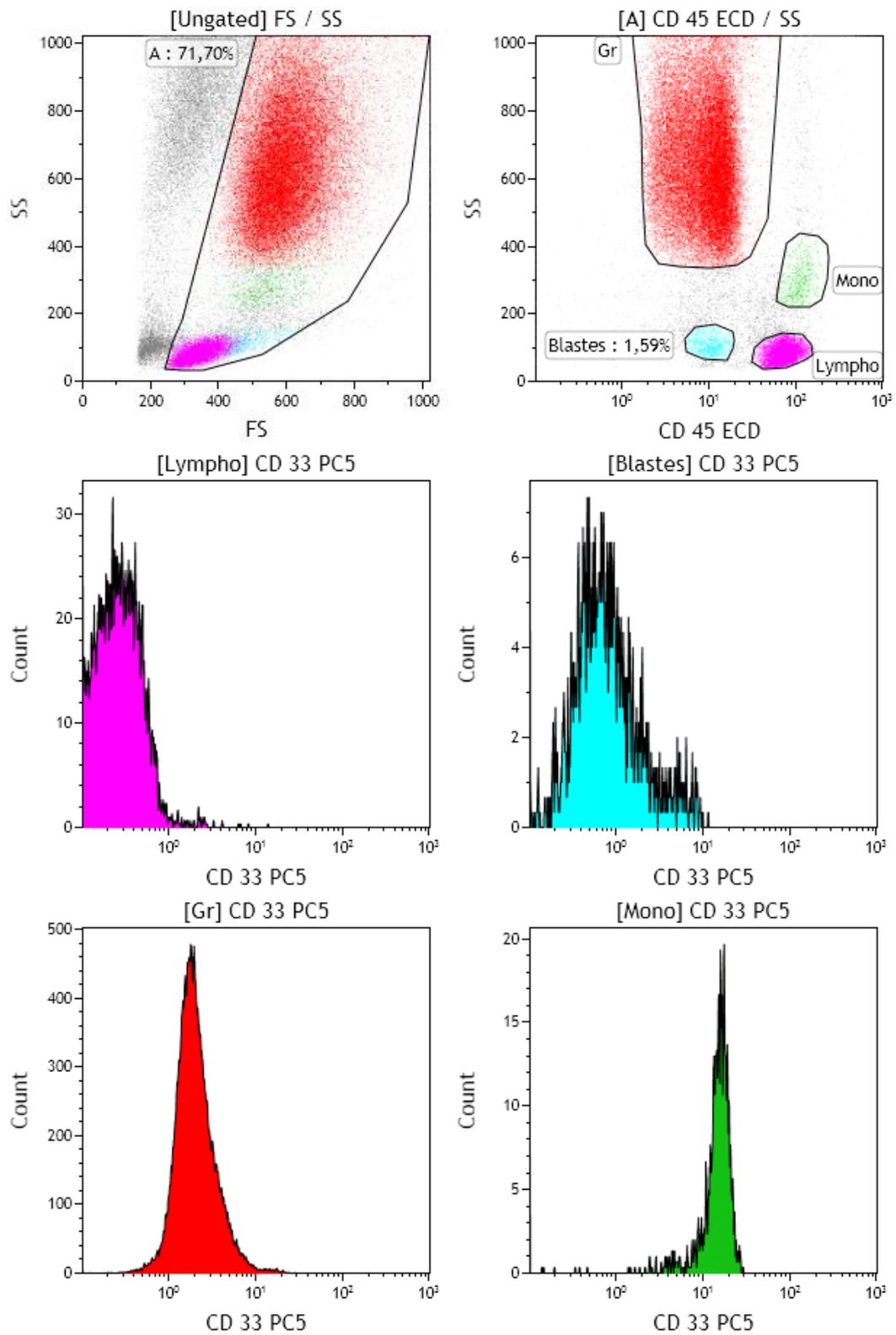
#### 3.1. Le CD33

L'antigène CD33 est une glycoprotéine transmembranaire de surface cellulaire de 67kD, spécifique de la lignée myéloïde (voir figure 30). Cet antigène est trouvé sur des cellules myéloïdes matures et immatures, érythroïdes, mégacaryocytaires et les progéniteurs multipotents. Toutefois, il n'est pas présent sur les cellules souches hématopoïétiques pluripotentes humaines normales CD34 positives ou les tissus non hématopoïétiques. Son expression est diminuée lors de la maturation de la lignée myéloïde, d'où une faible expression sur les granulocytes périphériques et les macrophages tissulaires (57) (voir figure 31).



Schematic structure of Siglec-family proteins in humans. Sialic-acid-binding immunoglobulin-like lectins (Siglecs) are type 1 membrane proteins containing an amino-terminal V-set immunoglobulin domain that mediates sialic-acid recognition and varying numbers of C2-set immunoglobulin domains. Siglecs can be divided into two groups based on sequence similarity and evolutionary conservation: the CD33-related siglecs, which are rapidly evolving and exhibit differences in composition between mammalian species; and a group comprising sialoadhesin, CD22 and myelin-associated glycoprotein (MAG), which are more distantly related and well conserved in mammals. The cytoplasmic tails of all Siglecs apart from sialoadhesin contain conserved immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs (ITIM).

Figure 30 : schématisation de la molécule CD33 (57)



**Figure 31** : marquage CD33 en cytométrie en flux sur moelle normale

**Légende** : monocytes [Mono] et granuleux [Gr] CD33 faiblement positifs, lymphocytes [Lympho] et myéloblastes [Blastes] CD33 négatifs ; seuil de positivité placé à  $10^0$

Le CD33 appartient à la superfamille des lectines de type immunoglobuline liant l'acide sialique (Siglecs pour sialic acid binding Ig-like lectins pour récepteurs endogènes qui lient l'acide sialique) (voir figure 30). Les Siglecs sont impliquées dans les interactions cellule-cellule et la signalisation dans le système immunitaire. La nature exacte des ligands CD33 demeure inconnue. Le CD33 contient deux domaines de type immunoglobuline, une région transmembranaire et une queue cytoplasmique avec un motif ITIM-like (immunoreceptor *tyrosine*-based inhibition motif). Cette structure est commune à toutes les Siglecs-3 (57).

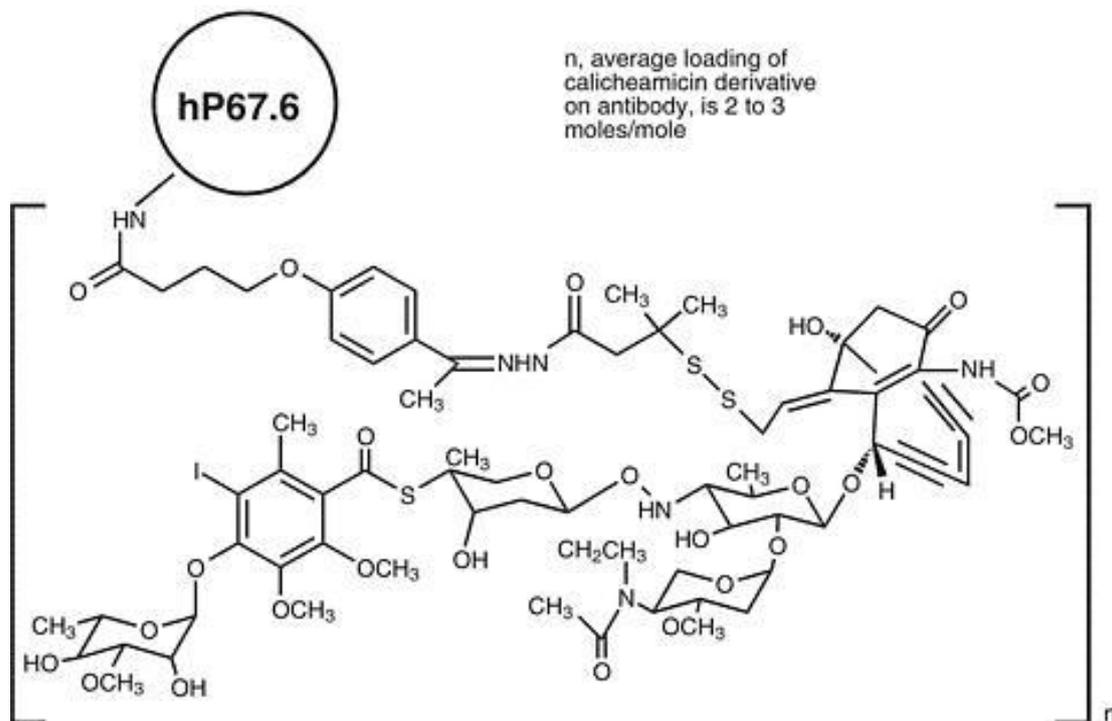
*In vitro*, on a montré que le CD33 pouvait agir comme un récepteur inhibiteur. En outre, l'ajout d'un anticorps anti-CD33 peut induire l'apoptose dans les cultures de cellules issues de leucémies aiguës myéloïdes (LAM). D'autres études ont documenté l'internalisation des complexes CD33/anti-CD33 par les cellules-cibles. Ces propriétés permettent l'utilisation d'anticorps dirigés contre le CD33 pour le traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). En aval, les étapes de la signalisation du CD33 ne sont pas bien caractérisées mais certains modèles expérimentaux suggèrent l'implication de Syk, c-Cbl, Vav et ZAP-70 (57).

On ne sait pas si la liaison du CD33 avec les anticorps active les événements de signalisation en aval *in vivo* ou si ces événements sont susceptibles d'affecter l'internalisation et le trafic intracellulaire des immunoconjugués anti-CD33. Le CD33 s'exprime sur environ 90% des cas de LAM (57) et est défini par la présence de l'antigène sur plus de 20% des blastes. Toutefois, l'expression de l'antigène est une variable continue et ce seuil de coupure est donc arbitraire. Le niveau d'expression superficielle de CD33 parmi la lignée myéloïde a été systématiquement étudié et des variations importantes ont été trouvées. Le nombre moyen de CD33 par cellule était, par ordre croissant, plus élevé dans les LAM, les syndromes myélodysplasiques ainsi que les leucémies myéloïdes chroniques et était plus faible dans les syndromes myéloprolifératifs. Les niveaux d'expression du CD33 ne corrôlaient pas avec le caryotype de leucémie chez les patients avec LAM (57). En moyenne, l'expression du CD33 sur les cellules CD33 positives était significativement plus élevée dans la moelle osseuse, comparée avec le sang périphérique mais cette étude n'a pas évalué le taux d'antigènes sur les populations de la moelle osseuse et le sang au sein de chaque patient (57). Fait intéressant, le niveau d'expression du CD33 peut être modulé par les cytokines comme le facteur de stimulation des colonies de granulocytes (G-CSF). Dans une étude, l'expression du CD33 par les blastes myéloïdes était augmentée par le G-CSF *in vitro* et l'amorçage par le GCS-F *in vivo* induit une augmentation de la proportion des blastes CD33 positifs (57).

### 3.2. Présentation du gemtuzumab ozogamicin (GO)

#### 3.2.1. Dénomination et description du médicament expérimental

Le GO (voir figure 32) est un agent de chimiothérapie composé d'un anticorps IgG<sub>4</sub> (*kappa*) recombinant humanisé (hP67.6) (58), conjugué avec un antibiotique cytotoxique antitumoral, la calichéamicine (isolée à partir de la fermentation de la bactérie *Micromonospora echinospora* ssp. *Calichensis*) (59). L'anticorps IgG<sub>4</sub> se lie spécifiquement à l'antigène CD33 présent à la surface des blastes et des cellules normales de la lignée myélomonocytaire mais pas sur les cellules souches hématopoïétiques normales (60). Par lui-même, l'anticorps hP67.6 n'est pas connu comme étant toxique (61).



**Figure 32** : schéma du gemtuzumab ozogamicin pour injection (MYLOTARG<sup>®</sup>) (60)

#### 3.2.2. Indication

Le GO était indiqué aux **Etats-Unis** pour le traitement des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes CD33 positives en première rechute. Les patients devaient avoir 60 ans ou plus et ne pas être considérés comme candidats pour d'autres chimiothérapies. La FDA (Food and Drug Administration) a retiré le médicament du marché en 2010.

En **France**, le GO est un médicament dit orphelin. L'ANSM (Agence Nationale de Sécurité du Médicament) lui a octroyé une autorisation temporaire d'utilisation (ATU) nominative (pour usage hospitalier seul) dans le cadre du traitement de patients âgés de plus de 60 ans, atteints de LAM avec CD33 positif, en rechute et non candidats à un

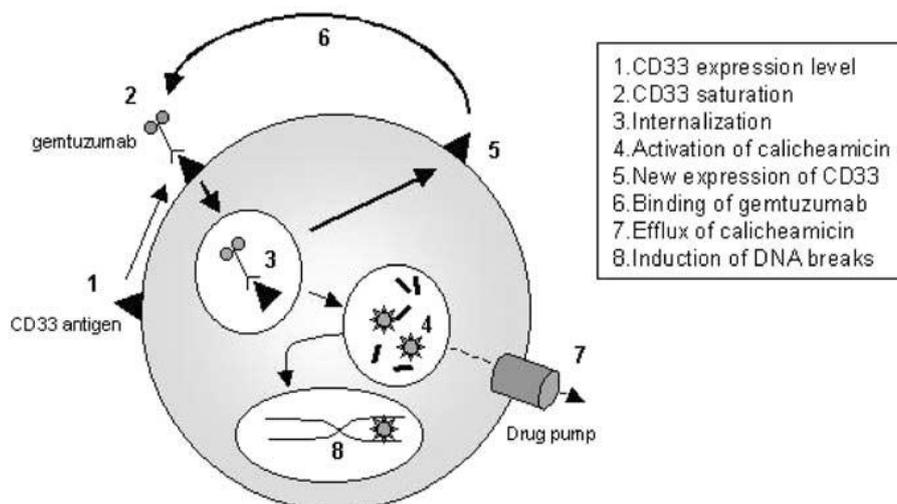
traitement par chimiothérapie conventionnelle. La posologie recommandée est de 9 mg/m<sup>2</sup> en perfusion IV de 2 heures ; le schéma classique comporte deux doses à 14 jours d'intervalle. Le GO se présente sous la forme d'une poudre (solution pour perfusion) ; chaque flacon contient 5 mg du principe actif.

Pour rappel, l'ATU nominative concerne un seul malade nommément désigné et ne pouvant participer à une recherche biomédicale. Elle est délivrée à la demande et sous la responsabilité du médecin prescripteur.

### 3.2.3. Mécanisme d'action du GO

Le GO est dirigé contre l'antigène CD33 exprimé par les cellules hématopoïétiques (voir figure 33). La liaison du GO repose sur le niveau d'expression cellulaire du CD33. Après la perfusion de GO, les antigènes CD33 sont rapidement saturés et les complexes GO/CD33 sont ensuite internalisés. Dans les lysosomes, le lien labile est hydrolysé, suivi de l'activation de la calichéamicine et de la dégradation de la partie anticorps du GO. Après internalisation, de nouveaux antigènes CD33 sont rapidement exprimés sur la membrane cellulaire et peuvent se lier au GO, ce qui entraîne un processus continu d'internalisation du GO tant que la concentration de GO dans le sang périphérique est en excès (60).

La calichéamicine active entre dans le noyau et induit des cassures de l'ADN double brin, ayant finalement pour résultat, l'induction de l'apoptose (62).



**Figure 33** : action du GO et paramètres affectant son efficacité (62)

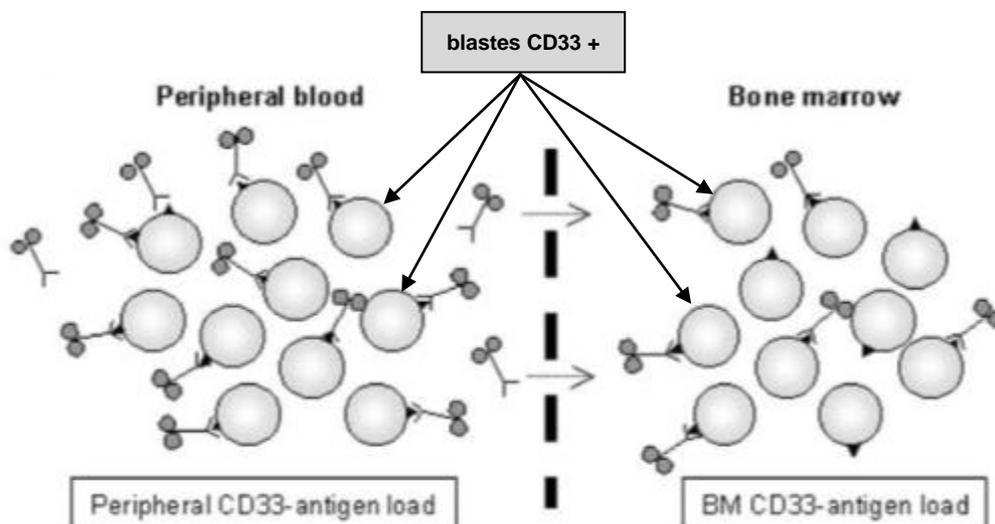
### 3.2.4. Mécanismes de résistance

Au niveau **cellulaire**, la calichéamicine active peut être extraite hors de la cellule par des pompes (mécanismes d'efflux) telles que Pgp et MRP1 (63).

En réalité, il existe probablement toute une variété de mécanismes de résistance à l'échelon cellulaire (63) :

- altérations dans le processus d'internalisation, ce qui entraîne une diminution d'absorption ;
- différences de trafic intracellulaire ;
- autres systèmes d'efflux ;
- augmentation de la capacité des cellules à réparer leur ADN ou à prévenir les cascades conduisant à l'apoptose.

En plus des paramètres cellulaires, des paramètres **systemiques** sont impliqués dans l'efficacité du GO (voir figure 34). En effet, le GO peut être « consommé » par les cellules leucémiques CD33 positives présentes dans le sang périphérique. Plus ces cellules « consomment » du GO, plus le taux d'anti-CD33 dans la moelle osseuse diminue (62). C'est pourquoi, le GO doit préférentiellement être administré à des doses plus élevées ou répétées, ou de préférence, après réduction du pourcentage des cellules leucémiques par une chimiothérapie classique préalable (62).



**Figure 34** : équilibre du taux de GO entre le sang et la moelle en fonction du pourcentage des blastes (62)

### 3.2.5. Résultats d'études cliniques internationales : des débuts difficiles pour le GO

#### 3.2.5.1. Etudes cliniques internationales (60)

L'efficacité et l'innocuité du GO en monothérapie ont été évaluées chez 277 patients (64) dans trois études différentes (65) chez des patients en première rechute de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec blastes CD33 positifs. Dans les études 1 et 2 (64), les patients étaient âgés de 18 ans ou plus et avaient une première durée de rémission d'au moins 6 mois. Dans l'étude 3 (64), seuls les patients de 60 ans ou plus étaient inclus et leur première rémission devait avoir duré pendant au moins trois mois. Ont été exclus les patients atteints de leucémie secondaire ou les patients dont le nombre de globules blancs était supérieur ou égal à  $30000/\text{mm}^3$ . Certains patients ont été traités par hydroxyurée ou par leucophérèse afin de diminuer le nombre de globules blancs en-dessous de  $30000/\text{mm}^3$  et ainsi, minimiser le risque du syndrome de lyse tumorale. Le traitement a reposé sur deux doses de  $9 \text{ mg}/\text{m}^2$  séparées par 14 jours et un suivi de 28 jours après la dernière dose. Au total, 157 patients étaient âgés de 60 ans ou plus.

L'objectif principal des trois études cliniques reposait sur le **taux de rémission complète (CR)**, définie ainsi : (64)

- absence de blastes dans le sang périphérique ;
- $\leq 5 \%$  de blastes dans la moelle osseuse (observation de la morphologie au microscope) ;
- hémoglobine  $\geq 9 \text{ g}/\text{dL}$ , plaquettes  $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$  et numération absolue des neutrophiles  $\geq 1500/\text{mm}^3$  ;
- aucune transfusion de globules rouges pendant deux semaines ; aucune transfusion de plaquettes pendant une semaine.

En plus de la CR, **une seconde catégorie de réponse, CRp**, a été définie : (64)

- CR sans récupération des plaquettes  $\geq 100\ 000/\text{mm}^3$ . Cette catégorie a été ajoutée car le GO retarde la récupération plaquettaire chez certains patients.

L'équivalence clinique entre les réponses des CR et CRp n'a pas été mise en place.

### 3.2.5.2. Taux de réponse

Le **taux global de réponse** (OR=CR+CRp) pour les trois études a été de 26% (71/277) :

- 13% (35/277) de patients en CR ;
- 13 % (36/277) de patients en CRp (voir tableau 4) (64).

Le délai moyen de disparition des blastes chez les patients en CR et en CRp était de 28 jours après la première dose de GO. Le délai moyen avant la rémission était de 60 jours pour les CR et CRp. Les délais de rémission sont indiqués dans le tableau 4.

Le taux de rémission des 157 patients de 60 ans ou plus était de 24 %. Pour les patients de moins de 60 ans et l'ensemble des 277 patients, les taux d'OR étaient respectivement de 28 % et 26 %. Les deux déterminants les plus importants d'une rechute sont l'âge et la durée de la première rémission. Les taux de rémission par catégorie pronostique sont décrits dans le tableau 4.

**Tableau 4** : pourcentage de patients par catégorie de rémission et groupe pronostique (60)

	Age < 60 years	Age ≥ 60 years	First Remission < 6 months	First Remission 6 – 12 months	First Remission ≥ 12 months
Type of Remission	n = 120	n = 157	n = 37	n = 124	n = 116
CR (95% CI)	13 8, 21	12 7, 18	5 1, 18	10 5, 16	18 12, 26
CRp (95% CI)	14 8, 22	12 7, 18	5 1, 18	12 7, 19	16 10, 24
OR (CR + CRp) (95% CI)	28 20, 36	24 18, 32	11 3, 25	22 15, 30	35 26, 44

### 3.2.5.3. Survie

Dans l'ensemble, la survie a été mesurée depuis la date de la première dose de GO à la date du décès ou la date limite de données (survie globale ou OS) (voir tableau 5). La survie sans récurrence ou RFS pour les patients en rémission (durée de rémission) a été définie comme la période de temps depuis la première date documentée du maximum de réponse (CR ou CRp) à la première date documentée de récurrence (rapport de pathologie ou numération formule sanguine complète montrant la récurrence des blastes dans la moelle osseuse ou le sang périphérique) ou la mort ou la date limite de données (64).

**Tableau 5** : survies sans rechute et globale chez les patients en CR ou CRp (60)

Remission Group	N	Relapse-Free Median months <sup>a</sup>	Overall Survival Median months <sup>c</sup>
CR	35	6.4	12.0
CRp	36	4.5	12.7
OR <sup>b</sup>	71	5.2	12.4
Patients who responded to Mylotarg and received no further therapy			
CR	17	3.7	11.5
CRp	18	2.4	10.7
OR	35	2.4	11.1

**a:** nombre de mois après obtention de la CR ou CRp

**b:** seize patients en OR (6 CR et 10 CRp; 16/277 ; 5,7 %) avaient un taux de survie sans récurrence à 12 mois. 14/16 ont eu des transplantations de cellules souches. 1/14 a eu une greffe de cellules avant le traitement par GO. Les 13 autres patients ont eu des transplantations de cellules souches après le GO. Six patients en OR (3 CR et 3 CRp) ont eu un taux de survie sans récurrence supérieur à 36 mois. L'ensemble de ces 6 patients a eu des greffes de cellules souches (soit 2,2 % (6/277) des patients).

**c:** la survie globale moyenne a été de 3,3 mois chez les patients sans rémission (NR) ; chez l'ensemble des 277 patients, 4,9 mois.

### 3.2.5.4. Effets indésirables attendus

Le GO a été administré à 277 patients en rechute de LAM à 9 mg / m<sup>2</sup>, généralement en deux perfusions IV séparées de 14 jours (64).

Fièvre et frissons ont fréquemment été rapportés, malgré un traitement prophylactique par acétaminophène et antihistaminiques.

Il n'a pas été détecté d'anticorps anti-GO chez chacun des 277 patients, y compris les 20 patients qui ont reçu plus d'une cure de traitement au cours de l'étude, dans la phase 2 des essais cliniques. Deux patients, dans une étude de phase 1, ont développé des titres d'anticorps contre la calichéamicine après trois doses. Il n'a pas été observé d'anticorps développés à partir de la partie hP67.6 de l'anticorps du GO (64).

Les autres effets indésirables tels que myélosuppression, neutropénie, anémie et thrombopénie, infections, saignements, transfusions, mucite, hépatotoxicité, maladie veino-occlusive (MVO), toxicité hématologique, mortalité précoce sont résumés dans les annexes 1 et 2.

### 3.2.5.5. Traitement en première ligne des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) en association avec une chimiothérapie

Un essai de phase III ouvert et randomisé a été mené pour évaluer les avantages et l'innocuité d'ajouter du GO au traitement d'induction standard, suivi d'une randomisation post-regroupement pour recevoir trois doses supplémentaires de GO ou aucun traitement supplémentaire (OBS) (66). Les patients admissibles étaient des adultes (18-60 ans) non précédemment traités *de novo* et sans LAM 3. 637 patients au total ont été randomisés pour recevoir le traitement d'induction avec la daunorubicine, la cytarabine et le GO VS le traitement d'induction standard avec la daunorubicine et la cytarabine. Les patients de chacun des deux bras qui n'ont pas atteint une aplasie ont été retraités avec la daunorubicine et la cytarabine. Les patients en rémission complète (CR) ont reçu un traitement de consolidation avec trois cures de cytarabine à forte dose tous les 28 jours. Les patients restant en CR après consolidation répondaient aux critères pour une deuxième randomisation (stratifiée par catégorie de risque cytogénétique au diagnostic et à l'utilisation de GO durant l'induction) entre les trois doses de GO (5 mg/m<sup>2</sup> tous les 28 jours) ou OBS. Parmi tous les patients évaluables pour la toxicité de l'induction, le taux d'événements indésirables mortels, au moins possiblement attribuables au traitement (généralement hémorragie, infection et/ou ARDS) était significativement plus élevé dans la daunorubicine cytosine arabinoside (DA) + bras GO (16/283 = 5,7 % vs 4/281 = 1,4 %, P = 0,01). Dans cette étude, l'ajout de GO au traitement d'induction n'a pas amélioré les taux de réponse ou de survie sans récurrence et, comme la thérapie post-regroupement, n'a pas amélioré la survie sans récurrence (RFS), la survie sans maladie (DFS) post-regroupement ou la survie globale, mais a été associée à un risque significativement plus élevé d'effets indésirables mortels-induction (66).

En conclusion, cette étude (66), dont les résultats ont été confirmés en 2013 (67), a mis en évidence une toxicité du GO sans amélioration du service rendu. C'est pourquoi il a été retiré du marché aux Etats-Unis en 2010.

### 3.3. Protocoles ALFA-0701 et LAM 2006-IR : le retour du GO (68) (69)

Deux protocoles ont été mis en place en France pour évaluer l'efficacité du GO tout en analysant sa toxicité. Ces protocoles sont exposés dans le tableau 6.

**Tableau 6** : protocoles ALFA-0701 et LAM 2006 IR (68) (69)

Critères d'évaluation		Protocole ALFA 0701	Protocole LAM 2006 IR
Objectifs	Objectif principal de l'étude	évaluer l'efficacité de l'ajout du GO à de la daunorubicine et de la cytarabine, en traitement d'induction et de consolidation, chez des patients ayant une LAM : → <b>évaluer la survie sans événement à 3 ans</b>	démontrer la supériorité de l'addition de GO à la chimiothérapie d'induction et de consolidation <i>versus</i> chimiothérapie seule en termes de survie sans événement chez des patients ayant une LAM : → <b>évaluer la survie sans événement à 3 ans</b>
	Objectifs secondaires de l'étude	<ul style="list-style-type: none"> <li>évaluer le taux de RC et de CRp</li> <li>évaluer l'incidence cumulée des rechutes</li> <li>évaluer la durée des rémissions</li> <li>évaluer la survie globale</li> <li>évaluer la tolérance de l'association</li> <li>déterminer les facteurs prédictifs de la réponse (facteurs de résistance aux drogues (MDR), groupes de risques cytogénétiques, mutation ou hyper-expression des gènes FLT3, MLL, CEBPα, NPM1, WT1)</li> <li>déterminer la relation entre le taux de maladie résiduelle mesurée par le taux du transcrit WT1 ou NPM1 (chez les patients NPM+) à M1, M3, M6 et la durée de la rémission</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>évaluer la survie pour les patients non allogreffés</li> <li>évaluer la toxicité de l'induction et de la chimiothérapie de consolidation, hématologique et non hématologique</li> <li>évaluer le bénéfice d'une stratégie de greffe allogénique génoïdétique ou phénoïdétique à conditionnement standard ou non myéloablatif dans ce groupe de cytogénétique intermédiaire stratifié</li> <li>évaluer la survie globale et la survie sans événement pour l'ensemble des patients</li> </ul>
Type de l'étude		randomisée, multicentrique, phase III, thérapeutique	randomisée, multicentrique, phase III, thérapeutique
Population étudiée	Critères d'inclusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>50 ≤ âge ≤ 70 ans</li> <li>leucémie aiguë myéloïde (LAM) morphologiquement prouvée</li> <li>indice de performance ≤ 3 (OMS)</li> <li>fonction cardiaque étudiée par scintigraphie ou échographie dans les limites de la normale</li> <li>tests biologiques hépatiques : transaminases &lt; 2,5 x LNS, bilirubine totale &lt; 2 x LNS; fonction rénale avec créatinine &lt; 2,5 x LNS</li> <li>prélèvement fait pour la biologie moléculaire</li> <li>consentement éclairé signé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>18 ≤ âge ≤ 60 ans</li> <li>&gt; 20 % de cellules blastiques</li> <li>cytogénétique de groupe intermédiaire</li> <li>expression de l'antigène CD33 sur les blastes (<i>ratio</i> des pics de fluorescence CD33/contrôle &gt; 2)</li> <li>leucocytes &lt; 100G/L</li> <li>consentement éclairé écrit</li> </ul>
	Critères d'exclusion	<ul style="list-style-type: none"> <li>LAM 3</li> <li>LAM dans l'évolution d'un syndrome myéloprolifératif ou d'un syndrome myélodysplasique connu, documentée par un myélogramme et diagnostiquée depuis plus de 6 mois</li> <li>LAM secondaire survenant chez un patient ayant été traité antérieurement par chimiothérapie et/ou radiothérapie pour une autre néoplasie</li> <li>atteinte du système nerveux central</li> <li>infection non contrôlée</li> <li>autre pathologie maligne évolutive</li> <li>sérologie VIH, VHB ou VHC positive</li> <li>traitement antérieur pour la LAM, excepté l'hydroxyurée en cas de forme hyperleucocytaire</li> <li>femme enceinte ou allaitant</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>malades âgés de moins de 18 ans ou plus de 60 ans</li> <li>leucémie aiguë myéloblastique non classable dans la classification FAB ou de type M3</li> <li>transformation blastique d'un syndrome myéloprolifératif ou myélodysplasique antérieurement diagnostiqué</li> <li>cytogénétique non intermédiaire</li> <li>localisation extramédullaire isolée de la maladie</li> <li>leucocytes &gt; 100 G/L (ces patients bénéficieront d'une inclusion immédiate dans le protocole défavorable)</li> <li>contre-indication organique au traitement proposé : score OMS à 3, insuffisance cardiaque ou coronarienne documentée, perturbations hépatiques non liées <i>a priori</i> à la LAM, insuffisance rénale non liée <i>a priori</i> à la LAM, antécédents d'accident vasculaire cérébral ou insuffisance circulatoire cérébrale patente</li> <li>impossibilité de suivi pour raisons psychologiques, sociales ou géographiques</li> <li>refus à l'occasion de la signature du consentement éclairé</li> <li>sérologie VIH1/2 positive</li> <li>hépatite C chronique active (sérologie VHC positive et PCR VHC positive)</li> <li>femme enceinte et/ou test βHCG positif ou allaitant</li> </ul>
	Nombre	281 patients	254 patients entre 2007 et 2010
Promoteur		CH Versailles	CHU Nantes

L'expression de l'antigène CD33 n'a pas été requise pour l'entrée dans l'étude ALFA-0701, contrairement à l'étude LAM 2006 IR. Les schémas thérapeutiques de chacune des deux études sont présentés en annexes 3 et 4.

### 3.4. Résultats de l'étude ALFA-0701 (1)

Devant les résultats contradictoires des études en phase 3, l'addition de gemtuzumab ozogamicin (GO) aux traitements standards des patients souffrant de LAM était mal connue. Cette étude a donc vérifié si l'addition de faibles doses fractionnées de GO aux chimiothérapies de première ligne pouvait améliorer le pronostic des patients avec leucémies sans causer d'effets toxiques excessifs. Le grand intérêt de ce travail était que la drogue était administrée de façon fractionnée, technique permettant de réduire sa toxicité tout en maintenant son efficacité (1).

Cette étude de phase 3, faite en intention de traiter, a concerné 26 centres en France et a inclus des patients âgés de 50 à 70 ans, avec LAM *de novo* non traitées. Les patients ont été randomisés et répartis en (1):

- un groupe **contrôle** ayant reçu une chimiothérapie d'induction avec daunorubicine et cytarabine **sans administration de GO** ;
- un groupe **GO** ayant reçu une chimiothérapie d'induction avec daunorubicine et cytarabine **avec administration de cinq doses de GO** ( $3\text{mg}/\text{m}^2$  à J1, J4 et J7 pendant l'induction et à J1 de chacune des deux cures de consolidation).

Les réponses thérapeutiques ont été classifiées en (1) :

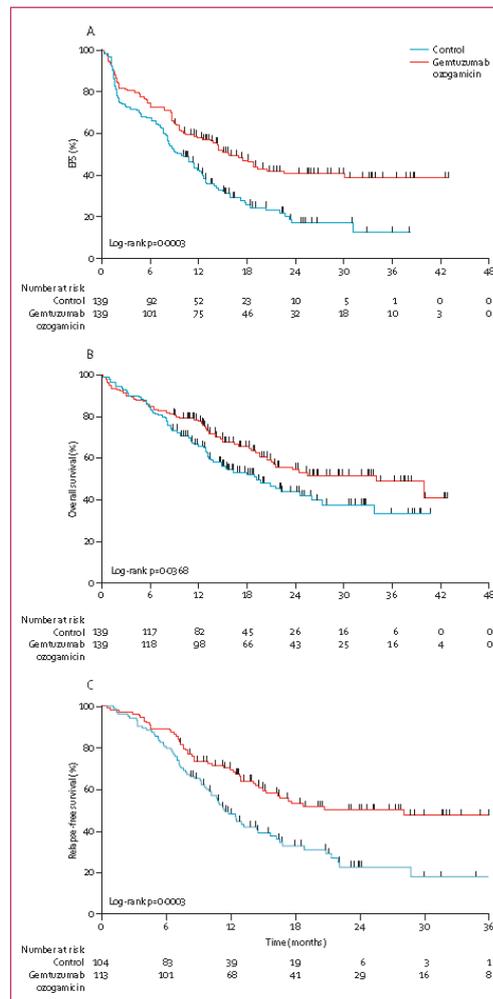
- rémission complète (CR), définie par un taux strictement inférieur à 5% de blastes dans la moelle osseuse et un compte absolu de polynucléaires neutrophiles sanguins strictement supérieur à  $1.10^9$  par litre (soit  $1000/\text{mm}^3$ ) et un compte de plaquettes sanguines supérieur ou égal à  $100.10^9$  par litre (soit  $100000/\text{mm}^3$ ) ;
- rémission partielle avec rémission plaquettaire incomplète (CRp) (compte de plaquettes sanguines strictement inférieur à  $100.10^9$  par litre (soit  $100000/\text{mm}^3$ )).

Ont été évaluées la survie sans événement ou EFS (**critère principal** : survie avec soustraction des décès avant ou pendant l'induction, des maladies résistantes, des rechutes et des décès pendant la CR ou la CRp), la survie sans rechute ou RFS (survie après obtention de la CR ou CRp avec soustraction des rechutes et des décès avant rechute), la survie globale ou OS (survie avec soustraction de tout décès confondu) et la sécurité (1).

Les résultats ont été mesurés au cours du traitement ou à la journée 45 après traitement (induction ou consolidation). Les trois survies ont été évaluées à deux ans (1).

280 patients ont été randomisés et 139 ont été analysés dans chaque groupe (1):

- **après induction** : une réponse complète (avec ou sans rémission des plaquettes = CR + CRp) a été obtenue chez 104 patients dans le groupe contrôle et 113, dans le groupe GO ;
- **à deux ans** : (voir figure 35)
  - la survie sans événement était de 17.1% dans le groupe contrôle *versus* 40.8% dans le groupe GO (dans toutes les catégories d'âge des malades) ;
  - la survie globale était de 41.9% dans le groupe contrôle *versus* 53.2% dans le groupe GO ;
  - la survie sans rechute était de 22.7% dans le groupe contrôle *versus* 50.3% dans le groupe GO ;
  - seuls les malades au caryotype défavorable n'ont pas tiré de bénéfice du GO.



**Figure 35** : analyse de Kaplan-Meier de la survie sans événement (EFS) (A), de la survie globale (B) et de la survie sans rechute (C) (1)

Concernant les **effets indésirables** (1), la toxicité hématologique, en particulier la thrombopénie persistante, était plus fréquente dans le groupe GO que dans le groupe contrôle sans qu'il n'y ait d'augmentation du risque de mort liée à la toxicité. La durée des neutropénies induites par les traitements était significativement plus longue dans le groupe GO que dans le groupe contrôle après les première et seconde cures de consolidation (sur trois au total). Après chaque cure, le nombre moyen de transfusions plaquettaires était significativement plus élevé dans le groupe GO. Les hémorragies de grades 3 et 4 étaient plus fréquemment rapportées dans le groupe GO, bien que la différence fût non significative. L'incidence des événements cardiaques, infectieux, transferts dans des unités de réanimation et morts suite aux effets toxiques ne différaient pas significativement entre les deux groupes. Les toxicités hépatiques de grades 3 et 4 étaient rapportées principalement dans un contexte de sepsis et ce, dans les deux groupes. Deux des trois patients qui ont développé une maladie veino-occlusive sont morts dans le groupe GO, un après la cure d'induction et l'autre après la première cure de consolidation. Globalement, les effets indésirables hématologiques et non hématologiques ont augmenté avec le GO, contribuant à un pourcentage plus faible de patients en CR et CRp ayant eu les deux cures de consolidation programmées (1).

En conclusion, l'utilisation de faibles doses fractionnées permettrait la prescription sûre de doses cumulatives plus élevées et améliorerait considérablement le pronostic des patients avec LAM. Les données garantiraient la réinstauration du GO en tant que traitement de première ligne des LAM (1).

### **3.5. Premiers résultats de l'étude LAM 2006-IR (70)**

Cette étude a rapporté l'intérêt du GO dans la chimiothérapie des patients ayant un risque cytogénétique intermédiaire et non candidat à l'allogreffe de cellule souche. Entre 2007 et 2010, 254 patients âgés de 18 à 60 ans ont été inclus dans cette étude. Il s'agissait de leucémies aigües *de novo* ayant un caryotype intermédiaire. Le GO a été administré à la dose de 6 mg/m<sup>2</sup> d'une manière randomisée et les patients ont reçu par ailleurs, une chimiothérapie d'induction classique. La consolidation a reposé sur l'utilisation de cytarabine à dose intermédiaire associée à de la mitoxantrone. Les patients ayant un caryotype et un génotype favorables ont reçu une seconde cure de consolidation suivie d'une autogreffe de cellules souches. Les patients des groupes intermédiaires 1 et 2 avaient une indication d'allogreffe de cellules souches. Les patients sans donneur ont été traités par autogreffe de cellule souche après deux cures de consolidation (70).

Le GO n'a pas augmenté le pourcentage de rémissions complètes ni la mortalité liée à la toxicité du GO. Cependant, quatre patients sous GO ont développé une maladie veino-occlusive du foie et d'une manière générale, les malades du groupe GO ont présenté une

toxicité hépatique plus importante (23% *versus* 13%). Aucune différence significative n'a été observée entre les deux bras concernant la toxicité hématologique et la survie sans événement évaluée à trois ans. Il n'y a pas eu non plus de différence en termes de survie globale. Cependant, dans le sous-groupe de patients n'ayant pas pu être allogreffés, la survie sans événement a été significativement meilleure dans le groupe GO : 53,7% *versus* 27%. Aucune différence de survie globale n'a été toutefois observée dans cette catégorie de malades (70). Les meilleurs résultats ont été obtenus chez les patients de risques intermédiaires 1 ou 2 dans la classification ELN (European Leukemia Net) (11).

Ce travail a donc montré que les malades avec une cytogénétique intermédiaire pouvaient tirer bénéfice du GO associé à une chimiothérapie standard (70).

### 3.6. Synthèse des études les plus récentes sur l'action du GO sur les LAM : un retour nuancé et affiné

**Pour les sujets jeunes de moins de 60 ans en première ligne (71)**, cinq études de phase III (voir tableau 7) récentes prospectives et randomisées ont finalement montré un avantage significatif pour les patients avec une cytogénétique favorable (les études AML 15 (72), SWOG 106 (66), ALFA-0701 (1), LAM 2006 IR (70) et AML 16 (73)) ou intermédiaire (les études AML 15 (72), ALFA-0701 (1), LAM 2006 IR (70) et AML 16 (73)).

**Tableau 7 : études randomisées de chimiothérapies avec ou sans GO (71)**

Trial	No. of Patients		Age Group (years)	Induction Chemotherapy	CR Rate (no GO v GO)	Induction Mortality (no GO v GO)	Grades 3 and 4 Liver Toxicity (no GO v GO)	Outcomes (no GO v GO)
	Total	No GO v GO						
Burnett et al <b>Etude AML 15 (72)</b>	1,113	557 v 556	< 60	DA v ADE v FLAG-Ida ± GO 3 mg/m <sup>2</sup> on day 1	83% v 82%	6% v 7%	Lower AST after course 1	OS for favorable risk, 51% v 79% (HR, 0.32; 95% CI, 0.18 to 0.59); internally validated model found 670 patients (75% of total) had predicted survival benefit (HR, 0.69; 95% CI, 0.55 to 0.87)
<i>P</i>						.6	.005	
Petersdorf et al <b>Etude SWOG 106 (66)</b>	627		18-60	DNR 45 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-3 + ara-C 100 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-7 + GO 6 mg/m <sup>2</sup> on day 4 v DNR 60 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-3 + ara-C 100 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-7	69% v 66%	0.8% v 5.8%	NA	RFS overall population (HR, 1.0; 95% CI, 0.69 to 1.44)
<i>P</i>						.002		
Castaigne et al <b>Etude ALFA-0701 (1)</b>	278	139 v 139	50-70	DNR 60 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-3 + ara-C 200 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-7 ± GO 3 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1, 4, 7	75% v 81%	4% v 6.5%	8% v 13%	OS overall population, 44% v 53% (HR, 0.7; 95% CI, 0.5 to 0.99)
<i>P</i>						.6	.24	.046
Delaunay et al <b>Etude LAM 2006 IR (70)</b>	238	119 v 119	18-60	DNR 60 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-3 + ara-C 200 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-7 ± GO 6 mg/m <sup>2</sup> on day 4	87% v 92%	2.5% v 4.2%	11.5% v 22%	OS ELN favorable
<i>P</i>						NS	.04	.0008
Burnett et al <b>Etude AML 16 (73)</b>	1,115	556 v 559	51-84	DNR 50 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1, 3, 5 and CLO 20 mg/m <sup>2</sup> per day on days 1-5 or ara-C 100 mg/m <sup>2</sup> every 12 hours on days 1-10 ± GO 3 mg/m <sup>2</sup> on day 1	58% v 62%	11% v 12%	ALT, 4% v 4%	29% v 35% (HR, 0.81; 95% CI, 0.67 to 0.97)
<i>P</i>						.4	.3	

Abbreviations: ADE, cytarabine, daunorubicin, and etoposide; ara-C, cytarabine; CLO, clofarabine; CR, complete response; DA, daunorubicin plus cytarabine; DNR, daunorubicin; EFS, event-free survival; ELN, European LeukemiaNet; FLAG-Ida, fludarabine, cytarabine, granulocyte colony-stimulating factor, and idarubicin; GO, gemtuzumab ozogamicin; HR, hazard ratio; NA, not available; NS, not significant; OS, overall survival; RFS, relapse-free survival.

Le GO ne profite donc pas aux patients jeunes avec cytogénétique défavorable et doit être réservé dans le futur aux patients de meilleur risque. On ne sait pas encore quelles doses d'anthracycline (60 ou 90 mg/m<sup>2</sup> de daunorubicine) et de GO (3, 6 ou 9 mg/m<sup>2</sup>) il faut utiliser pour avoir la meilleure efficacité avec le moins de toxicité. De même, la place de la chimio-immunothérapie avec le GO doit être évaluée en fonction de la nouvelle classification ELN qui tient compte des nouveaux pronostics moléculaires (NPM1/FLT3-ITD et CEBP $\alpha$ ) (11).

**Pour les sujets âgés de plus de 60 ans en première ligne**, l'expérience du GO en première ligne reste limitée. Utilisé en monothérapie à la dose de 9 mg/m<sup>2</sup> J1 J8 ou J1 J15, le GO n'a pas montré de supériorité par rapport à une induction classique de type aracytine/idarubicine (74). De même chez les patients en rémission complète après l'induction, le GO utilisé en consolidation à la dose de 6 mg/m<sup>2</sup> toutes les quatre semaines (trois cycles) n'a pas montré de supériorité en termes de survie sans rechute par rapport à l'absence de consolidation (17% *versus* 16% à 5 ans) (75). Néanmoins, l'étude anglaise du MRC publié récemment montre un intérêt pour l'adjonction du GO (3 mg/m<sup>2</sup> J1) à une induction de type aracytine/daunorubicine ou daunorubicine/clofarabine (73). L'étude du groupe ALFA confirme également l'intérêt du GO en association avec la chimiothérapie chez les sujets de plus de 60 ans (1). L'addition du GO en revanche à une chimiothérapie non intensive de type AraC sous-cutanée augmente le nombre de réponses (30% *versus* 17%) mais n'augmente pas la survie globale chez des patients âgés ne pouvant pas recevoir de traitement intensif (76).

**Chez les patients réfractaires ou en rechute**, la chimio-immunothérapie non intensive avec GO ne semble pas apporter de bénéfices chez les patients en rechute ou réfractaires et n'est donc pas recommandée en dehors d'un essai clinique.

**Concernant les enfants**, les données restent limitées. Une étude de phase III récente montre l'absence de bénéfice en survie de l'adjonction de GO après la fin d'une consolidation standard chez des enfants en première rémission complète (77).

### 3.7. Résultats d'autres études cliniques incluant le niveau d'expression du CD33

Une étude (78) a quantifié la fluorescence moyenne des blastes CD33 positifs prospectivement chez 619 patients avec LAM pédiatrique *de novo* et déterminé sa corrélation avec les caractéristiques de la maladie et l'issue clinique. L'expression du CD33 a varié de plus de 2 log ; une fluorescence moyenne médiane de 129 a été observée.

Les patients ont été divisés en 4 quartiles, quartiles (Q1-4) de 1 à 4, basés sur :

- les caractéristiques de l'expression du CD33 ;
- la maladie et ses symptômes.

Une expression élevée du CD33 a été associée à des mutations de FLT3/ITD de haut risque ( $P < .001$ ) et a été inversement associée au faible risque de maladie ( $P < .001$ ). Le taux de rémission complète (CR) était semblable mais les patients en Q4 (4<sup>ème</sup> quartile) ont présenté une survie globale et une survie sans rechute significativement plus faibles. Dans un modèle multivarié, l'expression élevée du CD33 est restée un prédicteur significatif de la survie globale et de la survie sans maladie. Les résultats suggèrent que l'expression du CD33 est hétérogène au sein de LAM pédiatriques *de novo*. L'expression élevée est associée aux caractéristiques négatives de la maladie et est un prédicteur indépendant de l'ensemble des autres résultats antérieurs. La corrélation entre l'expression du CD33 et la réponse au GO est en cours d'investigation (78).

*In vitro*, une autre étude a montré une relation quantitative entre l'expression du CD33 et la toxicité induite par le GO (79). Mais, *in vivo*, d'autres analyses multivariées ont montré que les niveaux d'expression du CD33 n'étaient pas corrélés à la réponse clinique ni la survie globale (65) (80). Ceci a donc amené à penser que d'autres facteurs devaient interagir avec l'effet du GO, facteurs comme la cytogénétique, la cytocinétique, la résistance au GO (58). Une autre étude a même prouvé que la toxicité du GO pouvait être liée à un phénomène d'endocytose non médiée par le CD33 et que les blastes dans les phases actives du cycle cellulaire seraient plus sensibles à l'action du GO (81).

Toutefois, l'impossibilité de quantifier l'expression du CD33 cellule par cellule n'a pas aidé à la compréhension du rôle réel du CD33 dans l'action du GO (58).

Selon l'étude AML 15 (72), l'expression du CD33 sur les blastes était positive pour un pourcentage supérieur ou égal à 20 et négative pour un pourcentage strictement inférieur à 20. Ce seuil de 20% s'est révélé non prédictif et il n'a donc pas été démontré de relation entre l'expression du CD33 et l'efficacité du GO.

La suite de cette thèse a donc été de rechercher un tel seuil et à partir des données issues de l'étude ALFA-0701.

## **4. Etude de l'impact du CD33 sur l'action du GO en vue de la mise en place d'un nouveau protocole de CMF**

### **4.1. Objectifs de l'étude**

La présente étude a pour objectif la relecture centralisée des données de CMF des patients inclus dans le protocole ALFA-0701 afin de savoir si l'effet du GO est en rapport avec l'expression du CD33.

La première étape a consisté à récupérer les données informatiques.

La seconde étape a consisté à comparer les fichiers informatiques inter-centres, sans standardisation préalable afin d'établir un seuil de positivité et une évaluation quantitative de l'expression du CD33 par les blastes.

La troisième étape a consisté à établir un lien entre l'expression du CD33 en CMF et l'efficacité thérapeutique du GO en clinique.

La quatrième étape a enfin consisté à établir par la CMF un nouveau protocole d'orientation diagnostique des LAM au laboratoire du CHU de Limoges.

### **4.2. Matériel et méthode**

#### **4.2.1. Constitution de l'échantillonnage**

La récupération des données de cytométrie (fichiers informatiques portant l'extension LMD ou FCS) s'est faite à l'aide de la liste d'inclusion de l'ensemble des 26 centres qui ont participé à l'étude ALFA-0701. Les modalités de récupération se sont appuyées soit sur l'utilisation d'un serveur informatique de type Filezilla<sup>®</sup> soit sur l'échange de mails (pièces jointes) soit sur l'envoi postal de CD Rom. Chacun des centres a été contacté individuellement.

#### **4.2.2. Panels d'anticorps et variations inter-centres**

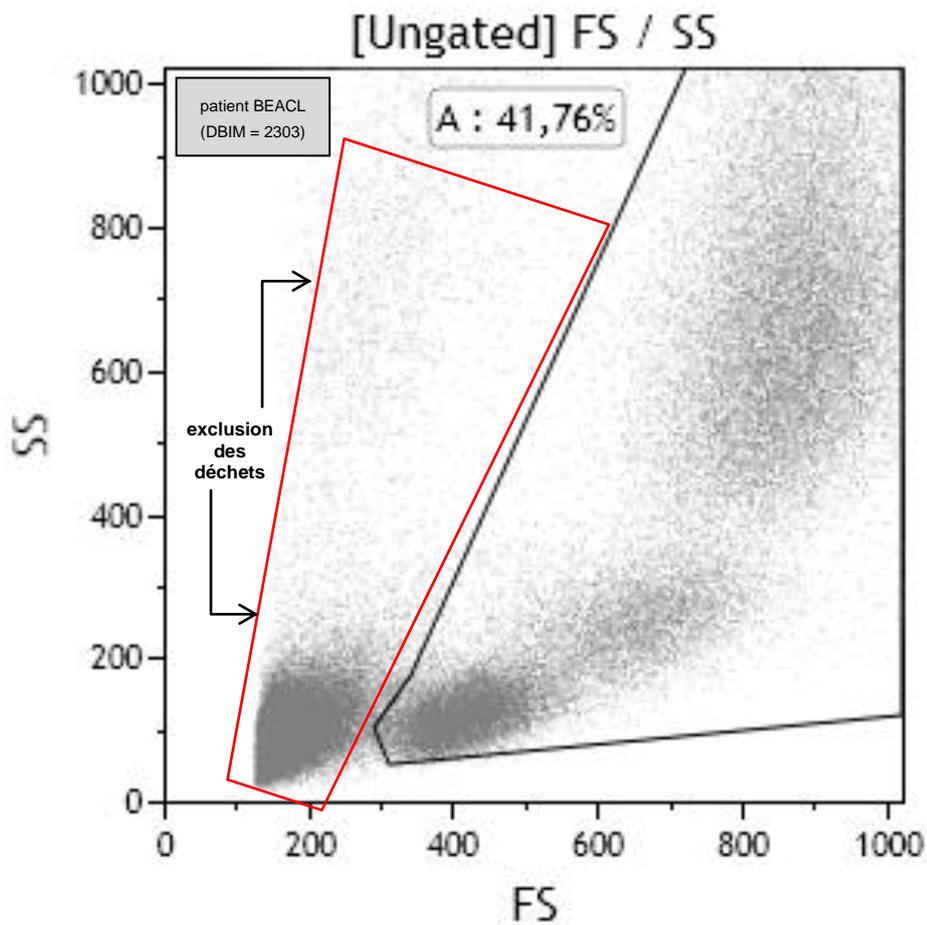
Les fichiers reçus ont été réanalysés sur le site du CHU de Limoges à l'aide du logiciel Kaluza<sup>®</sup>.

Devant les variations inter-centres (liées à l'utilisation de cytomètres différents ou avec des réglages différents) et les différences de panels d'anticorps mis en place par chaque centre, une harmonisation des résultats a été nécessaire pour permettre d'aboutir à des informations comparables quant à l'expression du CD33.

### 4.2.3. Traitement des données

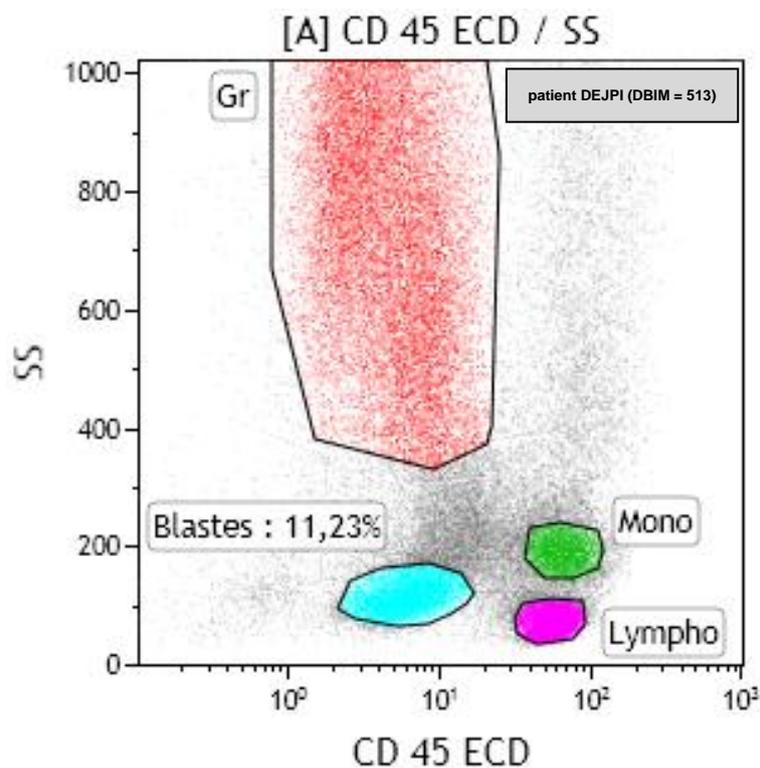
Une stratégie commune de réanalyse des résultats a reposé sur l'établissement d'un ensemble d'histogrammes :

- le premier histogramme a apporté une vision d'ensemble et a comporté SS en ordonnée et FS en abscisse. Il a permis l'isolement d'une population [A] (fenêtre permettant d'exclure les déchets) (voir figure 36) ;



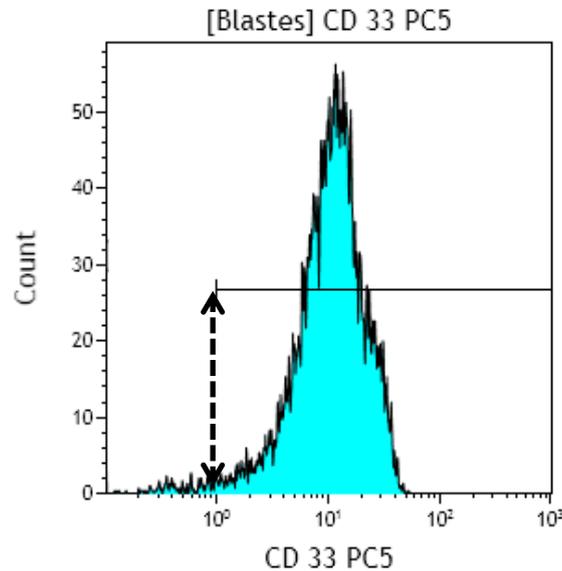
**Figure 36** : histogramme SS/FS permettant l'isolement de la population [A] après exclusion des déchets

- le deuxième histogramme, fenêtré sur la population [A], a comporté SS en ordonnée et l'intensité d'expression du CD45 en abscisse. Il a permis l'isolement des principales populations cellulaires (voir figure 37) :
  - population des lymphocytes, appelée [Lympho] et colorée en fuchsia ;
  - population des granuleux, appelée [Gr] et colorée en rouge ;
  - population des monocytes, appelée [Mono] et colorée en vert ;
  - population des blastes, appelée [Blastes] et colorée en cyan. Le fenêtrage des blastes a été fait par repérage visuel d'une population cellulaire d'intensité CD45 faible et située dans la zone Bermudes. Au besoin, le fenêtrage des blastes a été fait à l'aide des anticorps présents dans le panel (comme le CD34 et le CD117). Pour deux centres (celui de Rouen et de Necker), les réglages ont nécessité une collaboration à l'aide de fichiers PDF envoyés pour confirmation du fenêtrage des blastes. Cette population [Blastes] a permis l'analyse de l'expression du CD33 ;



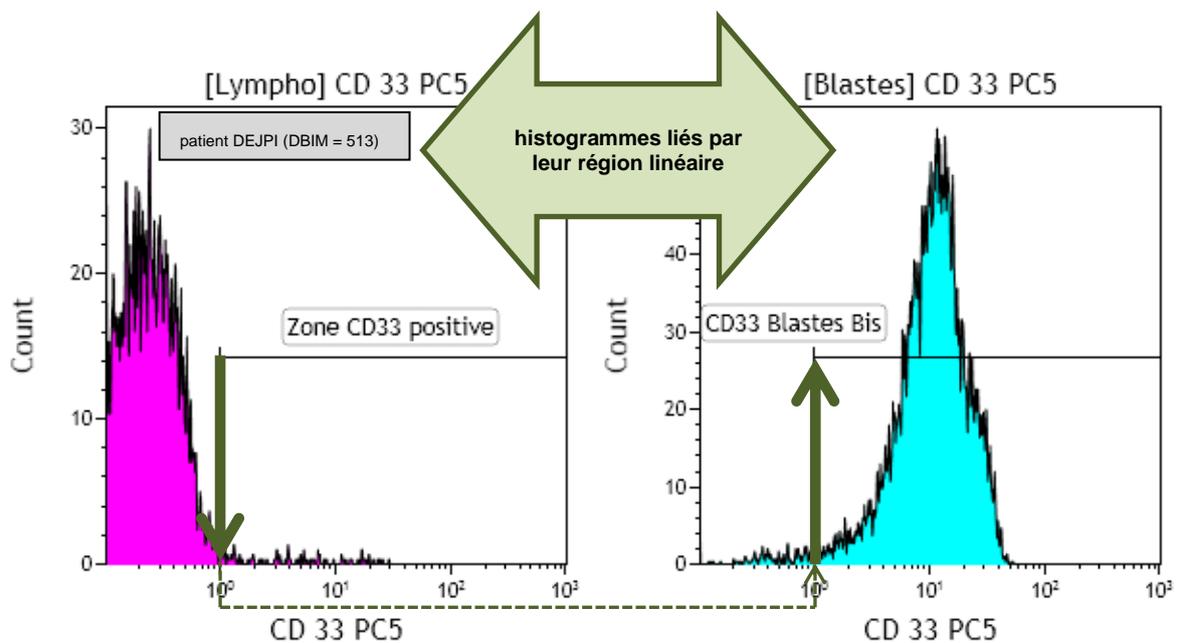
**Figure 37** : histogramme SS/CD45 permettant l'isolement des différentes populations au sein de la fenêtre [A] (populations [Blastes], [Lympho], [Mono], [Gr] (Lympho = lymphocytes, Mono = monocytes, Gr = granuleux))

- un troisième histogramme, monoparamétrique, fenêtré sur la population [Blastes], a permis la visualisation de l'intensité d'expression du CD33 (placée en abscisse) lorsque le seuil de positivité était positionné de manière arbitraire en première décade ( $10^0$ ) (voir figure 38) ;



**Figure 38** : histogramme ayant permis la mise en place du seuil de positivité en première décade ( $10^0$ )

- un quatrième et un cinquième histogrammes, mono-paramétriques, le premier fenêtré sur la population [Lympho] et l'autre fenêtré sur la population [Blastes], ont comporté, en abscisse, l'intensité d'expression du CD33. Ces histogrammes, liés entre eux (voir figure 39), ont permis :
  - le repérage des lymphocytes CD33 négatifs dans le but d'établir un seuil de positivité du CD33 pour chaque centre (adaptation aux différents réglages des cytomètres de chacun des centres). Ce seuil a été placé à la base du maximum de fluorescence des lymphocytes ;
  - le repérage des blastes CD33 positifs par rapport au seuil placé sur les lymphocytes (population dénommée [CD33 Blastés Bis]).



**Figure 39** : means de fluorescence de la population [Lympho] et de la population [CD33 Blastés Bis] : exemple d'un patient avec blastés CD33 positifs

Les résultats ont ensuite été récupérés de deux manières différentes :

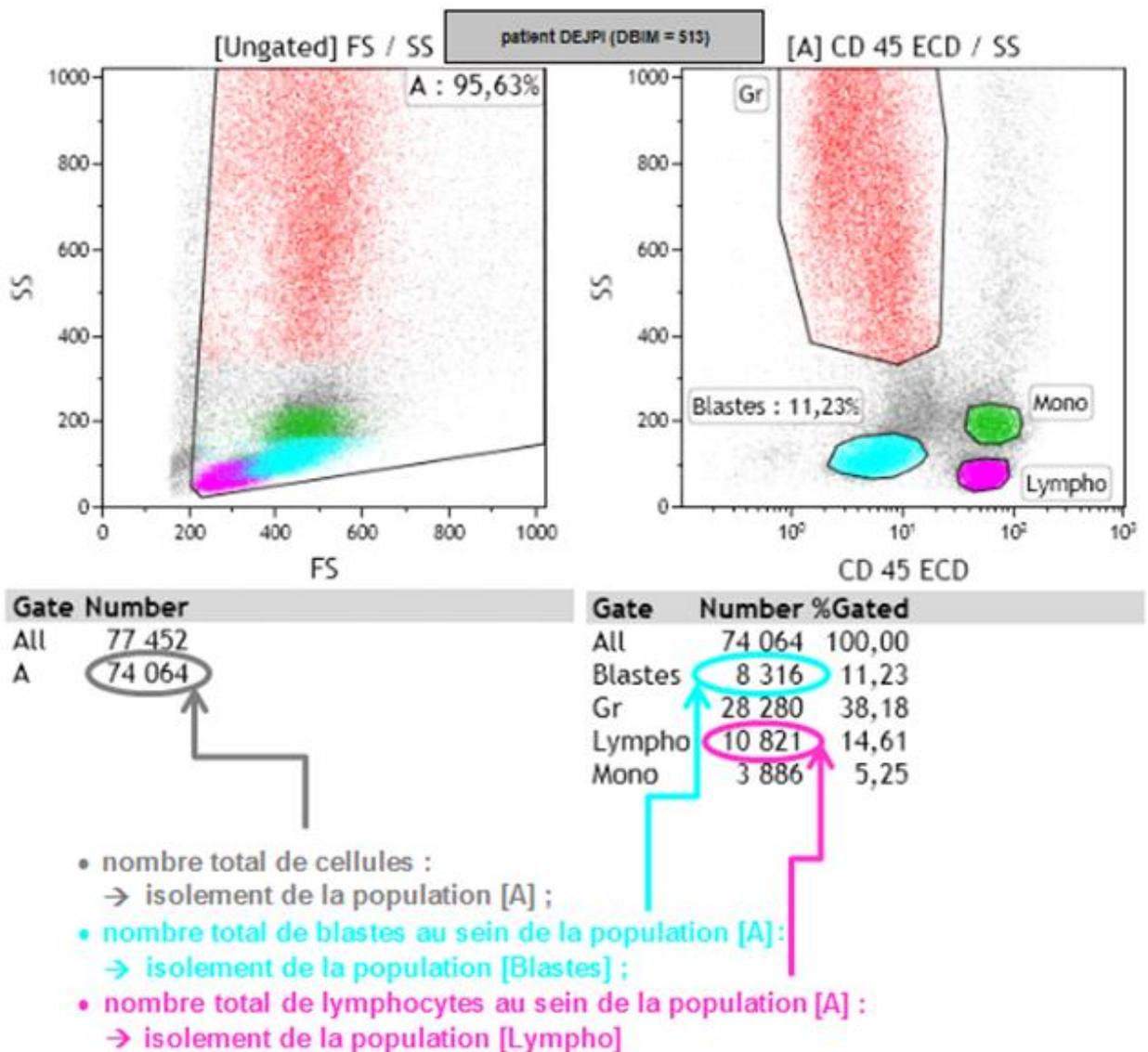
- tout d'abord, récupération des pourcentages de blastés positifs avec un seuil fixé par les lymphocytes (pourcentage de la population [CD33 Blastés Bis]) ;
- puis, récupération et calcul du *ratio* entre le mean de fluorescence CD33 de la population [Blastés] et le mean de fluorescence CD33 de la population [Lympho].

Des critères d'interprétabilité ont ensuite été définis et appliqués à l'ensemble des résultats réanalysés. Le *ratio* a donc été rendu ininterprétable pour :

- tout résultat ayant présenté un mean de fluorescence CD33 de la population [Lympho] négatif (mean  $\leq 0$ ) ;
- tout résultat où le nombre de lymphocytes analysés (population [Lympho]) était inférieur à 500 événements ;
- tout résultat où le nombre de blastés analysés (population [Blastés]) était inférieur à 500 événements.

En synthèse, la réanalyse globale des fichiers de CMF a permis la récupération :

- du nombre total de cellules analysées : isolement de la population [A] ;
- du nombre de blastes analysés au sein de la population [A] : isolement de la population [Blastes] ;
- du nombre de lymphocytes analysés au sein de la population [A] : isolement de la population [Lympho] (voir figure 40) ;
- du pourcentage des blastes CD33 positifs de la population [CD33 Blastos Bis] ;
- des means de fluorescence CD33 des lymphocytes de la population [Lympho] et des blastes de la population [Blastes] pour calcul du *ratio* (voir figure 41).



**Figure 40** : stratégie finale d'analyse des résultats

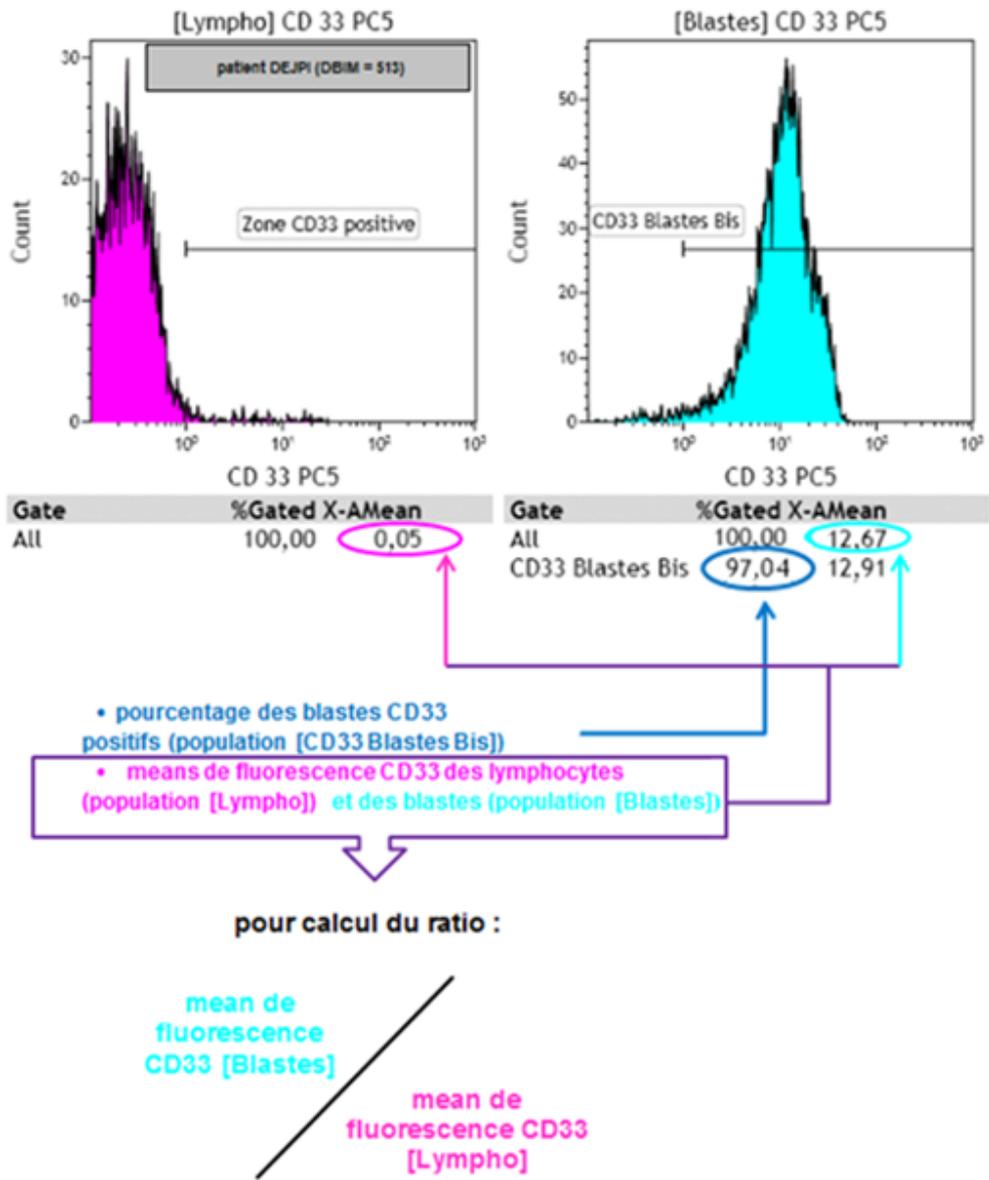


Figure 41 : stratégie finale d'analyse des résultats pour calcul du *ratio*

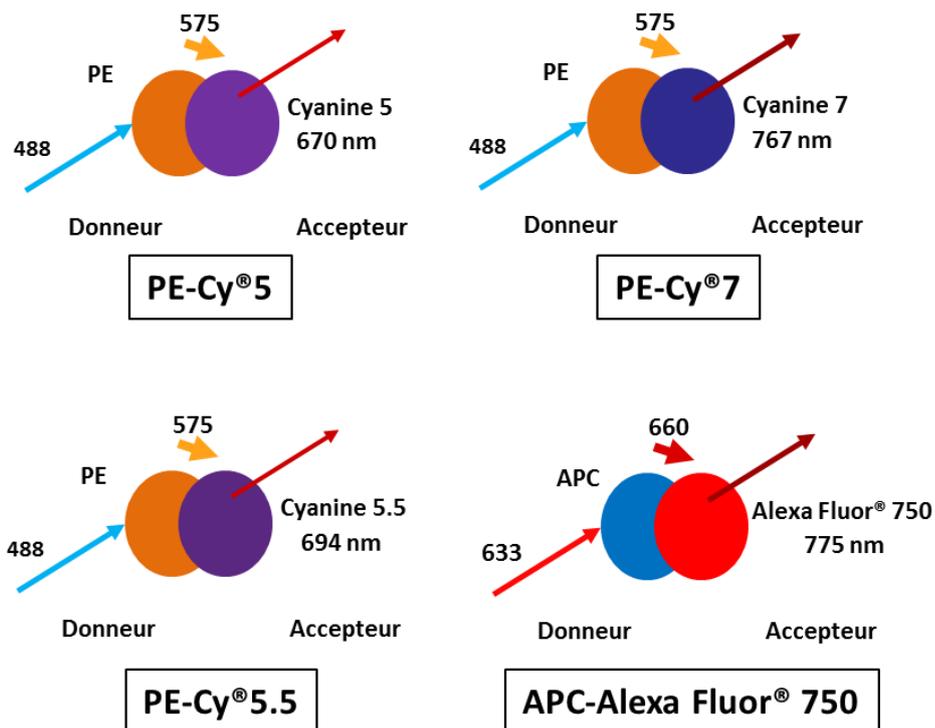
#### 4.2.4. Méthode de choix des anticorps anti-CD33 de CMF pour comparaison

Les critères de choix des anticorps **avant analyse** ont reposé sur :

- la mention "anticorps apte au diagnostic" ;
- l'appartenance à un même clone ;
- l'état actuel des connaissances qui mentionne que le CD33 est habituellement un antigène qui a une faible expression à la surface des cellules et qu'il faut donc le conjuguer à un anticorps lié à un fluorochrome brillant (forte intensité de fluorescence d'émission lors de l'excitation) (82).

D'après ces critères, les anticorps choisis ont donc été (voir figure 42) :

- le CD33 APC-Alexa Fluor<sup>®</sup> 750 (AlloPhycoCyanine Alexa Fluor<sup>®</sup> 750) ;
- le CD33 PE-Cy<sup>®</sup>5 (PhycoErythrine Cyanine<sup>®</sup> 5) ;
- le CD33 PE-Cy<sup>®</sup>5.5 (PhycoErythrine Cyanine<sup>®</sup> 5.5) ;
- et le CD33 PE-Cy<sup>®</sup>7 (PhycoErythrine Cyanine<sup>®</sup> 7).



**Figure 42** : fluorochromes des anticorps choisis pour comparaison (24)

Quatre aliquotes de 50µL d'un sang normal prélevé sur EDTA ont été incubées vingt minutes à l'obscurité avec 5µL de solution d'anticorps (un type d'anticorps par aliquote). Puis, les aliquotes ont été réagitées avant rajout de 500µL de lyse VERSALYSE®. Après un temps de lyse de dix minutes, les tubes ont été remplis de tampon PBS (Phosphate Buffered Saline) puis centrifugés cinq minutes à 830g. Enfin, ils ont été vidés par retournement. Après un ajout de 500µL de PBS, les tubes ont été passés sur le cytomètre NAVIOS®.

Chaque aliquote a été passée avec quatre réglages de PMT (photomultiplicateur ; réglage du voltage) différents : 300V, 400V, 500V et 600V. Les fluorescences ont été analysées dans les canaux correspondant à la longueur d'émission du fluorochrome correspondant.

Les critères de choix des différents anticorps **après analyse** ont reposé sur un écart le plus net possible entre l'intensité du témoin négatif et celle du témoin positif.

Les lymphocytes ont été pris comme témoins négatifs de l'expression du CD33. Les monocytes et les granuleux ont, quant à eux, été pris comme témoins positifs.

### 4.3. Résultats

#### 4.3.1. Récupération et analyse des données informatiques

Au total, **202 résultats** ont pu être récupérés (voir tableau 8). Deux patients ont retiré leur consentement pendant l'étude et ce sont donc 200 fichiers qui ont été réanalysés (voir annexe 7). Les résultats manquants sont expliqués dans l'annexe 5.

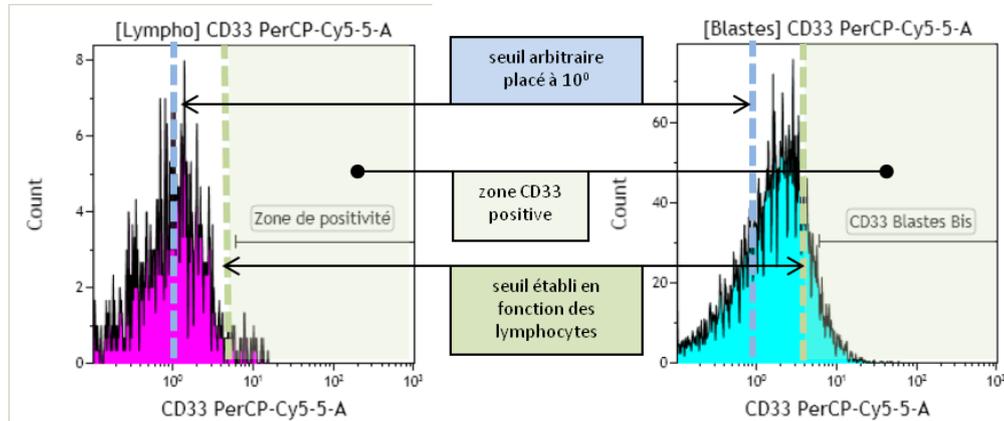
**Tableau 8** : nombre et pourcentage de fichiers reçus et analysés

	Nombre	%
<b>Nombre de patients inclus initialement</b>	280	<b>100</b>
<b>Fichiers LMD ou FCS reçus</b>	202	<b>72,1</b>
<b>Fichiers réanalysés</b>	202	<b>72,1</b>
<b>Fichiers retenus pour l'étude (retrait de consentement)</b>	200	<b>71,4</b>

En outre, **37 panels** d'anticorps différents ont été utilisés sur l'ensemble des 26 centres, ce qui correspond à une moyenne de 1,4 panels par centre. Le maximum de panels utilisés s'est élevé à 5 ; le nombre de centres n'utilisant qu'un seul panel s'est, quant à lui, élevé à 16. L'ensemble des panels ainsi que le détail des anticorps par panel sont mentionnés en annexe 6.

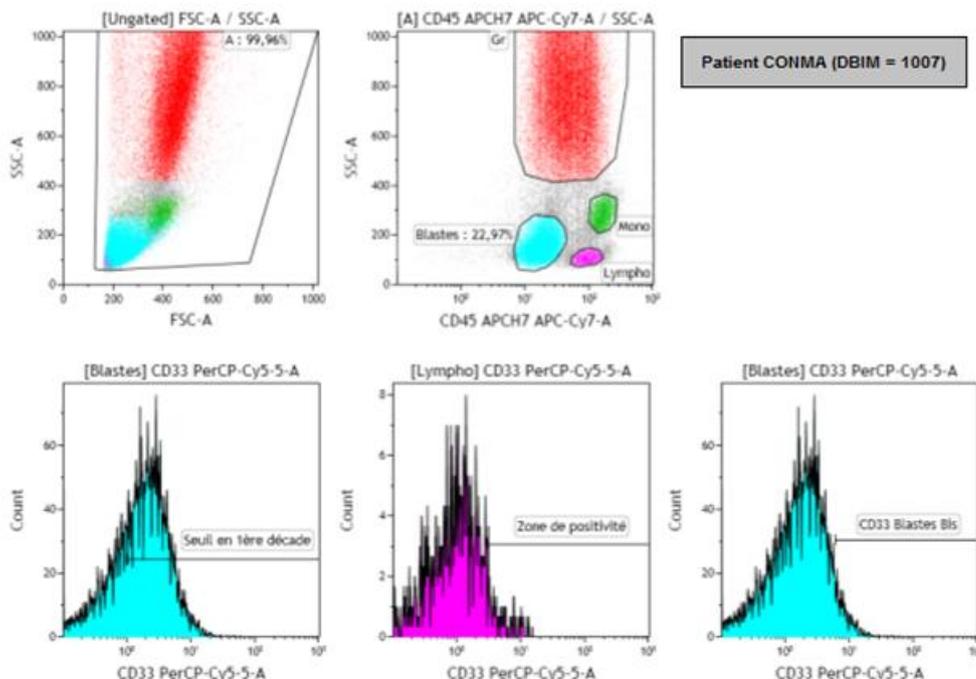
### 4.3.2. Etablissement du seuil de positivité CD33

Premièrement, le seuil arbitraire de positivité placé en première décade s'est révélé inutilisable car de nombreux résultats, selon les centres, montraient des lymphocytes CD33 positifs (voir figure 43).



**Figure 43** : exemple de lymphocytes CD33 positifs avec un seuil de positivité placé en première décade ( $10^0$  : blastos CD33 négatifs à ce seuil) et un seuil établi en fonction des lymphocytes (visualisation de la zone CD33 positive avec blastos CD33 positifs en réalité)

Par conséquent, la stratégie finale adoptée a consisté à utiliser le seuil de positivité placé centre par centre en fonction de l'intensité CD33 des lymphocytes (voir figure 44). C'est donc sur les pourcentages d'expression du CD33 des blastos de la population [Blastos Bis] que les analyses statistiques ont été faites.

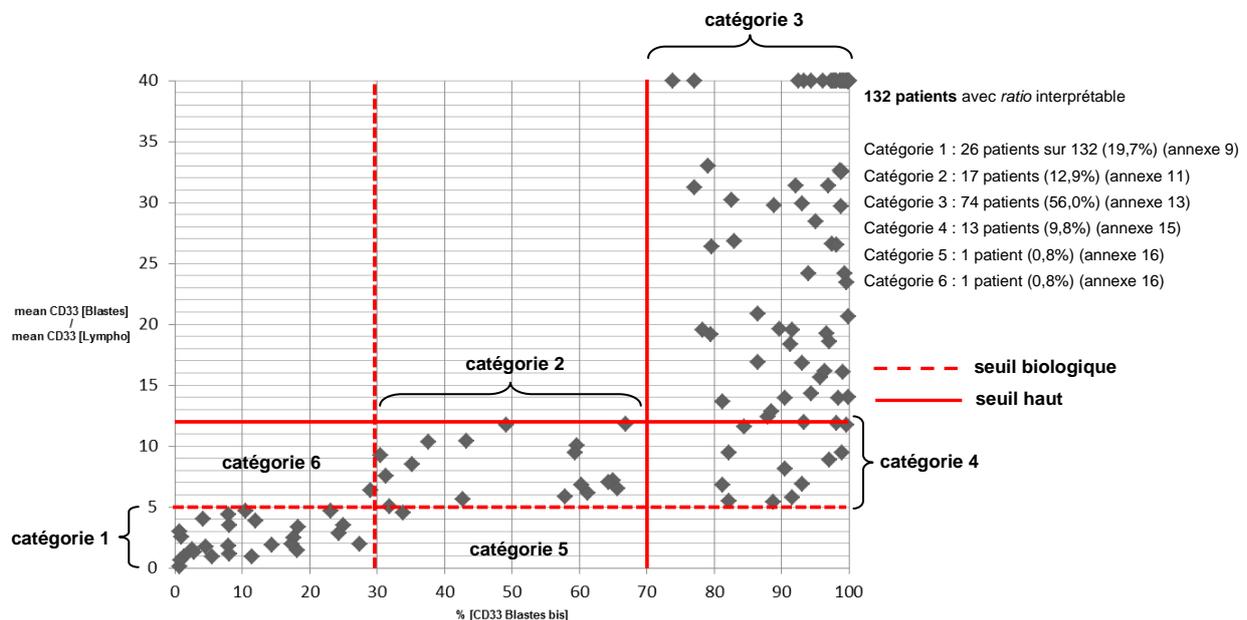


**Figure 44** : exemple d'un patient avec blastos CD33 négatifs après redéfinition du seuil sur les lymphocytes

Suite à l'application des critères d'interprétabilité établis (voir page 87), **68 dossiers** (sur 200 au total ; 34%) ont eu des résultats ininterprétables pour le *ratio* CD33 [Blastes] / CD33 [Lympho] (voir annexe 8).

Sur les **132 patients avec un *ratio* interprétable**, une étude de concordance a été faite afin de mettre en place un **seuil biologique** de pourcentage et un *ratio* au-delà desquels la positivité de l'expression du CD33 par les blastes serait fiable à 100% (voir figure 45). Les résultats étaient très concordants pour un pourcentage supérieur à 30% et un *ratio* supérieur à 5.

Deux patients ont été hors seuil car seul le *ratio* ou le pourcentage étaient au dessus du seuil de positivité, l'autre paramètre se situant à la limite. Après visualisation des graphes de cytométrie, ils ont été considérés comme CD33 positifs (voir annexe 16).



**Figure 45** : courbe de concordance entre le *ratio* de mean et le pourcentage de blastes CD33+

Nous avons également mis en place un second seuil, dénommé **seuil haut**, appliqué à l'ensemble des **200 patients**, pour lequel l'expression du CD33 était supérieure à 70% et/ou le *ratio* supérieur à 12 (les *ratio* ininterprétables ont également été inclus).

Le graphe représenté en figure 45 a finalement permis la mise en évidence de trois catégories principales :

- une catégorie 1 avec un pourcentage inférieur à 30 <sup>et/ou</sup> un *ratio* inférieur à 5 (36 patients sur 200 : 18%) :  
→ patients dits négatifs (voir annexes 9 et 10) ;
- une catégorie 2 avec un pourcentage entre 30 et 70 <sup>et/ou</sup> un *ratio* entre 5 et 12 (32 patients sur 200 : 16%) :  
→ patients d'expression intermédiaire du CD33 (voir annexes 11 et 12) ;
- une catégorie 3 avec un pourcentage supérieur à 70 <sup>et/ou</sup> un *ratio* supérieur à 12 (117 patients sur 200 : 58,5%) :  
→ patients d'expression forte du CD33 (voir annexes 13 et 14).

Seuls 13 patients (13 patients sur 132 : 9,8%) n'ont pas été concordants et ont eu un pourcentage de CD33 supérieur à 70% alors que le *ratio* était inférieur à 12 (catégorie 4, voir annexe 15). Les images de CMF étaient "nettes" avec des pics d'expression du CD33 fins et bien isolés par rapport aux lymphocytes. Ces 13 patients ont donc été inclus dans la catégorie 3.

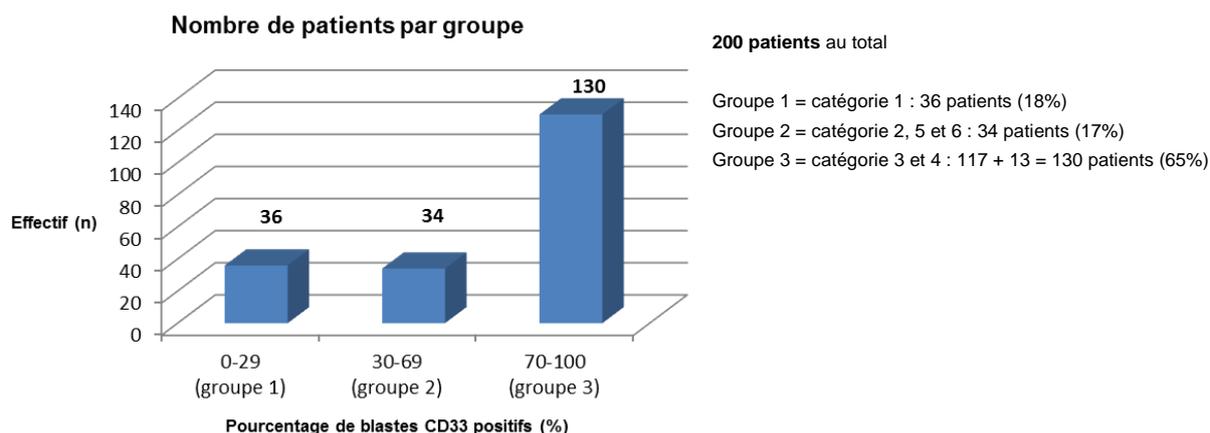
Au contraire, la catégorie 2 (expression intermédiaire du CD33) a montré des images de cytométrie en flux "intermédiaires" : les pics d'expression étaient larges et mal séparés.

Les patients de la catégorie 3 ont montré une expression forte du CD33. Cependant, l'intensité des pics d'expression du CD33 semblent variables sur les images de CMF.

#### **4.3.3. Lien entre l'expression du CD33 et l'efficacité thérapeutique du GO en clinique**

Afin d'évaluer l'intérêt du seuil haut, l'ensemble des résultats a été revu au CHU de Paris Saint Louis. Une comparaison avec les résultats cliniques a ainsi pu être faite, l'intérêt final ayant été de relier l'expression du CD33 par les blastes à l'efficacité du GO voire même, au pronostic de la maladie.

L'analyse statistique a été faite sur les fichiers des 200 patients : le *ratio* n'a donc pas été pris en compte. Par conséquent, sur la base seule du pourcentage de blastes CD33 positifs, trois populations différentes ont été définies (voir figure 46).



**Figure 46** : séparation de l'ensemble des 200 patients en fonction de l'expression du CD33

Au total, sur les 130 patients ayant 70 ou plus de 70% de blastes CD33 positifs, 65 étaient dans le bras contrôle et 65 dans le bras GO. Sur les 70 patients ayant strictement moins de 70% de blastes CD33 positifs, 31 étaient dans le bras contrôle et 39 dans le bras GO (voir tableau 9).

**Tableau 9** : répartition des bras contrôle et GO en fonction du seuil d'expression du CD33

Expression blastique du CD33 (%)	Bras contrôle	Bras GO	Total
<70 (0)	31	39	70
≥70 (1)	65	65	130
<b>Total</b>	<b>96</b>	<b>104</b>	<b>200</b>

Pearson  $\chi^2(1) = 0,5952$

Pr = 0,440

La rémission complète (CR) et la rémission partielle sans récupération des plaquettes (CRp) ont déjà été définies dans la partie 3.4, de même pour la survie sans événement (EFS), la survie sans rechute (RFS) et la survie globale (OS).

Les données ont été estimées par l'utilisation de la méthode de Kaplan-Meier (83) et comparées par l'utilisation du test de log-rank. Les valeurs pour le Hazard *ratio* (HR) 95% IC (intervalle de confiance) ont été calculées par l'utilisation de modèles de Cox (84) après vérification de la proportionnalité des fonctions de risque avec le test de Grambsch et Therneau (85). Les données binaires ont été comparées par l'utilisation du test exact de Fisher et les distributions continues ont été comparées par l'utilisation du test de Mann-Whitney.

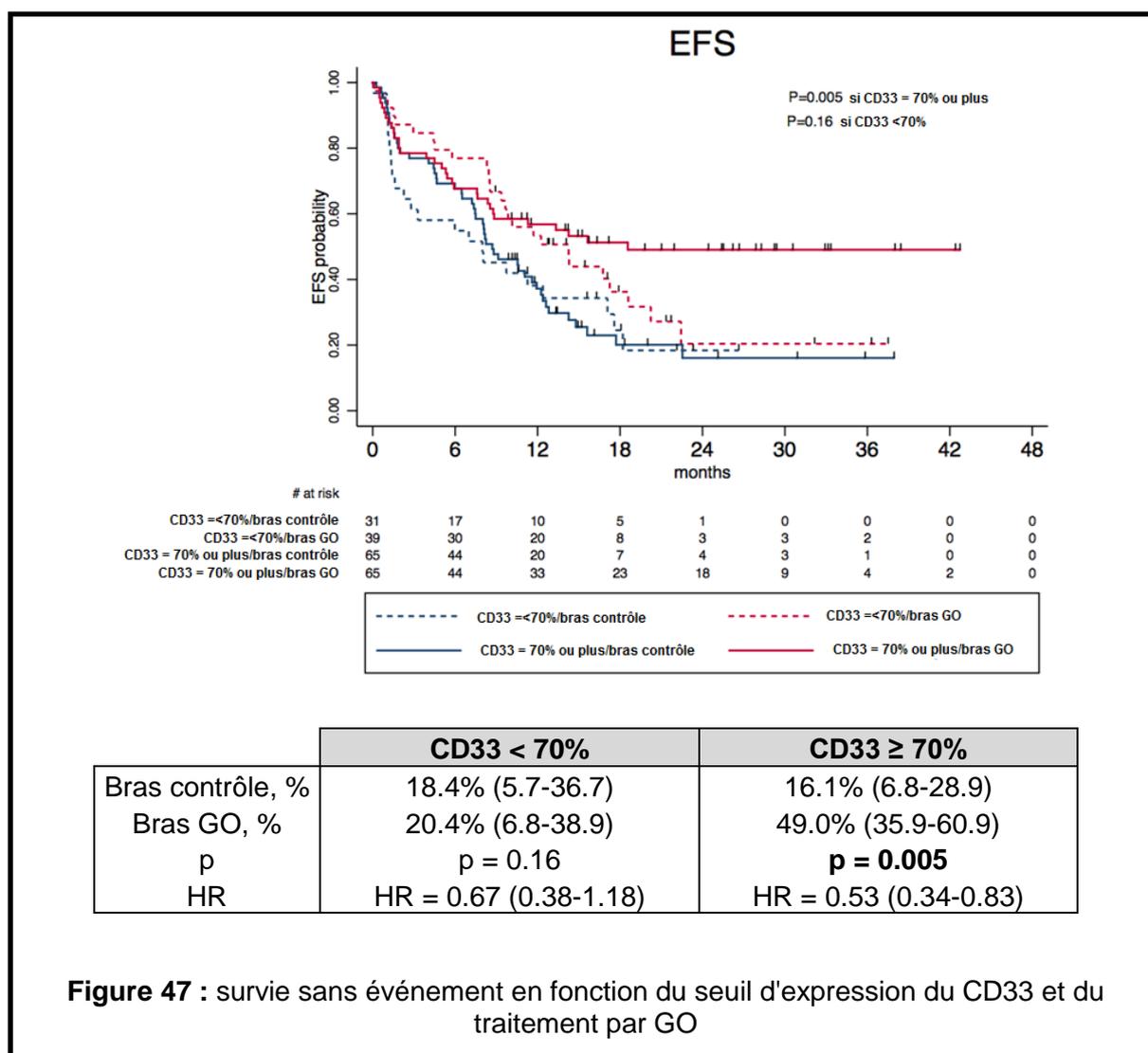
Le tableau 10 montre, sur l'ensemble des patients réanalysés, l'absence de lien significatif entre la CR, la CRp, l'EFS à 2 ans, la RFS à 2 ans, l'OS à 2 ans et l'expression blastique de CD33.

**Tableau 10** : pronostic des patients en fonction du seuil d'expression du CD33

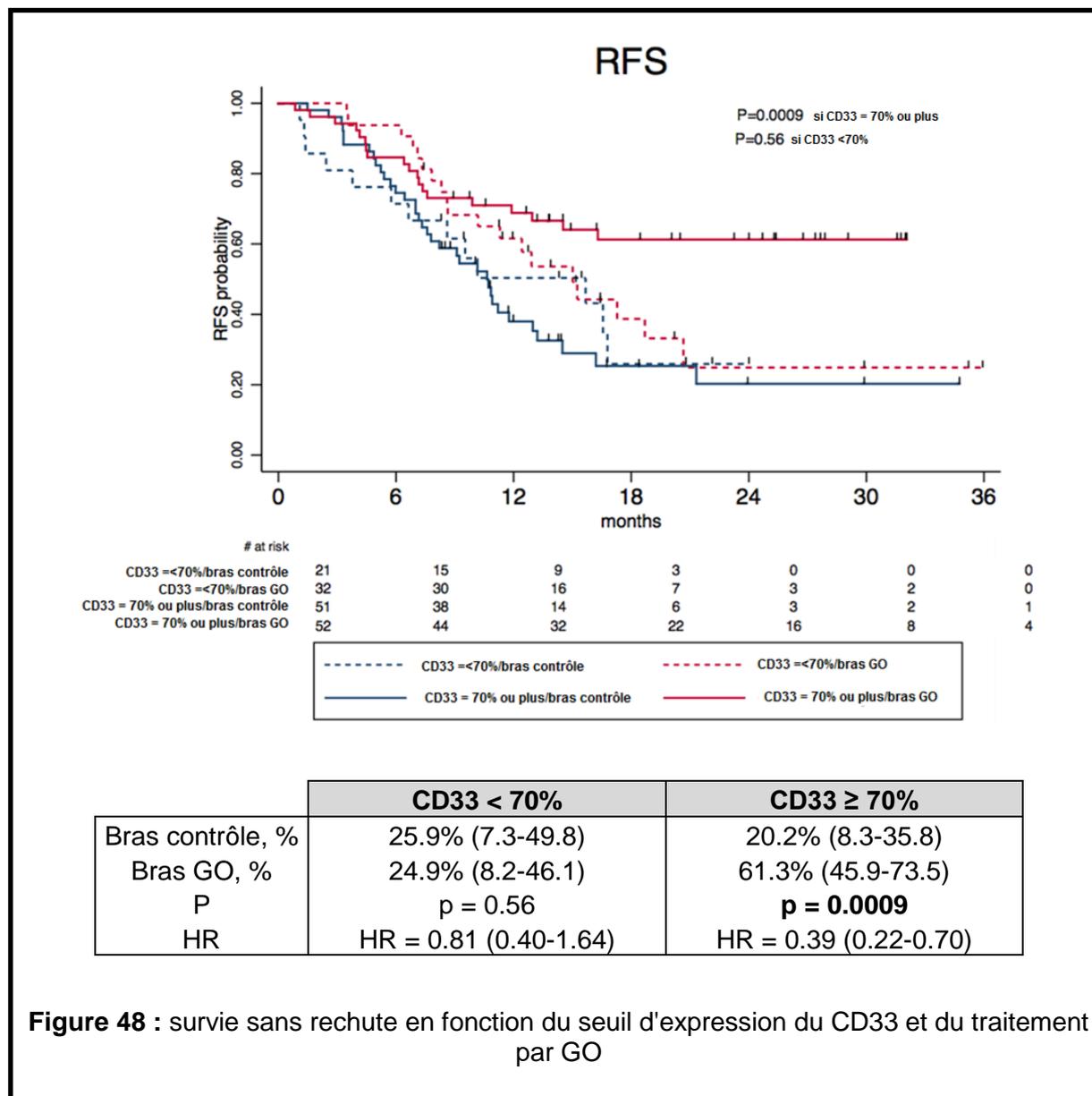
	CD33 <70%	CD33 ≥70%	p
Patients, N	70	130	-
CR, N	50	95	0.87
CRp, N	3	8	-
CR+CRp, N	53	103	0.59
EFS à deux ans, % (95% IC)	19.5 (9.2-32.6)	33.7 (24.9-42.6)	0.46
RFS à deux ans, % (95% IC)	26.3 (12.8-41.9)	42.5 (31.8-52.8)	0.53
OS à deux ans, % (95% IC)	47.8 (33.0-61.2)	44.1% (34.3-53.5)	0.62

IC: intervalle de confiance

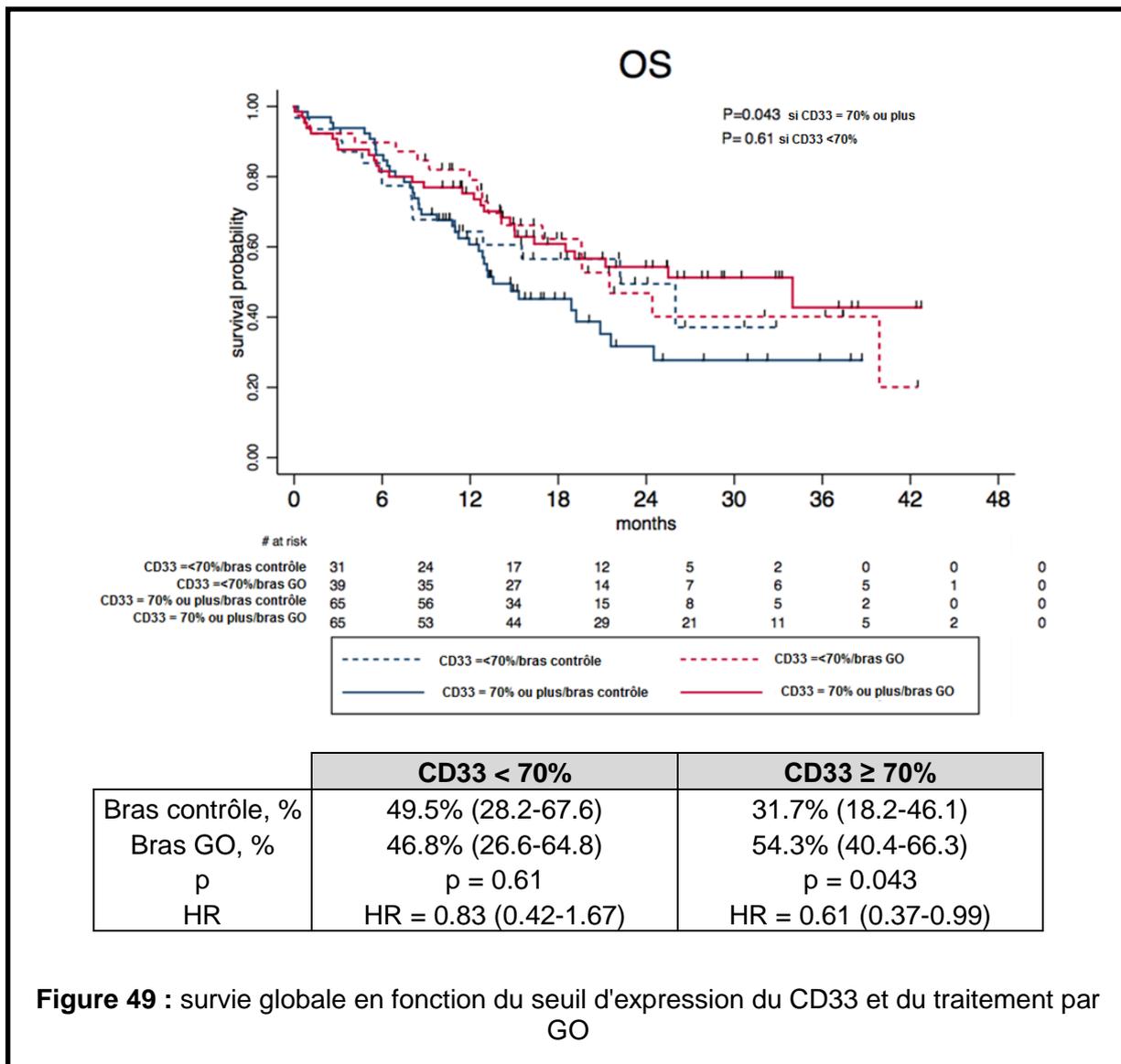
La figure 47 montre une amélioration significative de l'EFS à 2 ans chez les patients du groupe GO ayant une expression du CD33 supérieure ou égale à 70%.



La figure 48 montre une amélioration significative de la RFS à 2 ans chez les patients du groupe GO ayant une expression du CD33 supérieure ou égale à 70%.



La figure 49 montre une amélioration significative de l'OS à 2 ans chez les patients du groupe GO ayant une expression du CD33 supérieure ou égale à 70%.



Le tableau 11 montre une association significative :

- entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et le caractère hyperleucocytaire des LAM ;
- entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et une infiltration médullaire plus importante ;
- entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et la présence d'une mutation du gène NPM1 ;
- entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et la présence d'une mutation du gène FLT3-ITD.

Le tableau 11 montre une association non significative entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et la présence d'une mutation du gène CEBP $\alpha$ . Idem pour le gène RUNX1.

En revanche, il n'y a pas de lien significatif entre l'expression blastique du CD33 supérieure ou égale à 70% et la cytogénétique et le génotype.

Au final, le **seuil haut** placé à 70% correspond bien au seuil au-delà duquel le GO montre une meilleure efficacité. Il apparaît comme pertinent et corrélé aux images de cytométrie. Par conséquent, ce seuil haut a pu être renommé **seuil d'intérêt thérapeutique**.

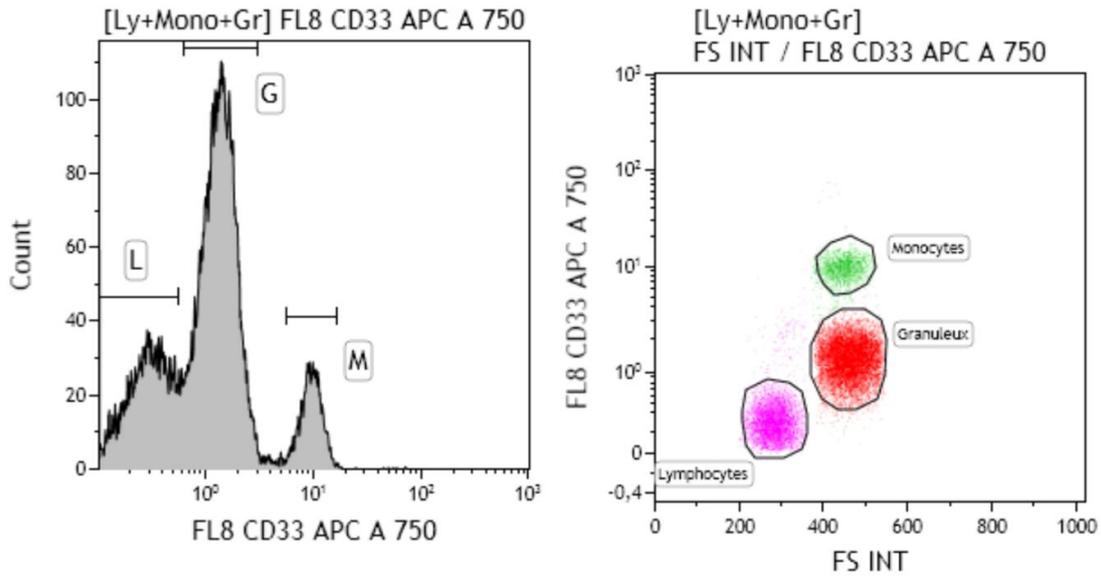
**Tableau 11** : profil des patients en fonction du seuil d'expression du CD33

	<b>CD33 &lt;70%</b>	<b>CD33 ≥70%</b>	<b>p</b>
Patients (nombre)	70	130	-
Bras de randomisation (GO/contrôle)	39/31	65/65	0.44
Age moyen en années (fourchette)	62.3 (50.1-70.8)	61.6 (50.2-70.9)	0.33
Sexe (mâle/femelle)	39/31	60/70	0.24
Taux moyen des GB, 10 <sup>9</sup> /L (fourchette)	3.0 (0.8-210.6)	11.75 (0.6-319.9)	0.0006
Compte moyen des PQ, 10 <sup>9</sup> /L (fourchette)	75 (8-698)	62 (3-710)	0.19
Taux moyen des blastes médullaires, % (fourchette)	52.5 (20-99)	93 (20-99)	<0.001
Cytogénétique			0.65
<i>Favorable</i>	4	3	0.42 *
<i>Intermédiaire</i>	45	85	
<i>Non favorable</i>	14	29	
<i>NF</i>	7	13	
<i>Mutation du gène NPM1</i>			<0.001
<i>Oui</i>	7	59	<0.001 *
<i>Non</i>	62	69	
<i>NF</i>	1	2	
<i>Mutation du gène FLT3-ITD</i>			<0.001
<i>Oui</i>	2	32	<0.001 *
<i>Non</i>	67	97	
<i>NF</i>	1	1	
<i>Mutation du gène CEBPα</i>			0.42
<i>Oui</i>	3	12	0.26 *
<i>Non</i>	60	102	
<i>NF</i>	7	16	
<i>Mutation du gène RUNX1</i>			0.12
<i>Oui</i>	9	7	0.095 *
<i>Non</i>	56	117	
<i>NF</i>	5	6	
Classification ELN			0.10
<i>Favorable</i>	10	31	0.051 *
<i>Intermédiaire-1</i>	24	46	
<i>Intermédiaire-2</i>	15	11	
<i>Non favorable</i>	14	29	
<i>NF</i>	7	13	

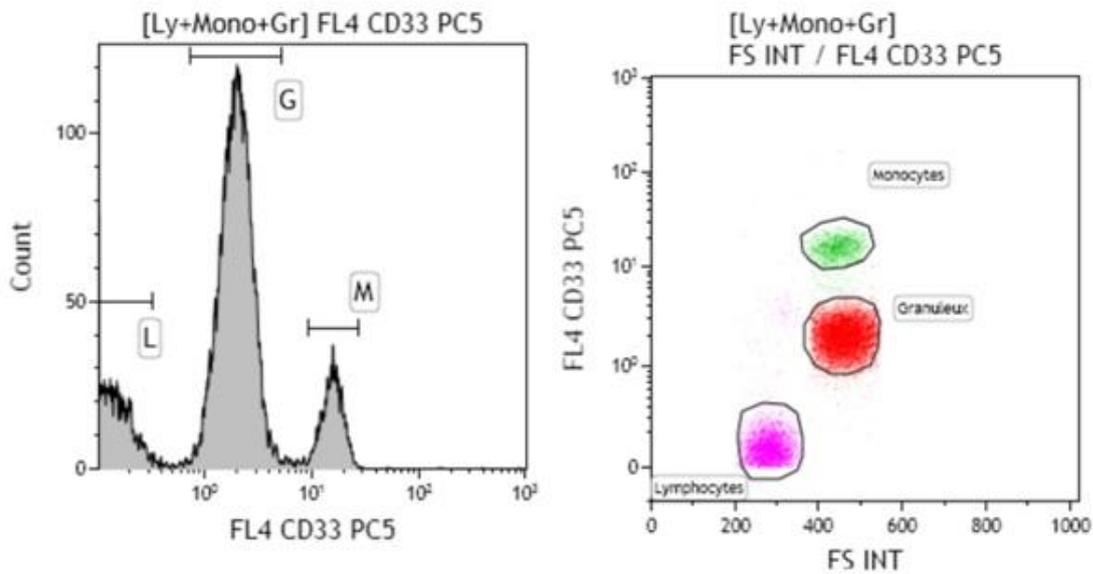
NF: non fait ; GB : globules blancs ; PQ : plaquettes ; \* : non faits (NF) non pris en compte

#### 4.3.4. Résultats de la comparaison d'anticorps anti-CD33

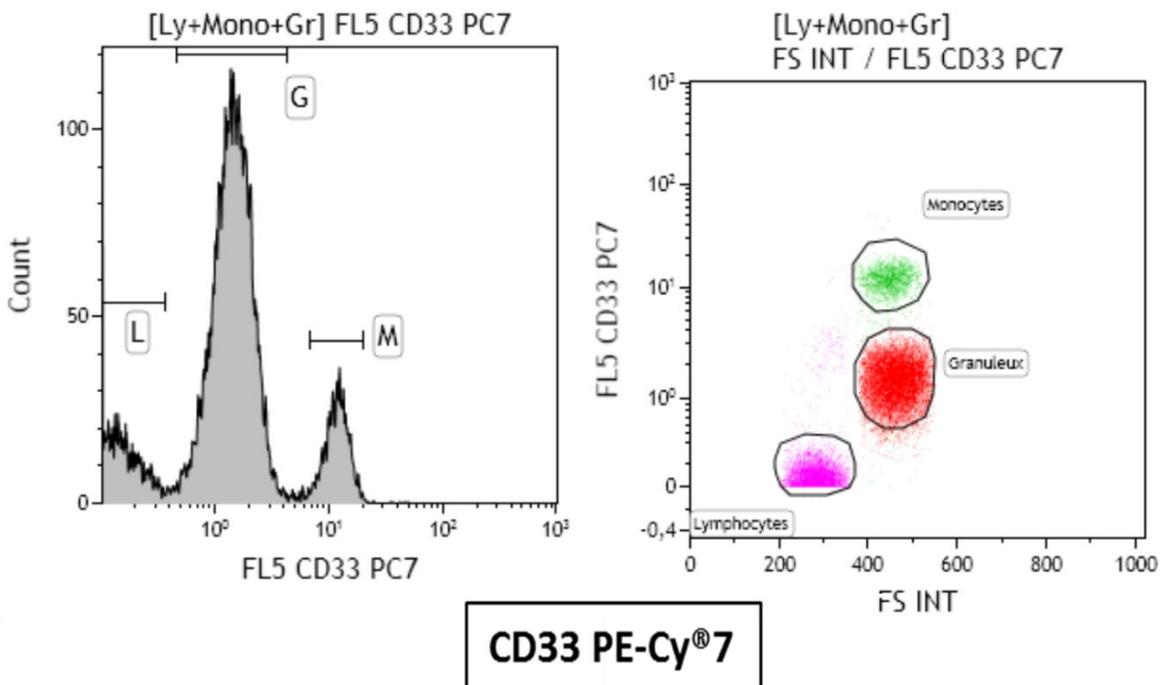
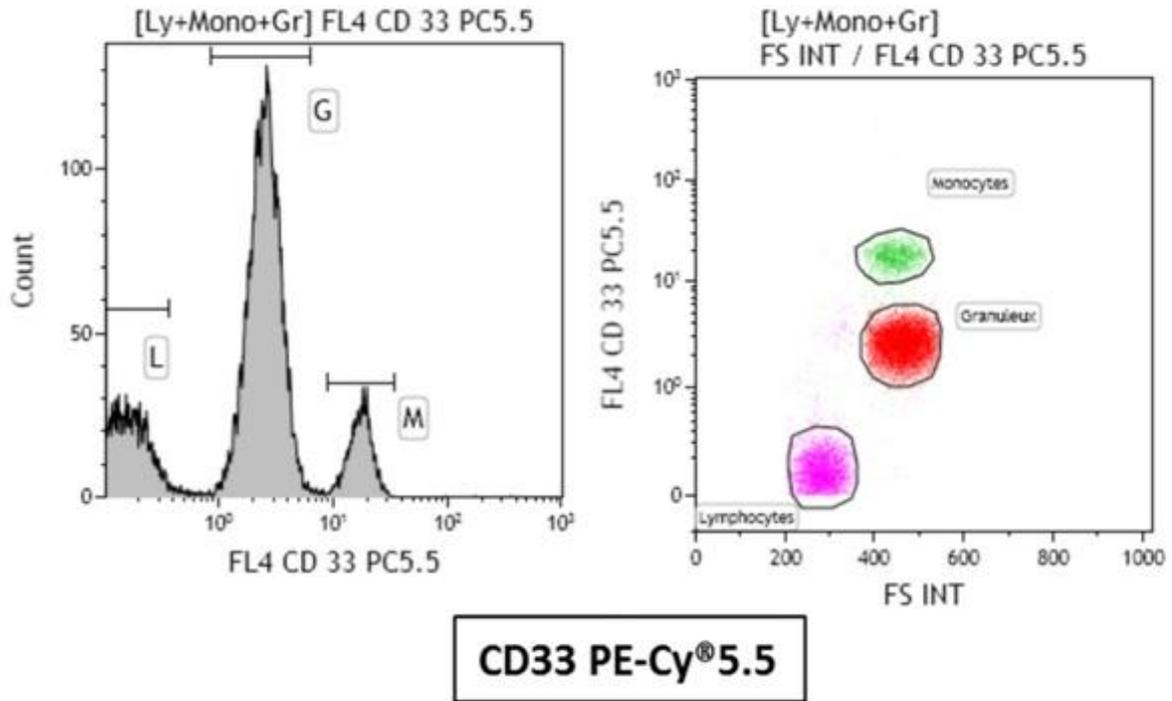
Le réglage des PMT a été finalement retenu à 600 Volts car c'est celui avec lequel on a obtenu les meilleures images de fluorescence sur les histogrammes (voir figure 50). Les résultats de la comparaison d'anticorps anti-CD33 sont présentés dans le tableau 12.



**CD33 APC-Alexa Fluor® 750**



**CD33 PE-Cy® 5**

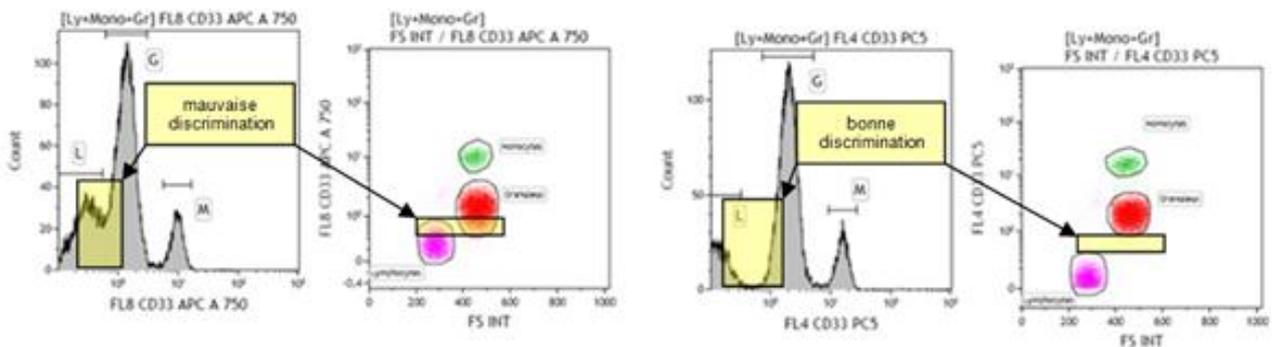


**Figure 50** : comparaison des différents anti-CD33 avec réglage des PMT à 600 Volts

**Tableau 12** : récapitulatif des résultats de comparaison des anti-CD33 (surlignés en jaune, les anticorps utilisables)

Anticorps testés	Nom du clone	Industrie	Mean CD33 (lymphocytes)	Mean CD33 (monocytes)	Mean CD33 (granuleux)	Mean CD33 [Monocytes] / Mean CD33 [Lymphocytes]	Mean CD33 [Granuleux] / Mean CD33 [Lymphocytes]
CD33 APC-Alexa Fluor® 750	D3HL60.251	Beckman Coulter®	0,28	9,76	1,42	34,86	5,071428571
CD33 PE-Cy®5			0,11	16,03	2,07	<b>145,73</b>	<b>18,8</b>
CD33 PE-Cy®5.5			0,13	17,72	2,65	<b>136,31</b>	<b>20,4</b>
CD33 PE-Cy®7			0,08	12,14	1,53	<b>151,75</b>	<b>19,1</b>

Les résultats après analyse ont montré une mauvaise séparation du pic d'intensité négative des lymphocytes et du pic d'intensité positive des granuleux avec l'anticorps CD33 APC-Alexa Fluor® 750 (voir figures 50 et 51).



**Figure 51** : mauvaise discrimination de l'anticorps CD33 APC-Alexa Fluor® 750

En outre, les écarts d'intensité de fluorescence entre témoins négatifs (lymphocytes) et témoins positifs (granuleux et monocytes) ont été clairement plus étroits pour l'anticorps CD33 APC-Alexa Fluor® 750 que pour l'ensemble des trois autres anticorps anti-CD33 qui, eux, ont été équivalents.

L'anticorps utilisé actuellement dans le panel LAM au laboratoire du CHU de Limoges n'a donc pas été remis en cause puisqu'il s'agit du CD33 PE-Cy®5. Cependant, devant la volonté de mettre en place un panel neuf couleurs pour le diagnostic des LAM, l'utilisation du CD33 PE-Cy®5.5 devenait indispensable afin d'éviter les interférences qui surviendraient lors d'une analyse en 9 couleurs entre les fluorochromes APC et PC5.

#### 4.4. Mise en place du nouveau protocole CD33 (marquage de surface)

##### 4.4.1. Ancien et nouveau protocoles

D'après l'étude de comparaison ci-dessus, un changement de protocole a donc été nécessaire puisqu'il a fallu d'une part passer de cinq à neuf couleurs et d'autre part, remplacer le CD33 PC5 par le CD33 PC5.5. Le tableau 13 résume les différents anticorps et leur fluorochrome associé entre l'ancien et le nouveau protocole.

Le choix des anticorps dans le nouveau protocole s'est basé sur les dernières recommandations existantes issues du GEIL, sur la disponibilité des anticorps et sur le souci d'éviter de trop grandes compensations de fluorescence (86).

**Tableau 13** : panel d'anticorps en fonction des protocoles

Ancien protocole 5 couleurs			Nouveau protocole 9 couleurs		
Laser	PMT	Anticorps & fluorochrome	Laser	PMT	Anticorps & fluorochrome
bleu	FL1	CD15 FITC	bleu	FL1	CD14 FITC
	FL2	CD13 PE		FL2	CD13 PE
	FL3	CD45 ECD		FL3	
	FL4	CD33 PC5		FL4	CD33 PC5.5
	FL5	CD34 PC7		FL5	CD34 PC7
rouge	FL6		rouge	FL6	CD117 APC
	FL7			FL7	CD7 A700
	FL8			FL8	CD11b A750
violet	FL9		violet	FL9	CD16 PB
	FL10			FL10	CD45 KO

**Légende** : KO = Krome Orange ; PB = Pacific Blue

#### 4.4.2. Stratégie de fenêtrage

Après réglage des PMT puis réalisation des compensations, les dot plots suivants ont été retenus (sur les 55 dot-plots réalisables au total) : (voir figure 52)

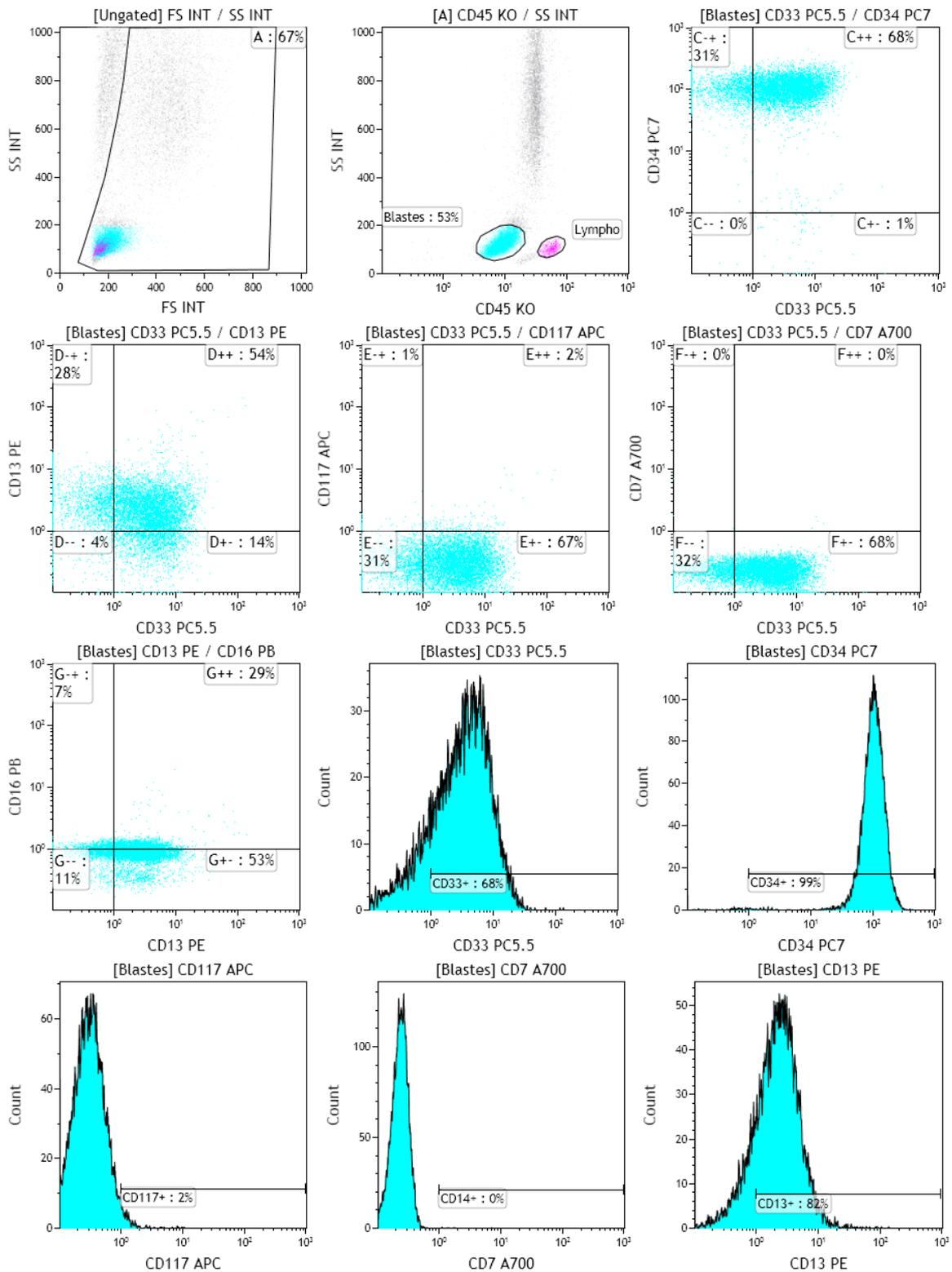
- dot plot non fenêtré (sur l'ensemble de la population cellulaire) avec SS en ordonnée et FS en abscisse pour une visualisation globale et l'isolement d'une population [A] mettant à part les déchets ;
- dot plot ciblé sur la population [A] avec SS en ordonnée et CD45 KO en abscisse pour l'isolement de la population éventuelle des blastes (population [Blastes]) et des lymphocytes (population [Lympho]) ;
- dot plot ciblé sur la population [Blastes] avec CD34 PC7 en ordonnée et CD33 PC5.5 en abscisse ;
- dot plot ciblé sur la population [Blastes] avec CD13 PE en ordonnée et CD33 PC 5.5 en abscisse ;
- dot plot ciblé sur la population [Blastes] avec CD117 APC en ordonnée et CD33 PC 5.5 en abscisse ;
- dot plot ciblé sur la population [Blastes] avec CD7 A700 en ordonnée et CD33 PC 5.5 en abscisse ;
- dot plot ciblé sur la population [Blastes] avec CD16 PB en ordonnée et CD13 PE en abscisse.

Dans tous les dot plots, les seuils de positivité ont été placés en première décade ( $10^0$ ) après vérification de l'intensité de la population [Lympho].

Par la suite, des histogrammes (monoparamétriques) ont été établis sur la population [Blastes] permettant une étude rapprochée des marqueurs exprimés par les blastes et une meilleure détermination des pourcentages : (voir figure 52)

- count / CD33 PC5.5 ;
- count / CD7 A700 ;
- count / CD34 PC7 ;
- count / CD13 PE.
- count / CD117 APC ;

Au final, ce protocole est adaptée à la routine.



**Figure 52 :** protocole CD33 avec visualisation de la stratégie de fenêtrage choisie (exemple d'un patient avec LAM)

## 4.5. Proposition d'une standardisation inter-centres

### 4.5.1. Utilisation des billes Rainbow®

Ce produit contient un mélange de billes Rainbow® de 3.2µM fluoresçant avec huit intensités différentes. Ces particules peuvent être excitées de 365 à 650 nm.

Leur utilisation permet de standardiser plusieurs cytomètres différents entre eux (billes stables d'un lot sur l'autre) et, accessoirement, de vérifier la sensibilité du système (45).

Il a donc fallu passer les billes Rainbow® avec les réglages des PMT du protocole CD33 et sans compensation. Sur le dot-plot SS/FS, une région rectangulaire a été mise en place autour du nuage observé (repérage des billes). Dans chacun des autres histogrammes, huit pics d'intensité différente ont été observés : (voir figure 53)

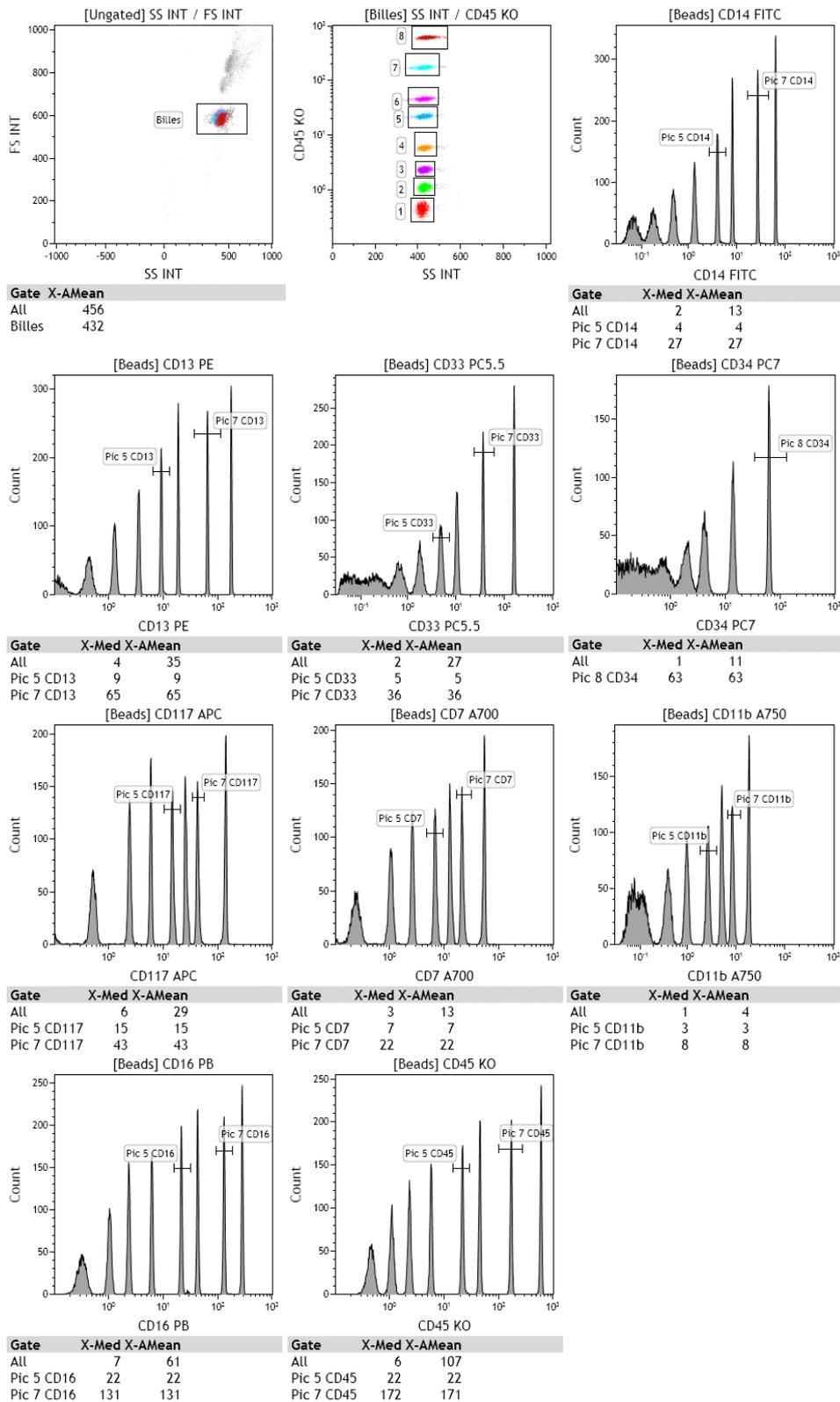
- sur les histogrammes count/FL1, count/FL2, count/FL4, count/FL6, count/FL7, count/FL8, count/FL9 et count/FL10 une région linéaire a été mise en place de part et d'autre des 5<sup>ème</sup> et 7<sup>ème</sup> pics ;
- sur l'histogramme count/FL5, une région linéaire a été mise en place de part et d'autre du 8<sup>ème</sup> pic.

Les pics 5 (et 8 pour le canal FL5) ont été choisis conformément aux recommandations du GEIL (Groupe d'Etude Immunologique des Leucémies) (86).

Le passage des billes Rainbow® sur le nouveau protocole CD33 a permis de relever les means des intensités maximales de fluorescence sur chacune des régions linéaires affectées. Ce sont ces means +/- 5 qui pourront permettre une standardisation (voir tableau 14).

**Tableau 14** : cibles d'intensité de fluorescence (MFI) à atteindre pour chaque fluorochrome

Fluorochromes (canal)		CD14 FITC (FL1)	CD13 PE (FL2)	CD33 PC5.5 (FL4)	CD34 PC7 (FL5)	CD117 FITC (FL6)	CD7 A700 (FL7)	CD11b A750 (FL8)	CD16 PB (FL9)	CD45 KO (FL10)
MFI (Beckman Coulter®)	5 <sup>ème</sup> pic	4 (1-9)	9 (4-14)	5 (1-10)		15 (10-20)	7 (2-12)	3 (1-8)	22 (17-27)	22 (17-27)
	7 <sup>ème</sup> pic	27 (22-32)	65 (60-70)	36 (31-41)		43 (38-48)	22 (17-27)	8 (3-13)	131 (126-136)	171 (166-176)
	8 <sup>ème</sup> pic				63 (58-68)					
MFI (Becton Dickinson®)	5 <sup>ème</sup> pic	1024 (256-2304)	2304 (1024-3584)	1280 (256-2560)		3840 (2560-5120)	1792 (512-3072)	768 (256-2048)	5632 (4352-6912)	5632 (4352-6912)
	7 <sup>ème</sup> pic	6912 (5632-8192)	16640 (15360-17920)	9216 (7936-10496)		11008 (9728-12288)	5632 (4352-6912)	2048 (768-3328)	33536 (32256-34816)	43776 (42496-45056)
	8 <sup>ème</sup> pic				16128 (14848-17408)					



**Figure 53** : histogrammes obtenus lors du passage des billes Rainbow® sur le protocole CD33 9 couleurs

**Légende** : FL1 = CD14 FITC ; FL2 = CD13 PE ; FL4 = CD33 PC5.5 ; FL5 = CD34 PC7 ; FL6 = CD117 APC ; FL7 = CD7 A700 ; FL8 = CD11b A750 ; FL9 = CD16 PB ; FL10 = CD45 KO

#### 4.5.2. Protocole de standardisation à usage des centres

Afin de standardiser les cytomètres entre eux vis-à-vis de ce nouveau protocole CD33 9 couleurs, on a donc pu proposer de suivre les démarches ci-dessous :

- passer les billes Rainbows® ;
- ajuster les voltages des PMT pour mettre les MFI (Mean Fluorescence Intensity) dans la cible (voir tableau 14) ;
- faire les compensations ;
- mettre en place la stratégie de fenêtrage (dot-plots et histogrammes) ;
- sauvegarder le protocole.

#### 4.6. Discussion

Le fractionnement des doses du GO a permis son introduction dans deux protocoles thérapeutiques en France malgré son retrait du marché aux Etats-Unis. Dans le protocole ALFA-0701, il a été administré aux patients entre 50 et 70 ans indépendamment de l'expression du CD33 par les blastes, ce qui a permis une étude rétrospective sur son efficacité en fonction de son niveau d'expression.

Comme aucune standardisation préalable n'avait été prévue, il a fallu mettre en place la stratégie la plus optimale possible pour évaluer l'expression du CD33. En effet, chaque cytomètre (y compris pour un même automate) a un système optique "unique" et donc des "images de cytométrie" qui lui sont propres.

Deux modes d'expression du CD33 ont été comparés, à savoir le pourcentage d'expression du CD33 et le *ratio* du mean de fluorescence des blastes sur le mean de fluorescence des lymphocytes. L'interprétation du *ratio* a été considérée comme impossible quand le nombre total des lymphocytes <sup>et/ou</sup> des blastes était inférieur à 500 événements ou quand le mean de fluorescence CD33 des lymphocytes était négatif (mean  $\leq$  0).

L'étude de concordance de ces deux paramètres chez 132 patients sur 200 a permis la mise en place de deux seuils :

- le **seuil de positivité biologique** : les blastes sont considérés CD33 positifs au-delà de 30% d'expression du CD33 <sup>et/ou</sup> pour un *ratio* supérieur à 5 ;
- le **seuil d'intérêt thérapeutique** : au-delà de 70% d'expression du CD33, le GO a montré son efficacité en terme de survie.

Une catégorie de patients non concordants avec un pourcentage supérieur à 70 et un *ratio* inférieur à 12 (catégorie 4) a été identifiée et se justifie par la position inadéquate du pic de fluorescence des lymphocytes (pic trop décollé par rapport à l'axe des ordonnées). Par conséquent, le *ratio* de mean calculé est très probablement sous-estimé.

Les courbes de survie sans rechute (RFS) et de survie globale (OS) présentées dans cette thèse ont été comparées aux courbes de RFS et d'OS de l'ELN (11).

Concernant la **RFS**:

- l'étude de l'ELN (11) montre :
  - pour les patients de **18 à 60 ans** : un pourcentage, estimé à partir des courbes, de 55% (groupe de risque intermédiaire I, IR I) et 30% (groupe de risque intermédiaire II, IR II) à 2 ans ;
  - pour les patients de **plus de 60 ans** : un pourcentage estimé de 25% à 2 ans (pourcentages identiques pour les groupes IR I et IR II) ;
- la thèse montre :
  - pour les patients de **50 à 70 ans** : un pourcentage de RFS de 61,3% à 2 ans (patients avec cytogénétique de risque intermédiaire, traités par GO et ayant une expression du CD33 supérieure à 70%).

Concernant l'**OS** :

- l'étude de l'ELN (9) montre :
  - pour les patients de **18 à 60 ans** : un pourcentage estimé de 45% (groupe IR I) et 35% (groupe IR II) à 2 ans ;
  - pour les patients de **plus de 60 ans** : un pourcentage estimé de 25% à 2 ans (pourcentages identiques pour les groupes IR I et IR II) ;
- la thèse montre :
  - pour les patients de **50 à 70 ans** : un pourcentage d'OS de 54,3% à 2 ans (patients avec cytogénétique de risque intermédiaire, traités par GO et ayant une expression du CD33 supérieure à 70%).

Au final, le gain de survie observé chez les patients ayant reçu le GO et avec expression du CD33 supérieure à 70% est bien attribuable au GO, indépendamment du risque pronostique de l'ELN.

A propos du *ratio*, une autre alternative aux témoins négatifs qu'étaient les lymphocytes aurait pu également être proposée, par exemple, les monocytes ou les granuleux, qui, à ce moment-là, auraient été utilisés comme témoins positifs. Mais, les monocytes, même s'ils sont par nature toujours CD33 positifs forts, étaient trop souvent en nombre trop faible voire en nombre nul dans les résultats récupérés. Quant aux granuleux, leur nombre était aussi souvent trop faible et leur fluorescence CD33 n'était pas suffisamment fiable. En effet, les granuleux sont, par nature, CD33 positifs faibles.

Pour l'étude de l'intérêt thérapeutique du GO, nous avons retenu les pourcentages d'expression du CD33 et non le *ratio* afin de prendre en compte l'ensemble des patients.

Après visualisation des images de cytométrie et du fait de sa concordance avec le *ratio* dans 85% des cas, le seuil de 70% s'est révélé être le plus optimal. En effet, pour une expression du CD33 supérieure à 70%, on retrouve un pic de CD33 nettement détaché des lymphocytes par rapport à une expression entre 30 et 70%.

En revanche, en l'absence de standardisation préalable, il n'a pas été possible d'étudier l'intensité d'expression du CD33. Pour un seuil supérieur à 70%, l'intensité d'expression du CD33 (mean de fluorescence) semble variable.

D'après les analyses statistiques entreprises, le GO a donc montré une efficacité plus importante au-delà du seuil de 70% fixé : la survie sans événement (EFS), la survie sans rechute (RFS) et la survie globale (OS) telles que définies dans l'étude ALFA-0701 ont, en effet, été significativement améliorées au-delà de ce seuil de 70% d'expression du CD33.

Cependant, cette thèse a révélé des disparités de pratique de CMF d'un centre à l'autre. Les difficultés sont liées aux différences de cytomètres, aux différences de réglages des cytomètres entre eux et aux anticorps utilisés pour le marquage cellulaire (plusieurs clones différents existent concernant la production des anticorps). Chaque pratique est en adéquation avec un rendu de résultat positif *versus* négatif, ce qui correspond aux usages actuels.

Un rendu de résultat quantitatif avec un seuil nécessite une meilleure harmonisation des pratiques mais aussi un suivi optimal de la précision du cytomètre. La vérification de la précision doit se faire par un suivi de mean de fluorescence par rapport à des billes calibrantes. L'harmonisation entre site peut, quant à elle, être largement facilitée par une standardisation du mean de fluorescence du CD33 comme il a été proposé dans cette thèse.

En conclusion, le retraitement des résultats de cytométrie des patients inclus dans l'étude ALFA-0701 a montré des premières conclusions pratiques, utilisables et extrapolables à tout centre faisant de la CMF.

## Conclusion

Ce travail de thèse a initialement permis la relecture centralisée des fichiers de CMF des patients inclus dans le protocole ALFA-0701. Après récupération des données informatiques et réalisation d'une étude de concordance, un seuil biologique de positivité a été établi à 30% d'expression du CD33 par les blastes et à un *ratio* de 5. Un seuil d'intérêt thérapeutique d'expression blastique du CD33 a également été mis en place : il a été placé à 70% grâce à la CMF.

Une amélioration significative de la survie des patients (EFS, RFS et OS) inclus et traités par le gemtuzumab ozogamicin (GO) a été mise en évidence lorsque les blastes avaient une expression du CD33 dépassant le seuil thérapeutique de 70%.

Par la suite, un nouveau protocole de CMF a été proposé afin de standardiser la détermination de l'expression du CD33 dans les leucémies aiguës myéloïdes. Ainsi la prescription de gemtuzumab ozogamicin sera-t-elle mieux encadrée et donc mieux sécurisée pour les cliniciens et leurs patients.

Enfin, la standardisation multicentrique de la détermination de l'expression du CD33 par la CMF permettra dans le futur de répondre au besoin lié à l'application de la norme NF ISO15189 (87) qui se met actuellement en place dans les laboratoires de biologie médicale.

## Références bibliographiques

1. 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. *The Lancet*. 2012 Apr;379(9825):1508–16.
2. WHO. WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. 4th ed. 2007.
3. Institut National du Cancer. Incidence et mortalité estimées des cancers en France métropolitaine en 2011 [Internet]. 2012 [cited 2013 May 16]. Available from: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/29-incidence-mortalite/38-ensemble-des-cancers/22-epidemiologie-des-cancers-en-france-metropolitaine-incidence-et-mortalite.html>
4. Institut National du Cancer. Epidémiologie des cancers chez les enfants de moins de 15 ans [Internet]. 2012 [cited 2013 May 16]. Available from: <http://lesdonnees.e-cancer.fr/les-fiches-de-synthese/21-epidemiologie/32-disparites-classe-dage/61-epidemiologie-cancers-enfants-moins-15-ans.html>
5. Kufe DW, Holland JF, Frei E, American Cancer Society. *Cancer medicine*. Hamilton, Ont.; Lewiston, NY: BC Decker; 2003.
6. Fohrer-Sonntag, Lioure Bruno. Leucémies aiguës. *La Revue du Praticien*. 2012 Feb;62(2):275–82.
7. Bennett J.M., Catovsky D., Daniel Marie-Therese, Flandrin G. Galton D.A.G, Gralnick H.R., Sultan C. Proposals for the classification of the acute leukemias French-American-British (FAB) Co-operative group. *British Journal of Haematology*. 1976 Aug;33(4):451–8.
8. Perrot Aurore. Caractéristiques cliniques et évolutives des leucémies aiguës myéloïdes à cytogénétique défavorable. [Faculté de médecine de Nancy]: Université Henri Poincaré, Nancy 1; 2009.
9. Louise M. Kelly, D. Gary Gilliland. Genetics of myeloid leukemias. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*. 2002 Sep;3:179–98.
10. Krzysztof Mrózek, Guido Marcucci, Peter Paschka, Susan P. Whitman and Clara D. Bloomfield. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2006 Aug;109(2):431–48.
11. Rollig C, Bornhauser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-Term Prognosis of Acute Myeloid Leukemia According to the New Genetic Risk Classification of the European LeukemiaNet Recommendations: Evaluation of the Proposed Reporting System. *Journal of Clinical Oncology*. 2011 May 31;29(20):2758–65.
12. Hartmut Döhner, Elihu H. Estey, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Alan K. Burnett, Hervé Dombret, Pierre Fenaux, David Grimwade, Richard A. Larson, Francesco Lo-Coco, Tomoki Naoe, Dietger Niederwieser, Gert J. Ossenkoppele, Miguel A. Sanz, Jorge Sierra, Martin S. Tallman, Bob Löwenberg and Clara D. Bloomfield. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults : recommendations from an international expert panel, on behalf of the European Leukemia Net. *Blood*. 2010 Jan 21;115(3):453–74.
13. F. Trimoreau, E. Guérin, N. Gachard, V. Leymarie, J.-L. Faucher, J. Feuillard, M.-C. Béné. Étapes préanalytiques pour la cytométrie en flux appliquée aux hémopathies. EMC. 2011. p. 1–6.
14. MC Béné, T Nebe, P Bettelheim, B Buldini, H Bumbea, W Kern, F Lacombe, P Lemez, I Marinov, E Matutes, M Maynadié, U Oelschlagel, A Orfao, R Schabath, M Solenthaler, G Tschurtschenthaler, AM Vladareanu, G Zini, GC Faure and A Porwit. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus

proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia* (2011) 25, 567–574. 2011;2011(25):567–74.

15. ELN. Consensual european immunophenotyping panels for leukemia. ELN; 2005.
16. Degos L, Dombret H, Chomienne C, Daniel MT, Miclea JM, Chastang C, Castaigne S, Fenaux P. All-transretinoic acid as a differentiating agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1995;85(10):2643–53.
17. Fenaux P, Mufti G, Hellström-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Sanz G, List A, Gore S, Seymour J, Backstrom J, Zimmerman L, McKenzie D, Beach C, Silverman L. Azacitidine Prolongs Overall Survival (OS) and Reduces Infections and Hospitalizations in Patients (Pts) with WHO-Defined Acute Myeloid Leukemia (AML) Compared with Conventional Care Regimens (CCR). *Blood*; 2008. p. Abstract 3636.
18. van der Helm LH, Veeger NJ, Kooy MV, Beeker A, de Weerd O, de Groot M, Alhan C, Hoogendoorn M, Laterveer L, van de Loosdrecht AA, Koedam J, Vellenga E, Huls G. Azacitidine results in comparable outcome in newly diagnosed AML patients with more or less than 30% bone marrow blasts. *Leukemia Research* [Internet]. 2013 Apr 26 [cited 2013 Jun 11]; Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0145212613001112>
19. Garcia-Manero G, Kantarjian HM, Sanchez-Gonzalez B, Yang H, Rosner G, Verstovsek S, Rytting M, Wierda WG, Ravandi F, Koller C, Xiao L, Faderl S, Estrov Z, Cortes J, O'Brien S, Estey E, Bueso-Ramos C, Fiorentino J, Jabbour E, Issa JP. Phase 1/2 study of the combination of 5-aza-2'-deoxycytidine with valproic acid in patients with leukemia. *Blood*. 2006;108(10):3271–9.
20. Kuendgen A, Bug G, Ottmann OG, Haase D, Schanz J, Hildebrandt B, Nachtkamp K, Neukirchen J, Dienst A, Haas R, Germing U, Gattermann N. Treatment of poor-risk myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia with a combination of 5-azacytidine and valproic acid. *Clin Epigenetics*. 2011 Aug;2(2):389–99.
21. Cate B, Samplonius DF, Bijma T, de Leij LF, Helfrich W, Bremer E. The histone deacetylase inhibitor valproic acid potently augments gemtuzumab ozogamicin-induced apoptosis in acute myeloid leukemic cells. *Leukemia*. 2007;21(2):248–52.
22. Zhou L, Konopleva M, Andreeff M. HDAC Inhibition by SNDX-275 (Entinostat) Restores Expression of Silenced Leukemia-Associated Transcription Factors Nur77 and Nor1 and of Key Pro-Apoptotic Proteins. *Blood*; 2008.
23. Ramsey JM, Kettyle LM, Sharpe DJ, Mulgrew NM, Dickson GJ, Bijl JJ, Austin P, Mayotte N, Cellot S, Lappin TR, Zhang SD, Mills KI, Kros J, Sauvageau G, Thompson A. Entinostat Prevents Leukemia Maintenance in a Collaborating Oncogene-Dependent Model of CN-AML. *Stem Cells* [Internet]. 2013 Apr 17 [cited 2013 Jun 11]; Available from: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/stem.1398/abstract;jsessionid=2EE64EC647B270F0731D7A0EC3941F47.d03t03>
24. Raffoux E, Cras A, Recher C, Boëlle PY, de Labarthe A, Turlure P, Marolleau JP, Reman O, Gardin C, Victor M, Maury S, Rousselot P, Malfuson JV, Maarek O, Daniel MT, Fenaux P, Degos L, Chomienne C, Chevret S, Dombret H. Phase 2 clinical trial of 5-azacitidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in patients with high-risk acute myeloid leukemia or myelodysplastic syndrome. *Oncotarget*. 2010 May;1(1):34–42.
25. Marcucci G, Stock W, Dai G, Klisovic RB, Liu S, Klisovic MI, Blum W, Kefauver C, Sher DA, Green M, Moran M, Maharry K, Novick S, Bloomfield CD, Zwiebel JA, Larson RA, Grever MR, Chan KK, Byrd JC. Phase I study of oblimersen sodium, an antisense to Bcl-2, in untreated older patients with acute myeloid leukemia: pharmacokinetics, pharmacodynamics, and clinical activity. *J Clin Oncol*. 2005;23(15):3404–11.
26. Moore J, Seiter K, Kolitz J, Stock W, Giles F, Kalaycio M, Zenk D, Marcucci G. A Phase II study of Bcl-2 antisense (oblimersen sodium) combined with gemtuzumab ozogamicin in older patients with acute myeloid leukemia in first relapse. *Leuk res*. 2006 Jul;30(7):777–83.

27. Breems DA, Boogaerts MA, Dekker AW, Van Putten WL, Sonneveld P, Huijgens PC, Van der Lelie J, Vellenga E, Gratwohl A, Verhoef GE, Verdonck LF, Lowenberg B. Autologous bone marrow transplantation as consolidation therapy in the treatment of adult patients under 60 years with acute myeloid leukaemia in first complete remission: a prospective randomized Dutch-Belgian Haemato-Oncology Co-operative Group (HOVON) and Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK) trial. *Br J Haematol.* 2005;128(1):59–65.
28. Podar K, Anderson KC. The pathophysiologic role of VEGF in hematologic malignancies: therapeutic implications. *Blood.* 2005;105(4):1383–95.
29. Wellbrock J, Fiedler W. Clinical experience with antiangiogenic therapy in leukemia. *Curr Cancer Drug Targets.* 2011 Nov;11(9):1053–68.
30. Lancet JE, Gojo I, Gotlib J, Feldman EJ, Greer J, Liesveld JL, Bruzek LM, Morris L, Park Y, Adjei AA, Kaufmann SH, Garrett-Mayer E, Greenberg PL, Wright JJ, Karp JE. A phase 2 study of the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in poor-risk and elderly patients with previously untreated acute myelogenous leukemia. *Blood.* 2007;109(4):1387–94.
31. Burnett AK, Russell NH, Culligan D, Cavanagh J, Kell J, Wheatley K, Virchis A, Hills RK, Milligan D; AML Working Group of the UK National Cancer Research Institute. The addition of the farnesyl transferase inhibitor, tipifarnib, to low dose cytarabine does not improve outcome for older patients with AML. *Br J Haematol.* 2012 Aug;158(4):519–22.
32. Recher C, Dos Santos C, Demur C, Payrastre B. mTOR, a new therapeutic target in acute myeloid leukemia. *Cell Cycle.* 2005;4(11):1540–9.
33. Altman JK, Sassano A, Platanias LC. Targeting mTOR for the treatment of AML. New agents and new directions. *Oncotarget.* 2011 Jun;2(6):510–7.
34. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med.* 2006;12(10):1167–74.
35. Ossenkuppele GJ, Stussi G, Maertens J, van Montfort K, Biemond BJ, Breems D, Ferrant A, Graux C, de Greef GE, Halkes CJ, Hoogendoorn M, Hollestein RM, Jongen-Lavrencic M, Levin MD, van de Loosdrecht AA, van Marwijk Kooij M, van Norden Y, Pabst T, Schouten HC, Vellenga E, Verhoef GE, de Weerd O, Wijermans P, Passweg JR, Löwenberg B. Addition of bevacizumab to chemotherapy in acute myeloid leukemia at older age: a randomized phase 2 trial of the Dutch-Belgian Cooperative Trial Group for Hemato-Oncology (HOVON) and the Swiss Group for Clinical Cancer Research (SAKK). *Blood.* 2012 Dec;120(24):4706–11.
36. Moldovan, A. Photoelectric Technique For The Counting of Microscopical Cells. *Science.* 1934 Aug 24;80(2069):188–9.
37. H. Jouault , M. Imbert. La cytométrie en flux: intérêt et applications en hématologie. *Revue Française des Laboratoires.* 1995 Apr;1995(275):29–35.
38. Beckman Coulter. Wallace H. Coulter 1913-1998 [Internet]. Available from: [http://www.beckmancoulter.com/hr/ourcompany/oc\\_WHCoulter\\_bio.asp](http://www.beckmancoulter.com/hr/ourcompany/oc_WHCoulter_bio.asp)
39. Applied Cytometry. Flow cytometry [Internet]. Available from: [http://www.appliedcytometry.com/flow\\_cytometry.php](http://www.appliedcytometry.com/flow_cytometry.php)
40. Shapiro H.M. Practical Flow Cytometry. 4ème édition. John Wiley & Inc.; 2003.
41. Hawley T.S, Hawley R.G. Flow Cytometry Protocols. 2ème ed. Humana Press; 2004.
42. Beckman Coulter. Flow Cytometry Glossary [Internet]. Available from: <http://www.coulterflow.com/bciflow/glossary/index.php>
43. Beckman Coulter. Human Clusters of Differentiation (CDs) [Internet]. Available from: <http://www.coulterflow.com/bciflow/cd.php>
44. Belov, L., et al. Immunophenotyping of leukemias using a cluster of differentiation antibody microarray. *Cancer Res.* 2001 Jun 1;61(12):4483–9.
45. Rowley Tom. Flow Cytometry - A Survey and the Basics [Internet]. Labome.com; 2012 [cited 2013 Jan 21]. Available from: <http://www.labome.com/method/Flow-Cytometry-A->

Survey-and-the-Basics.html

46. Belloc, F. Les Principes de la Cytométrie en Flux. *Revue Française des Laboratoires*. 1991;(218):p. 21-27.
47. Bluteau, M. Détection des Cellules Myéloïdes Immatures Sanguines par Cytométrie en Flux et Pentra 120. Bordeaux; 1999.
48. Díaz M, Herrero M, García LA, Quirós C. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*. 2010 Feb;48(3):385–407.
49. Becton Dickinson. Introduction to Flow Cytometry: A Learning Guide [Internet]. Available from: <http://www.bovauniversity.org/bova/html/education/msccourses/cyto/intro.pdf>
50. Beckman Coulter. Cytomètre en flux NAVIOS (R) , première édition. Beckman Coulter; 2009.
51. Orfao, A., et al. Flow cytometry: its applications in hematology. *Haematologica*. 1995;(80):69-81.
52. Perrin J-F. Biotechnologies et Bioanalyses [Internet]. Available from: <http://www.perrin33.com/biochanalys/photons/fluorescence.html>
53. Invitrogen. Excitation and Emission Wavelengths for Fluorochrome Conjugates for Flow Cytometry [Internet]. Invitrogen; 2013 [cited 2013 Feb 19]. Available from: [www.invitrogen.com](http://www.invitrogen.com)
54. Arnoulet, C., et al. Four- and five-color flow cytometry analysis of leukocyte differentiation pathways in normal bone marrow: a reference document based on a systematic approach by the GTLLF and GEIL. *Cytometry B Clin Cytom*. 2010;(78):4-10.
55. Lacombe, F., et al. Flow cytometry CD45 gating for immunophenotyping of acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1997;(11):1878-86.
56. BANCONS Pierre. Etude de deux nouveaux logiciels d'analyse multiparamétrique de données de cytométrie en flux. [Bordeaux]: Université Bordeaux 2 – Victor Segalen; 2010.
57. Stasi R, Evangelista ML, Buccisano F, Venditti A, Amadori S. Gemtuzumab ozogamicin in the treatment of acute myeloid leukemia. *Cancer Treatment Reviews*. 2008 Feb;34(1):49–60.
58. Ricart AD. Antibody-Drug Conjugates of Calicheamicin Derivative: Gemtuzumab Ozogamicin and Inotuzumab Ozogamicin. *Clinical Cancer Research*. 2011 Oct 14;17(20):6417–27.
59. Zein N, Sinha A, McGahren W, Ellestad G. Calicheamicin gamma 11: an antitumor antibiotic that cleaves double-stranded DNA site specifically. *Science*. 1988 May 27;240(4856):1198–201.
60. Center for drug evaluation and research application. Mylotarg® (gemtuzumab ozogamicin for Injection) for intravenous use only.
61. Philip R. Hamann , Lois M. Hinman, Irwin Hollander, Carl F. Beyer, Delores Lindh, Ryan Holcomb, William Hallett, Hwei-Ru Tsou, Janis Upeslakis, Dan Shochat, Andrew Mountain, David A. Flowers and Irwin Bernstein. Gemtuzumab Ozogamicin, A Potent and Selective Anti-CD33 Antibody–Calicheamicin Conjugate for Treatment of Acute Myeloid Leukemia. *Bioconjugate Chemistry*. 2001 Dec 19;13(1):47–58.
62. van der Velden VHJ, Boeckx N, Jedema I, te Marvelde JG, Hoogeveen PG, Boogaerts M, et al. High CD33-antigen loads in peripheral blood limit the efficacy of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg®) treatment in acute myeloid leukemia patients. *Leukemia*. 2004 Mar 18;18(5):983–8.
63. Walter RB. Multidrug resistance protein attenuates gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity in acute myeloid leukemia cells. *Blood*. 2003 Apr 24;102(4):1466–73.
64. Larson RA, Sievers EL, Stadtmauer EA, Löwenberg B, Estey EH, Dombret H, et al. Final report of the efficacy and safety of gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg) in patients with CD33-positive acute myeloid leukemia in first recurrence. *Cancer*. 2005 Oct 1;104(7):1442–

52.

65. Sievers EL, Larson RA, Stadtmauer EA, Estey E, Løwenberg B, Dombret H, et al. Efficacy and Safety of Gemtuzumab Ozogamicin in Patients With CD33-Positive Acute Myeloid Leukemia in First Relapse. *Journal of Clinical Oncology*. 2001 Jul 1;19(13):3244–54.

66. Petersdorf S, Kopecky K, Stuart RK, et al. Preliminary results of Southwest Oncology Group Study S0106: An international intergroup phase 3 randomized trial comparing the addition of gemtuzumab ozogamicin to standard induction therapy versus standard induction therapy followed by a second randomization to post-consolidation gemtuzumab ozogamicin versus no additional therapy for previously untreated acute myeloid leukemia. *Blood*, 114, abstr 790.; 2009.

67. Stephen H. Petersdorf, Kenneth J. Kopecky, Marilyn Slovak, Cheryl Willman, Thomas Nevill, Joseph Brandwein, Richard A. Larson, Harry P. Erba, Patrick J. Stiff, Robert K. Stuart, Roland B. Walter, Martin S. Tallman, Leif Stenke, and Frederick R. Appelbaum. A phase III study of gemtuzumab ozogamicin during induction and post-consolidation therapy in younger patients with acute myeloid leukemia. *Blood* [Internet]. 2013 Apr 16 [cited 2013 May 17]; Available from: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/early/2013/04/16/blood-2013-01-466706.full.pdf+html?hw-tma-check=true>

68. Castaigne S., Pautas C. Etude ALFA-0701 (Mylofrance 3) Etude de phase 3 randomisée multicentrique étudiant l'effet de l'addition de l'anticorps monoclonal Gemtuzumab Ozogamicin (Mylotarg) utilisé en doses fractionnées au traitement d'induction et de consolidation par Daunorubicine et Aracytine chez les patients atteints de Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM) et âgés de 50 à 70 ans. 2009.

69. Delaunay J. Protocole LAM 2006-IR. ONCORUN; 2008.

70. Jacques Delaunay, Christian Recher, MD, PhD, Arnaud Pigneux, MD, PhD, Francis Witz, MD, Norbert Vey, MD, Odile Blanchet, Pascale Lefebvre, Isabelle Luquet, Isabelle Guillerme, Christelle Volteau, Emmanuel Gyan, MD, PhD, Bruno Lioure, Eric Jourdan, Didier Bouscary, MD, PhD, Romain Guieze, MD, Edouard Randriamalala, Mario E Ojeda Uribe, MD, Francois Dreyfus, Catherine Lacombe, Marie-christine Béné, Jean-Yves Cahn, MD, Jean-Luc Harousseau, MD and Norbert Ifrah. Addition of Gemtuzumab Ozogamycin to Chemotherapy Improves Event-Free Survival but Not Overall Survival of AML Patients with Intermediate Cytogenetics Not Eligible for Allogeneic Transplantation. Results of the GOELAMS AML 2006 IR Study. San Diego Convention Center; 2011 [cited 2013 Feb 21]. Available from: <https://ash.confex.com/ash/2011/webprogram/Paper37338.html>

71. Ravandi F, Estey EH, Appelbaum FR, Lo-Coco F, Schiffer CA, Larson RA, et al. Gemtuzumab Ozogamicin: Time to Resurrect? *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Sep 17;30(32):3921–3.

72. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, et al. Identification of Patients With Acute Myeloblastic Leukemia Who Benefit From the Addition of Gemtuzumab Ozogamicin: Results of the MRC AML15 Trial. *Journal of Clinical Oncology*. 2010 Dec 20;29(4):369–77.

73. Burnett AK, Russell NH, Hills RK, Kell J, Freeman S, Kjeldsen L, et al. Addition of Gemtuzumab Ozogamicin to Induction Chemotherapy Improves Survival in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology*. 2012 Jul 30;30(32):3924–31.

74. Estey EH. Gemtuzumab ozogamicin with or without interleukin 11 in patients 65 years of age or older with untreated acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome: comparison with idarubicin plus continuous-infusion, high-dose cytosine arabinoside. *Blood*. 2002 May 29;99(12):4343–9.

75. Lowenberg B, Beck J, Graux C, van Putten W, Schouten HC, Verdonck LF, et al. Gemtuzumab ozogamicin as postremission treatment in AML at 60 years of age or more: results of a multicenter phase 3 study. *Blood*. 2010 Jan 26;115(13):2586–91.

76. 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*. 2012 Aug 14;27(1):75–81.

77. Hasle H, Abrahamsson J, Forestier E, Ha S-Y, Heldrup J, Jahnukainen K, et al. Gemtuzumab ozogamicin as postconsolidation therapy does not prevent relapse in children with AML: results from NOPHO-AML 2004. *Blood*. 2012 Jun 22;120(5):978–84.

78. Pollard JA, Alonzo TA, Loken M, Gerbing RB, Ho PA, Bernstein ID, et al. Correlation of CD33 expression level with disease characteristics and response to gemtuzumab ozogamicin containing chemotherapy in childhood AML. *Blood*. 2012 Feb 29;119(16):3705–11.

79. Roland B. Walter, Brian W. Raden, Darren M. Kamikura, Jonathan A. Cooper, and Irwin D. Bernstein. Influence of CD33 expression levels and ITIM-dependent internalization on gemtuzumab ozogamicin-induced cytotoxicity. *Blood*. 2005 Feb 1;105(3):1295–302.

80. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells Vincent H. J. van der Velden, Jeroen G. te Marvelde, Patricia G. Hoogeveen, Irwin D. Bernstein, Adriaan B. Houtsmuller, Mark S. Berger, and Jacques J. M. van Dongen. Targeting of the CD33-calicheamicin immunoconjugate Mylotarg (CMA-676) in acute myeloid leukemia: in vivo and in vitro saturation and internalization by leukemic and normal myeloid cells. *Blood*. 2001 May 15;97(10):3197–204.

81. Jedema I, Barge RM, van der Velden VH, Nijmeijer BA, van Dongen JJ, Willemze R, et al. Internalization and cell cycle-dependent killing of leukemic cells by Gemtuzumab Ozogamicin: rationale for efficacy in CD33-negative malignancies with endocytic capacity. *Leukemia*. 2003 Nov 13;2004(18):316–25.

82. Sun T. Flow cytometry and immunohistochemistry for hematologic neoplasms. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

83. Kaplan EL, Meier P. Non-parametric estimation from incomplete observations. *JASA*. 1958;(53):457–81.

84. D. R. Cox. Regression Models and Life-Tables. *Journal of the Royal Statistical Society*. 1972;34(2):187–220.

85. Patricia M. Grambsch, Terry M. Therneau. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika*. 1994;81(3):515–26.

86. GEIL. Recommandations GEIL pour le processus d'accréditation de la paillasse de cytométrie. GEIL; 2012.

87. Association Française de Normalisation. ISO 15189:2007. 2007.

## Table des annexes

Annexe 1. Nombre de transfusions par groupe (60) .....	120
Annexe 2. Evénements indésirables fréquemment rapportés ( $\geq 10\%$ ) lors du traitement par groupe d'âge : nombre (%) de patients (60) .....	121
Annexe 3. Schéma du protocole ALFA-0701 (68).....	123
Annexe 4. Protocole de l'étude LAM 2006 IR (69).....	124
Annexe 5. Tableau récapitulatif du nombre de résultats reçus et réanalysés (résultats par centre et résultats totaux) .....	126
Annexe 6. Tableau récapitulatif du nombre de panels d'anticorps utilisés par chaque centre et du type d'anticorps par panel (nom de l'anticorps et fluorochrome associé à l'anticorps).....	127
Annexe 7. Tableau récapitulatif des réanalyses de l'ensemble des fichiers LMD reçus .....	129
Annexe 8. Tableau récapitulatif des résultats ininterprétables (les cases colorées en jaune fluo sont les raisons pour lesquelles les résultats ont été exclus) .....	134
Annexe 9. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 1) : patients ayant une expression blastique du CD33 < 30% et un <i>ratio</i> < 5 (bleu = blastes ; fuchsia = lymphocytes) .....	136
Annexe 10. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 1) : patients ayant une expression blastique du CD33 < 30% et un <i>ratio</i> ininterprétable.....	137
Annexe 11. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 2) : patients ayant une expression blastique du CD33 entre 30% et 70% et un <i>ratio</i> entre 5 et 12 .....	138
Annexe 12. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 2) : patients ayant une expression blastique du CD33 entre 30% et 70% et un <i>ratio</i> ininterprétable.....	139
Annexe 13. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 3) : patients ayant une expression blastique du CD33 > 70% et un <i>ratio</i> > 12 .....	140
Annexe 14. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 3) : patients ayant une expression blastique du CD33 > 70% et un <i>ratio</i> ininterprétable.....	143
Annexe 15. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 4) : patients ayant une expression blastique du CD33 > 70% et un <i>ratio</i> entre 5 et 12 .....	145
Annexe 16. Histogrammes de CMF réanalysés (catégories 5 et 6) : patients "hors seuil" ..	146

## Annexe 1. Nombre de transfusions par groupe (60)

Transfusions	tous les patients	CR	CRp	NR
<b>N</b>	N = 277	N = 35	N = 36	N = 206
<b>Transfusions de plaquettes</b>				
<b>Moyenne (SD)</b>	NA	6.8 (7)	23.7 (67)	15.7 (20)
<b>(IC 95%) *</b>	NA	(5,6, 8,0)	(12,5, 34,9)	(14,3, 17,1)
<b>Transfusions de culots globulaires</b>				
<b>Moyenne (SD)</b>	NA	2.9 (3)	5.4 (4)	8.1 (22)
<b>(95% CI)</b>	NA	(2,4, 3,4)	(4,7, 10,1)	(8,0, 8,2)
* Calculé - moyenne $\pm$ erreur où se = sd / sqr (n)				

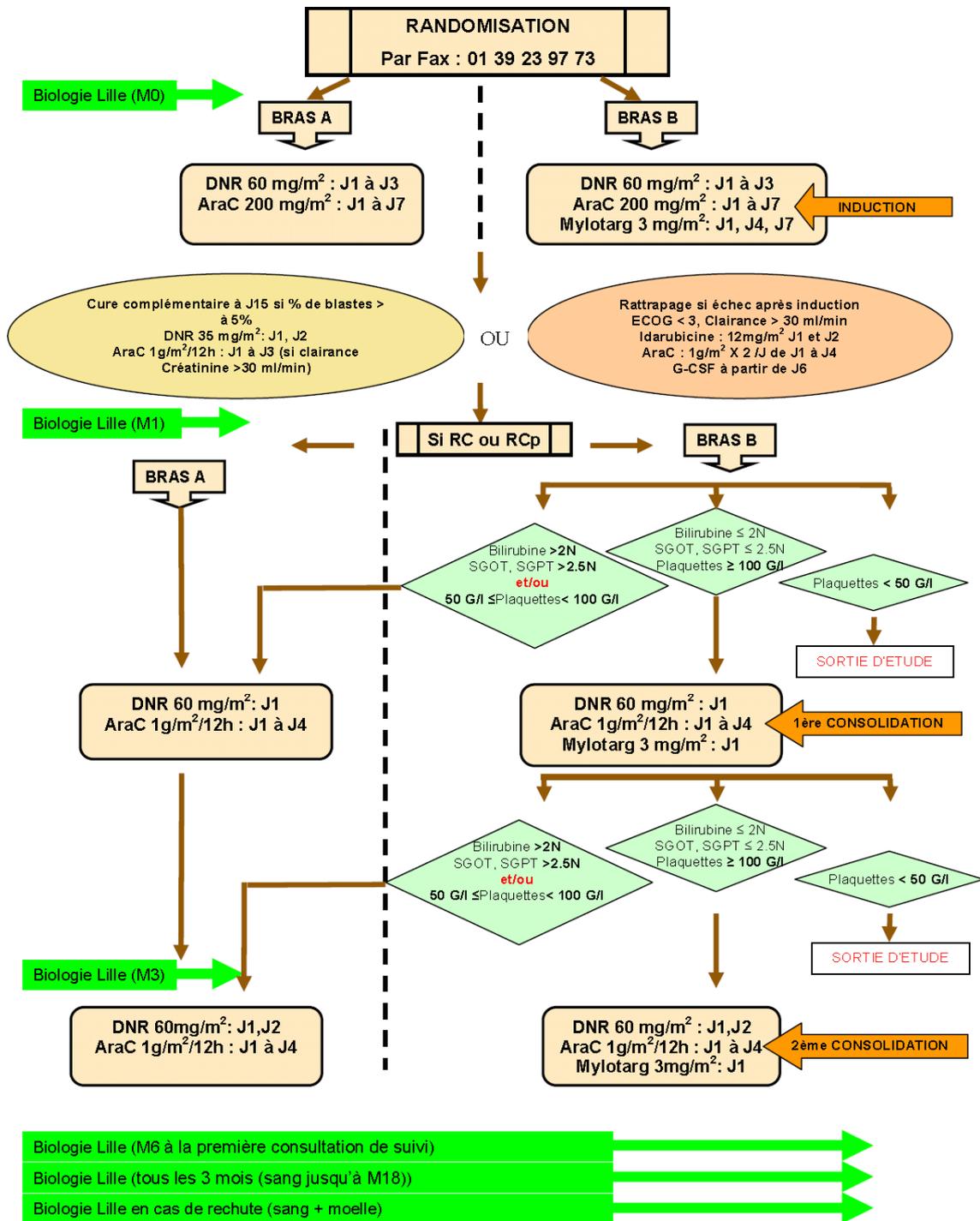
**Annexe 2. Evénements indésirables fréquemment rapportés ( $\geq 10\%$ ) lors du traitement par groupe d'âge : nombre (%) de patients (60)**

Événements indésirables	Âge du patient en années		
	Âge $\geq 60$ (N = 157)	Âge $<60$ (N = 120)	Tout âge (N = 277)
<b>Tout événement indésirable</b>	157 (100)	119 (99)	276 (100)
<b>Généraux</b>			
Douleurs abdominales	41 (26)	47 (39)	88 (32)
Asthénie	56 (36)	44 (37)	100 (36)
Rachialgie	19 (12)	19 (16)	38 (14)
Frissons	101 (64)	82 (68)	183 (66)
Fièvre	122 (78)	105 (88)	227 (82)
Céphalées	42 (27)	60 (50)	102 (37)
Infections	16 (10)	10 (8)	26 (9)
Fièvres neutropéniques	30 (19)	18 (15)	48 (17)
Douleurs	28 (18)	21 (18)	49 (18)
Sepsis	40 (25)	33 (28)	73 (26)
<b>Système cardio-vasculaire</b>			
Hémorragies	14 (9)	16 (13)	30 (11)
Hypertension	27 (17)	16 (13)	43 (16)
Hypotension	28 (18)	27 (23)	55 (20)
Tachycardie	17 (11)	11 (9)	28 (10)
<b>Système digestif</b>			
Anorexie	43 (27)	26 (22)	69 (25)
Constipation	36 (23)	27 (23)	63 (23)
Diarrhées	47 (30)	43 (36)	90 (32)
Dyspepsie	13 (8)	15 (13)	28 (10)
Anomalies des tests hépatiques	31 (20)	35 (29)	66 (24)
Nausées	99 (63)	89 (74)	188 (68)
Stomatites	34 (22)	35 (29)	69 (25)
Vomissements	83 (53)	79 (66)	162 (58)
<b>Sang et système lymphatique</b>			
Anémie	34 (22)	26 (22)	60 (22)
Ecchymoses	17 (11)	11 (9)	28 (10)
Leucopénies	67 (43)	62 (52)	129 (47)
Pétéchies	30 (19)	24 (20)	54 (19)

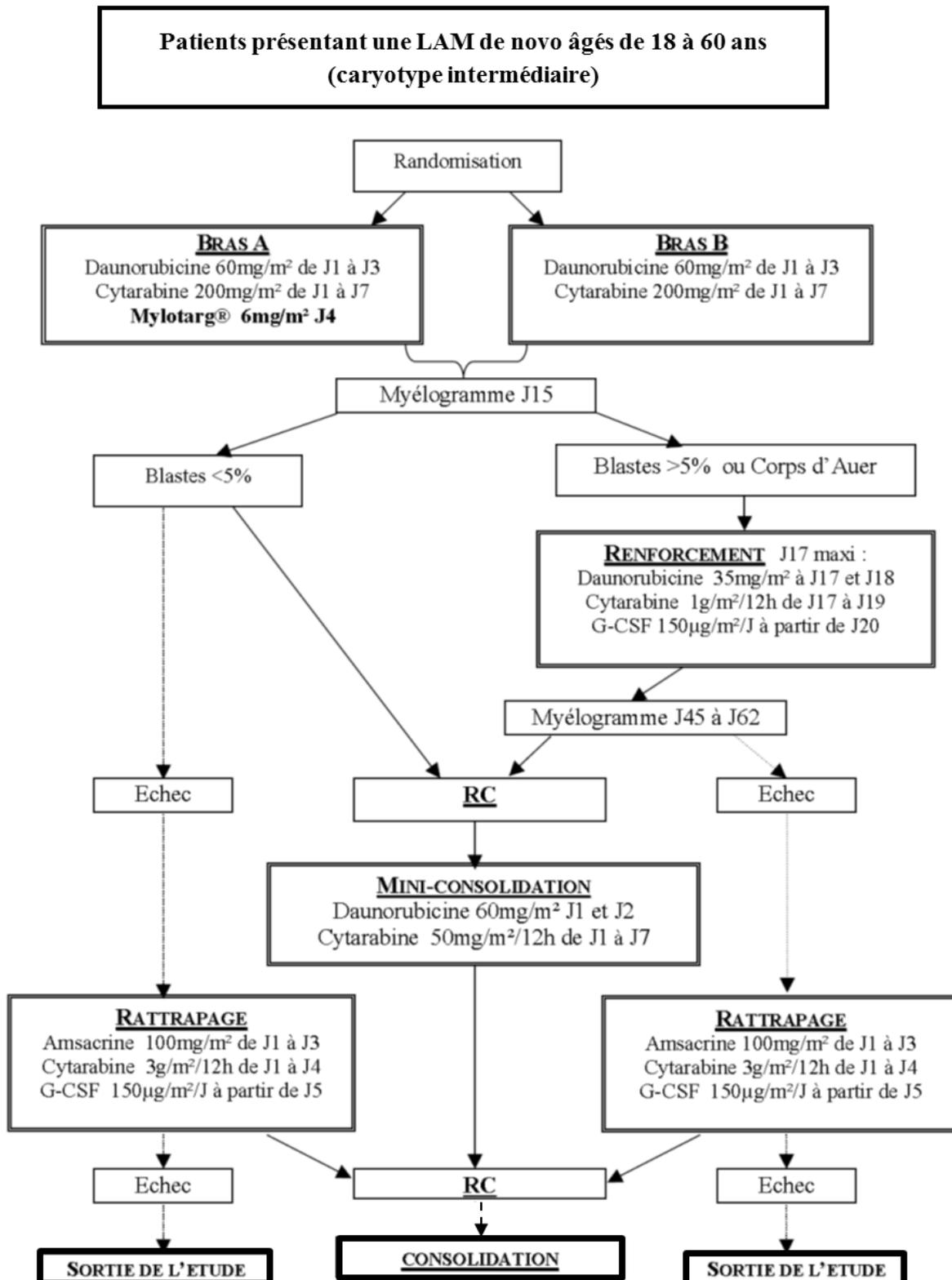
Thrombocytopénie	77 (49)	62 (52)	139 (50)
<b>Métabolisme et nutrition</b>			
Augmentation des phosphatases alcalines	15 (10)	6 (5)	21 (8)
Bilirubinémie	18 (11)	15 (13)	33 (12)
Hyperglycémie	17 (11)	12 (10)	29 (10)
Hypocalcémie	15 (10)	14 (12)	29 (10)
Hypokaliémie	38 (24)	35 (29)	73 (26)
Hypomagnésémie	4 (3)	12 (10)	16 (6)
Hypophosphatémie	9 (6)	12 (10)	21 (8)
Augmentation de la LDH	28 (18)	17 (14)	45 (16)
Œdème périphérique	30 (19)	10 (8)	40 (14)
Myalgie	5 (3)	13 (11)	18 (6)
Anxiété	15 (10)	8 (7)	23 (8)
Dépression	15 (10)	9 (8)	24 (9)
Vertiges	15 (10)	18 (15)	33 (12)
Insomnie	17 (11)	16 (13)	33 (12)
<b>Système respiratoire</b>			
Augmentation de la toux	28 (18)	19 (16)	47 (17)
Dyspnée	41 (26)	32 (27)	73 (26)
Épistaxis	37 (24)	41 (34)	78 (28)
Pharyngite	16 (10)	17 (14)	33 (12)
Pneumonie	20 (13)	15 (13)	35 (13)
Rhinite	11 (7)	12 (10)	23 (8)
<b>Peau et annexes</b>			
<i>Herpès simplex</i>	29 (18)	30 (25)	59 (21)
Prurit	6 (4)	12 (10)	18 (6)
Éruption	29 (18)	22 (18)	51 (18)
<b>Appareil génito-urinaire</b>			
Métrorragie	1 (2)	6 (10)	7 (3)
Hémorragie vaginale	3 (5)	9 (15)	12 (4)
<b>Événement indésirable associé à des facteurs divers</b>			
Réaction locale à la procédure	27 (17)	33 (28)	60 (22)

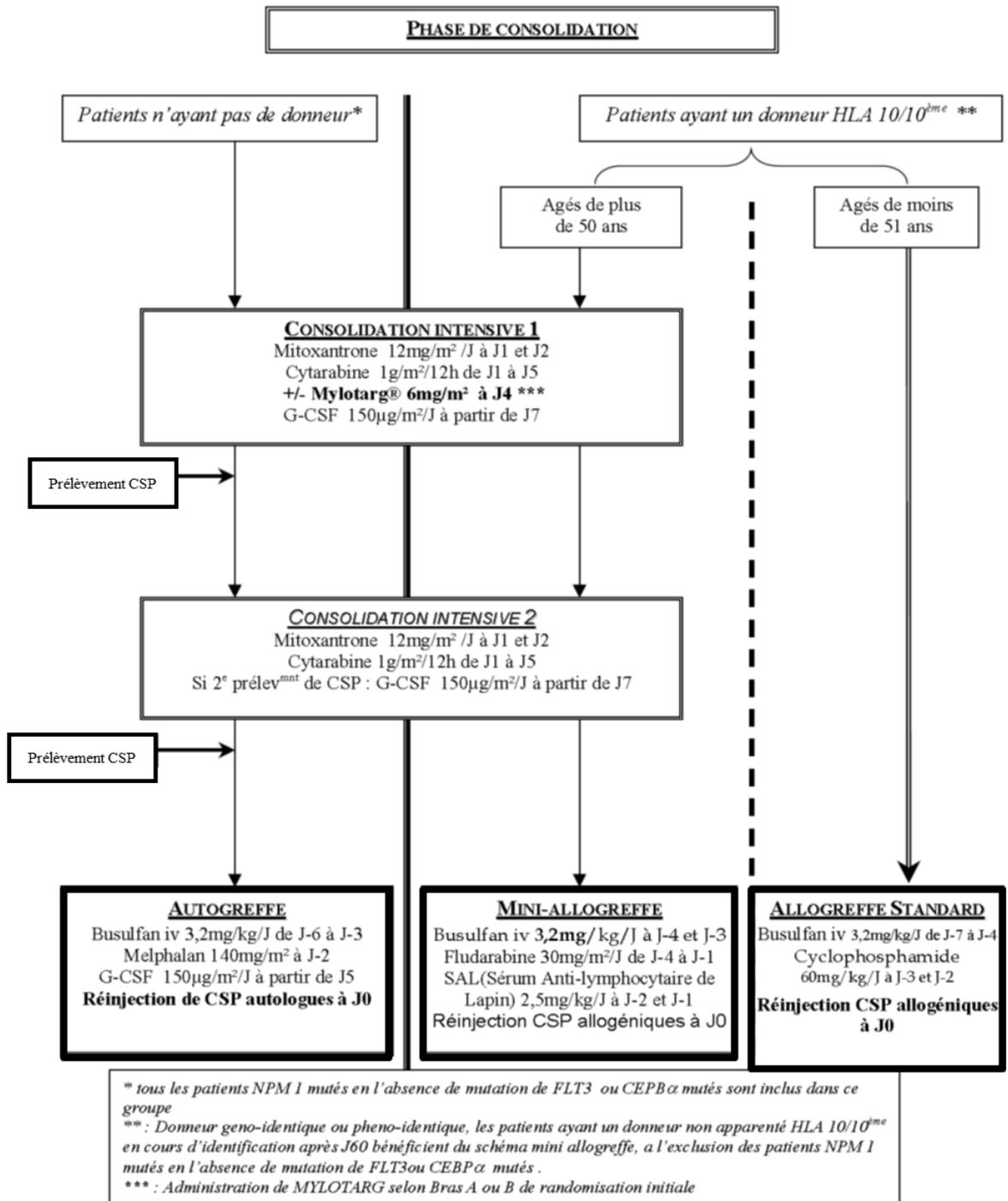
### Annexe 3. Schéma du protocole ALFA-0701 (68)

Tableau récapitulatif des traitements et de la biologie



## Annexe 4. Protocole de l'étude LAM 2006 IR (69)





## Annexe 5. Tableau récapitulatif du nombre de résultats reçus et réanalysés (résultats par centre et résultats totaux)

Centres (villes)	Nombre de patients inclus	Nombre de patients reçus et réanalysés	Remarques
AMIENS	9	9	
ARGENTEUIL	9	0	perte des LMD
AVICENNE	9	4	5 patients ont été retrouvés et un des 5 n'a pas pu être réanalysé par défaut du CD33
CAEN	14	14	retraitement des résultats sur le tube contenant l'anti- CD14
CORBEIL	7	0	résultats non envoyés (manque de temps)
CRETEIL	17	15	2 patients non retrouvés
DIJON	21	20	1 patient non retrouvé
DUNKERQUE	2	1	1 patient non retrouvé
HOTEL DIEU	18	18	
IGR	8	6	retraitement des résultats sur le tube contenant l'anti- CD14 et un retrait de consentement (DBIM = 405)
LENS	5	4	1 patient non retrouvé
LILLE	5	4	1 patient non retrouvé
LIMOGES	21	21	
LYON	16	15	un retrait de consentement (DBIM = 1008)
MEAUX	2	1	analyse faite par le centre de la Pitié Salpêtrière 1 patient non retrouvé
NECKER	7	7	relecture en collaboration avec le centre de Necker pour confirmation du fenêtrage des blastes
NICE CAC	10	9	
PARIS SAINT LOUIS	33	16	6 patients avec défaut de corrélation entre la date du diagnostic et la date de randomisation
PERCY	12	11	1 patient non envoyé (raison inconnue)
PITIE	2	2	
PONTOISE	2	2	
ROUBAIX	8	5	3 patients non envoyés (raison inconnue)
ROUEN	12	6	relecture en collaboration avec Rouen 6 patients non retrouvés
SAINT CLOUD	4	3	1 patient non récupéré (envoyé au laboratoire CERBA)
VALENCIENNES	5	5	
VERSAILLES	22	2	2 prélèvements récupérés depuis changement récent du cytomètre (toutes les données antérieures à Juillet 2010 sont conservées en mode papier)
	280	<b>202</b>	
	%	<b>72,1</b>	

**Annexe 6. Tableau récapitulatif du nombre de panels d'anticorps utilisés par chaque centre et du type d'anticorps par panel (nom de l'anticorps et fluorochrome associé à l'anticorps)**

Centres	Nombre de panels d'anticorps	Anticorps utilisés dans chaque panel	Patients correspondants
AMIENS	2	CD24 FITC, CD33 PE, CD45 ECD, CD117 PC5 CD14 FITC, CD13 PE, CD45 ECD, CD33 PC5	BONLU, LIBCA, WOJGA, SCHMA, CARAN, LAVGI BEACL, LEVLI, LANMI
ARGENTEUIL	0	0	0
AVICENNE	1	CD15 FITC, CD117 PE, CD45 PC5.5, CD34 PC7.7, CD33 APC, HLA-DR APC Cy7	tous
CAEN	1	CD65 FITC, CD56 PE, CD45 PC5.5, CD33 APC	tous
CORBEIL	0	0	0
CRETEIL	1	CD15 FITC, CD13 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7	tous
DIJON	2	CD34 FITC, CD13 PE, CD33 PC5, CD45PC7 CD15 FITC, CD13 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7	BRIJE, CONRO, QUIHE JAUJE, POUJU, GUEHE, BRUMA, KOECL, BORCL, SKRAN, GESMI, JOUBE, NAUJE, DECLU, MAREL, BOXMI, JUEPA, LERFA, PIGCA, LECHE
DUNKERQUE	1	CD7, CD117, CD45, CD33, CD34	tous
HOTEL DIEU	2	CD34 FITC, CD33 PE, CD45 PC5.5, CD117 APC CD34 FITC, CD33 PE, CD45 PC5.5, HLADR APC	ALLJA, DEPRE, HAFMH, HUCMI, LOUFL, OUFFA, PITAN, QUIMA, RAYST, TCHPI, VESJI BOSJE, SZIKA, TEOLO
IGR	2	CD14 FITC, CD13 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7 CD15 FITC, CD33 PE, CD45 ECD, CD11b PC5, CD34 PC7	TENYO, MALPA, LECHE, DACLE, COUJO, BIACH MAADA
LENS	1	CD19 FITC, CD10 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7	tous
LILLE	1	CD7, CD117, CD45, CD33, CD34	tous
LIMOGES	1	CD15 FITC, CD13 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7	tous
LYON	2	CD7 FITC, CD13 PE, CD33 PC5.5, CD38 PC7, CD34 APC, CD45 APC-Cy7, CD19 Pacific Blue CD2 FITC, CD22 PE, CD33 PC5.5, HLADR PC7, CD10 APC, CD45 APC-Cy7	BAHSO, BOUEL, FERJO, GIRDO, LAMMA, MALPA, MORJA, POMDA, TOUAL FEHLE, GRIAL, MERGE, POLRO, SEGPH, SERRO
MEAUX	1	HLA-DR, CD33, CD45, CD34	tous
NECKER	5	CD13 FITC, CD33 PE, CD34 PC5.5, CD117 PC7, CD123 APC, CD4 PB, CD45 V2 CD65 FITC, CD13 PE, CD33 PC5.5, CD117 PC7, CD123 APC, CD38 A700, CD4 PB, CD45 V2	A PANEL LAM MOT, B LAM MOT B FACON MOT NADAUD AH LAM MOT, BH LAM MOT A FACON MOT

		<p>CD10 FITC, CD33 PE, CD45 APC</p> <p>CD13 FITC, CD33 PE, CD34 PC5.5, CD117 PC7, CD123 APC, CD4 V450, CD45 V500 Horizon</p> <p>CD13 FITC, CD33 PE, CD34 PC5.5, CD117 PC7, CD123 APC, CD45 V2</p>	
NICE CAC	1	CD15 FITC, CD117 PE, CD34 PC5.5, CD33 PC7, HLADR APC, CD45 APC 7	tous
PARIS SAINT LOUIS	4	<p>CD65 FITC, CD34 PE, CD19 PC5.5, CD13 PC7, CD33 APC, CD45 APC7</p> <p>CD15 FITC, CD34 PC7, CD13 PE, CD33 APC, CD45 PC5.5</p> <p>CD15 FITC, CD13 PE, CD45 PC5.5, CD34 PC7, CD33 APC</p> <p>CD14 FITC, CD13 PE, CD19 PC5.5, CD33 APC, CD45 APC7</p>	<p>ALIMI, BRIGE, FOUJA, GOUMI, WUCCA, ZOUFA</p> <p>JOUCH</p> <p>BIGNA, FROJE, PENSE, THINA, ALVLY, MEBDA, OLDLI</p> <p>HEMJA</p>
PERCY	1	CD7 FITC, CD33 PE, CD45 PC7	tous
PITIE	1	HLADR FITC, CD33 PE, CD45 PC5.5, CD34 APC	tous
PONTOISE	2	<p>CD14 FITC, CD33 PE, CD45 ECD, CD11b PC5, CD34 PC7</p> <p>HLA-DR FITC, CD33 PE, CD45 ECD, CD117 PC5, CD34 PC7</p>	<p>BADSE</p> <p>MILLE</p>
ROUBAIX	1	CD7, CD117, CD45, CD33, CD34	tous
ROUEN	1	CD33 FITC, CD22 PE, CD45 Cya5	tous
SAINT CLOUD	1	CD7 FITC, CD13 PE, CD45 PerCP, CD33 APC	tous
VALENCIENNES	1	CD19 FITC, CD10 PE, CD45 ECD, CD33 PC5, CD34 PC7	tous
VERSAILLES	1	CD65 FITC, CD117 PE, CD13 PC5.5, CD34 PC7, CD33 APC, HLADR V450, CD45 V500	tous

## Annexe 7. Tableau récapitulatif des réanalyses de l'ensemble des fichiers LMD reçus

Centres	DBIM (numéro d'inclusion ALFA-0701)	Patients (initiales)	Nombre de cellules (population [A])	Nombre de blastes (population [Blastes])	Nombre de lymphocytes (population [Lympho])	Pourcentage de blastes (population [Blastes Bis])	Mean CD33 [Lympho]	Mean CD33 [Blastes]	Ratio mean CD33 [Blastes] / mean CD33 [Lympho]
<b>Amiens</b>	<b>2303</b>	<b>BEACL</b>	<b>97343</b>	<b>515</b>	<b>10152</b>	<b>15,53</b>	<b>-0,06</b>	<b>1,72</b>	<b>ininterprétable</b>
Amiens	2301	BONLU	24655	19981	312	96,28	1,02	6,8	ininterprétable
Amiens	2306	CARAN	26386	11933	5832	1,33	0,56	0,53	0,95
Amiens	2309	LANMI	12203	9481	1065	63,67	-0,29	0,97	ininterprétable
Amiens	2307	LAVGIL	12584	1919	1761	99,84	0,07	29,94	427,71
Amiens	2308	LEVLI	11474	657	5790	60,27	0,71	4,81	6,77
Amiens	2302	LIBCA	20954	4693	8258	8,01	0,65	0,74	1,14
Amiens	2305	SCHMA	15409	5082	5218	99,86	0,7	9,83	14,04
Amiens	2304	WOJGA	7485	5146	151	3,77	0,77	0,91	ininterprétable
<b>Avicenne</b>	<b>601</b>	<b>ASTOD</b>	<b>119670</b>	<b>7273</b>	<b>12833</b>	<b>97,69</b>	<b>0,22</b>	<b>21,11</b>	<b>95,95</b>
Avicenne	602	EMBME	12933	8945	348	79,47	0,45	8,63	19,18
Avicenne	605	PANPI	34182	8084	9969	7,92	0,13	0,57	4,38
Avicenne	606	RENDA	14212	8633	287	99,71	1,2	23,77	ininterprétable
<b>Caen</b>	<b>907</b>	<b>CARGU</b>	<b>121889</b>	<b>75380</b>	<b>8954</b>	<b>99,17</b>	<b>1,07</b>	<b>84,15</b>	<b>78,64</b>
Caen	901	CHAJO	104865	3222	4682	77,13	0,29	27,99	96,52
Caen	911	CHAMI	35294	7871	22291	59,56	1,23	12,35	10,04
Caen	912	COLAL	94836	80843	5451	17,64	0,85	2,11	2,48
Caen	904	DISAL	102542	13539	15878	31,24	0,52	3,94	7,58
Caen	903	LAFJO	48894	33634	1671	99,77	0,63	33,73	53,54
Caen	913	LEHMA	189069	37129	15039	99,88	1,13	46,02	40,73
Caen	905	LELMA	130027	22180	52522	94,38	1,14	80,55	70,66
Caen	914	LEMEL	285695	51895	12705	98,97	1,28	41,65	32,54
Caen	908	MONJO	72751	30793	8855	65,03	1,2	8,61	7,18
Caen	910	RAFJE	83795	65961	3620	99,83	2,4	124,03	51,68
Caen	909	ROUCH	76589	7588	28022	66,91	0,9	10,63	11,81
Caen	906	RUAAN	147721	25579	5177	61,21	1,01	6,24	6,18
Caen	902	TEYCH	115878	37962	31372	30,51	0,27	2,5	9,26
<b>Créteil</b>	<b>206</b>	<b>BABMA</b>	<b>95871</b>	<b>6015</b>	<b>11773</b>	<b>97,06</b>	<b>0,94</b>	<b>17,44</b>	<b>18,55</b>
Créteil	203	BERNI	97552	53242	8399	98,64	-0,52	12,03	ininterprétable
Créteil	214	CHEMO	149948	94787	6042	85,09	-0,19	7,54	ininterprétable
Créteil	215	COCHE	50332	22074	7162	99,18	-0,48	21,6	ininterprétable
Créteil	217	COREV	44663	37497	0	0,12	-0,1	-0,28	ininterprétable
Créteil	204	DEBAB	99360	55085	14846	87,32	-0,35	2,77	ininterprétable
Créteil	209	EARSY	149885	94144	10126	96,98	0,73	22,92	31,40
Créteil	210	FIANI	149358	68701	18074	99,58	1,04	24,34	23,40
Créteil	207	GERJA	24660	4010	9611	18,15	2,04	2,92	1,43
Créteil	212	GOMCA	54088	31543	10652	97,42	0,53	14,09	26,58

Créteil	208	LEJDO	45351	7186	16038	<b>84,51</b>	1,04	12,05	<b>11,59</b>
Créteil	216	MEETA	149956	126818	5122	<b>49,37</b>	-0,47	1,71	<b>ininterprétable</b>
Créteil	201	MISLU	98587	3589	9229	<b>50,57</b>	-3,53	3,33	<b>ininterprétable</b>
Créteil	211	MORCA	47285	2533	21834	<b>64,98</b>	-0,16	4,7	<b>ininterprétable</b>
Créteil	205	VIACH	50745	8138	23422	<b>40,37</b>	-0,53	1,34	<b>ininterprétable</b>
<b>Dijon</b>	<b>1216</b>	<b>BORCL</b>	<b>8531</b>	<b>5200</b>	<b>415</b>	<b>51,77</b>	<b>-0,13</b>	<b>1,22</b>	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1207	BOXMI	25396	3869	1362	<b>37,58</b>	0,1	1,03	<b>10,30</b>
Dijon	1203	BRIJE	27237	14333	848	<b>87,97</b>	0,34	4,21	<b>12,38</b>
Dijon	1214	BRUMA	11797	3880	1437	<b>88,84</b>	0,09	2,68	<b>29,78</b>
Dijon	1204	CONRO	17404	4704	785	<b>99,68</b>	1,17	13,74	<b>11,74</b>
Dijon	1221	DECLU	17178	3788	3060	<b>25,18</b>	-0,57	0,84	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1218	GESMI	24812	7729	661	<b>88,7</b>	0,94	5,1	<b>5,43</b>
Dijon	1212	GUEHE	52147	2768	13494	<b>45,85</b>	-0,34	1,45	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1213	JAUJE	7821	3484	441	<b>11,97</b>	0,18	0,7	<b>3,89</b>
Dijon	1219	JOUBE	5932	4791	17	<b>36,28</b>	-0,01	0,94	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1208	JUEPA	11424	6465	599	<b>99,23</b>	0,01	7,9	<b>790,00</b>
Dijon	1215	KOECL	7248	4666	981	<b>45,22</b>	-0,66	1,4	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1211	LECHE	19335	3371	1561	<b>41,12</b>	-0,04	1,51	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1209	LERFA	15710	7013	1194	<b>24,94</b>	0,2	0,7	<b>3,50</b>
Dijon	1205	MAREL	10642	4441	992	<b>93,33</b>	0,36	4,29	<b>11,92</b>
Dijon	1220	NAUJE	5267	4530	164	<b>19,54</b>	-0,14	0,7	<b>ininterprétable</b>
Dijon	1210	PIGCA	10758	4533	857	<b>10,48</b>	0,1	0,47	<b>4,70</b>
Dijon	1206	POUJU	69115	3475	7107	<b>4,14</b>	0,05	0,2	<b>4,00</b>
Dijon	1201	QUIHE	8122	4028	1037	<b>33,81</b>	0,33	1,49	<b>4,52</b>
Dijon	1217	SKRAN	27250	3771	4153	<b>94,01</b>	-0,28	6,23	<b>ininterprétable</b>
<b>Hôtel Dieu Paris</b>	<b>1916</b>	<b>ALLJA</b>	<b>9715</b>	<b>3599</b>	<b>424</b>	<b>59,74</b>	<b>0,28</b>	<b>1,71</b>	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1909	BERJE	3429	1330	1087	<b>14,36</b>	0,15	0,28	<b>1,87</b>
Hôtel Dieu Paris	1913	BOSJE	2502	459	1210	<b>90,2</b>	0,19	5,07	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1901	DOBTH	4012	683	949	<b>24,3</b>	0,3	0,84	<b>2,80</b>
Hôtel Dieu Paris	1917	DEPRE	6145	2957	582	<b>90,43</b>	0,58	8,08	<b>13,93</b>
Hôtel Dieu Paris	1906	HAFMH	9891	5723	284	<b>99,91</b>	0,76	8,07	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1907	HUCMI	4300	553	371	<b>95,12</b>	0,74	39,45	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1911	LOUFL	3715	981	329	<b>98,98</b>	2,43	24,8	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1915	OUFFA	9810	6747	879	<b>99,99</b>	0,43	20,72	<b>48,19</b>
Hôtel Dieu Paris	1905	PERDA	4847	1094	1000	<b>97,99</b>	0,22	13,47	<b>61,23</b>
Hôtel Dieu Paris	1918	PITAN	4463	729	415	<b>98,9</b>	0,21	13,46	<b>64,10</b>
Hôtel Dieu Paris	1914	QUIMA	3320	1354	164	<b>99,7</b>	1,73	7,77	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1912	RAYST	3781	1514	21	<b>99,67</b>	0,25	34,96	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1902	SZIKA	7027	1467	908	<b>93,05</b>	0,47	14,06	<b>29,91</b>
Hôtel Dieu Paris	1910	TCHPI	3114	487	701	<b>93,43</b>	0,18	19,99	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1904	TEOLO	4353	751	188	<b>98,14</b>	3,59	18,29	<b>ininterprétable</b>
Hôtel Dieu Paris	1903	TINTE	5206	2197	1944	<b>97,59</b>	0,42	147,21	<b>350,50</b>
Hôtel Dieu Paris	1908	VESJI	2692	666	265	<b>98,65</b>	0,31	15,63	<b>50,42</b>
<b>IGR</b>	<b>404</b>	<b>BIACH</b>	<b>10454</b>	<b>9793</b>	<b>281</b>	<b>98,81</b>	<b>0,46</b>	<b>13,66</b>	<b>29,70</b>
IGR	402	DACLE	6890	4488	288	<b>8,56</b>	0	0,8	<b>ininterprétable</b>

IGR	403	LECHE	75915	4008	62025	<b>68,46</b>	-0,35	4,17	<b>ininterprétable</b>
IGR	408	MAADA	11046	8724	490	<b>81,67</b>	-0,53	34,46	<b>ininterprétable</b>
IGR	407	MALPA	22529	4528	2889	<b>11,35</b>	1,43	1,37	<b>0,96</b>
IGR	406	TENYO	16071	6254	7737	<b>64,29</b>	1,81	12,68	<b>7,01</b>
<b>Lille, Dk, Rbx</b>	<b>1707</b>	<b>BLOPA</b>	<b>85766</b>	<b>18537</b>	<b>3569</b>	<b>99,14</b>	<b>-0,38</b>	<b>15,76</b>	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1702	DENGE	27089	8621	3559	<b>94,42</b>	0,85	12,14	<b>14,28</b>
Lille, Dk, Rbx	2401	DETJA	34321	10961	1857	<b>97,56</b>	-0,35	8,7	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1504	DUFFR	41676	7938	7646	<b>98,78</b>	-0,06	21,12	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1703	JOUMA	50177	16404	783	<b>82,86</b>	-0,21	3,74	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1704	JUIAR	36018	18226	3460	<b>99,29</b>	-0,35	23,07	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1706	KHOFA	50631	10206	29080	<b>6,03</b>	-0,16	0,6	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1502	MINEN	49795	44265	544	<b>98,4</b>	0,52	7,24	<b>13,92</b>
Lille, Dk, Rbx	1505	POUCH	48796	33910	1154	<b>94,06</b>	-0,15	8,87	<b>ininterprétable</b>
Lille, Dk, Rbx	1503	TRAFR	49408	30043	1695	<b>93,26</b>	0,1	8,06	<b>80,60</b>
<b>Limoges</b>	<b>509</b>	<b>BARSI</b>	<b>99561</b>	<b>16179</b>	<b>20920</b>	<b>29,06</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,66</b>	<b>ininterprétable</b>
Limoges	521	BARMO	22299	942	13142	<b>79,62</b>	0,11	2,9	<b>26,36</b>
Limoges	516	BRIMI	72205	24384	14019	<b>86,42</b>	0,21	4,38	<b>20,86</b>
Limoges	504	COLMA	74717	5431	30218	<b>91,88</b>	-0,32	10,56	<b>ininterprétable</b>
Limoges	520	CONMI	31472	14169	2754	<b>91,56</b>	0,28	5,46	<b>19,50</b>
Limoges	518	DAYNI	18678	8706	1629	<b>7,09</b>	-0,04	0,28	<b>ininterprétable</b>
Limoges	513	DEJPI	59818	8926	11730	<b>97,94</b>	0,09	13,21	<b>146,78</b>
Limoges	507	DEVGE	86867	31275	10527	<b>83,51</b>	-0,41	3,79	<b>ininterprétable</b>
Limoges	511	ELIGU	21568	17819	954	<b>87,63</b>	-0,36	4,6	<b>ininterprétable</b>
Limoges	503	FARPI	32791	24616	6088	<b>49,28</b>	-0,27	1,42	<b>ininterprétable</b>
Limoges	512	GATPE	49633	9358	14442	<b>83,56</b>	-0,24	3,8	<b>ininterprétable</b>
Limoges	519	GORMA	37670	4795	7080	<b>92,14</b>	0,17	5,33	<b>31,35</b>
Limoges	501	JUIJE	24585	8929	6922	<b>98,87</b>	-0,44	6,79	<b>ininterprétable</b>
Limoges	506	LAVYV	43930	29773	4714	<b>81,26</b>	-0,16	2,87	<b>ininterprétable</b>
Limoges	514	LAVGE	15868	11592	819	<b>99,93</b>	-0,17	18,76	<b>ininterprétable</b>
Limoges	502	LEBSI	32459	6751	6825	<b>87,68</b>	-0,21	3,98	<b>ininterprétable</b>
Limoges	517	NEZDA	94935	7983	12324	<b>88,84</b>	-0,14	4,27	<b>ininterprétable</b>
Limoges	505	PARRA	70459	9030	28362	<b>99,9</b>	0,08	10,55	<b>131,88</b>
Limoges	508	REGMA	37048	5665	3910	<b>90,49</b>	-0,19	4,6	<b>ininterprétable</b>
Limoges	510	TEICH	42835	33945	3134	<b>97,33</b>	0,03	1,35	<b>45,00</b>
Limoges	515	TIBER	94676	20066	18858	<b>98,59</b>	-0,25	16,42	<b>ininterprétable</b>
<b>Lyon</b>	<b>1015</b>	<b>BAHSO</b>	<b>147694</b>	<b>5673</b>	<b>87169</b>	<b>82,97</b>	<b>0,68</b>	<b>18,23</b>	<b>26,81</b>
Lyon	1008	BOUEL	489061	393174	5537	<b>79,11</b>	0,48	15,83	<b>32,98</b>
Lyon	1007	CONMA	99960	22956	2088	<b>2,57</b>	0,94	1,4	<b>1,49</b>
Lyon	1006	FELHE	99783	60625	4116	<b>0,96</b>	0,64	1,62	<b>2,53</b>
Lyon	1016	FERJO	84571	58274	3389	<b>93,93</b>	0,7	16,92	<b>24,17</b>
Lyon	1012	GIRDO	71395	6164	4873	<b>31,88</b>	1,01	5,08	<b>5,03</b>
Lyon	1003	GRIAL	29154	2037	892	<b>81,25</b>	1,1	15,04	<b>13,67</b>
Lyon	1010	LAMMA	335096	220160	9190	<b>98,72</b>	0,65	21,21	<b>32,63</b>
Lyon	1009	MALPA	152299	20056	2574	<b>42,67</b>	0,88	4,96	<b>5,64</b>
Lyon	1004	MERGE	84336	52584	1233	<b>88,54</b>	0,95	12,17	<b>12,81</b>

Lyon	1013	MORJA	74585	57452	738	95,1	0,45	12,79	28,42
Lyon	1002	POLRO	99887	66146	3783	29,01	0,41	2,6	6,34
Lyon	1011	POMDA	88317	64105	1507	86,42	0,64	10,8	16,88
Lyon	1005	SEGPB	100255	34360	8651	0,73	0,4	1,18	2,95
Lyon	1001	SERRO	94204	22380	4067	8,03	1,43	5,04	3,52
Lyon	1014	TOUAL	439552	361665	10328	77,08	0,41	12,8	31,22
<b>Meaux</b>	1601	GONMA	13912	4188	2265	99,55	0,06	16,65	277,50
<b>Necker</b>	2503	BAUMA	12276	3695	795	99,97	0,28	17,99	64,25
Necker	2505	BORJE	36646	7381	2964	96,11	0,18	9,49	52,72
Necker	2506	LAPMI	12238	1950	818	91,33	0,26	4,77	18,35
Necker	2502	LATPH	227654	158498	3883	99,42	0,4	9,65	24,13
Necker	2501	NADCL	6152	3319	520	99,88	0,2	4,13	20,65
Necker	2504	ROUFL	36865	22102	803	97,07	0,59	5,24	8,88
Necker	2507	TYAJE	9833	2048	4643	98,73	0,14	11,9	85,00
<b>Nice</b>	2209	AUSFR	32519	6367	4571	83,13	-0,02	12,52	ininterprétable
Nice	2210	BREHE	30135	5866	1504	98,69	0,19	33,69	177,32
Nice	2208	BURAL	38392	1095	11262	81,19	1,89	12,92	6,84
Nice	2207	CHATH	30933	20478	2705	99,5	0,55	26,97	49,04
Nice	2202	ELKFA	31589	26023	699	95,67	1,06	16,6	15,66
Nice	2201	GORSO	33325	8518	3215	0,69	1,31	0,17	0,13
Nice	2204	LENJA	26794	5773	849	84,2	-0,28	20,65	ininterprétable
Nice	2206	MARCO	29428	11544	2098	74,98	-0,04	6,13	ininterprétable
Nice	2205	PETMI	30685	5255	5992	98,19	1,42	37,63	26,50
<b>Paris St Louis</b>	332	ALIMI	12468	7703	833	0,82	2,4	1,53	0,64
Paris St Louis	320	ALVLY	99833	58062	740	98,87	0,5	16,24	32,48
Paris St Louis	330	BRIGE	29707	10187	1382	27,33	0,83	1,65	1,99
Paris St Louis	333	FOUJA	34151	7958	5191	5,55	1,07	0,97	0,91
Paris St Louis	312	FROJE	100205	52211	9912	78,23	0,14	2,73	19,50
Paris St Louis	327	GIGNA	95138	21986	14397	4,57	0,2	0,35	1,75
Paris St Louis	328	GOUMI	47155	2598	31527	82,14	0,96	9,08	9,46
Paris St Louis	324	HEMJA	14745	10968	736	93,05	1,6	11,06	6,91
Paris St Louis	321	JOUCH	75990	45904	5227	99,88	0,7	27,94	39,91
Paris St Louis	323	MEBDA	104146	75804	2824	99,72	0,03	41,81	1393,67
Paris St Louis	318	OLDLI	100154	53026	5639	49,09	0,45	5,29	11,76
Paris St Louis	308	PENSE	108864	77915	3790	35,14	0,45	3,81	8,47
Paris St Louis	301	RABMA	24099	6749	1063	97,93	-0,61	38,72	ininterprétable
Paris St Louis	314	THINA	49959	40817	2427	43,28	0,15	1,56	10,40
Paris St Louis	331	WUCCA	31803	8947	13768	99,04	1,25	20,05	16,04
Paris St Louis	329	ZOUFA	53310	7517	15627	57,9	1,16	6,8	5,86
<b>Percy</b>	803	AVIMA	9996	7115	1015	96,44	0,16	2,58	16,13
Percy	802	BOUPI	9987	2413	3325	98,63	0,18	10,24	56,89
Percy	812	CHEAL	7927	1946	556	98,1	0,89	10,56	11,87
Percy	810	DEQES	9341	6814	817	23,08	0,76	3,57	4,70
Percy	804	ERNDA	4888	4014	376	86,45	-0,07	0,62	ininterprétable
Percy	811	GOULA	8670	437	1513	96,34	0,74	29,55	ininterprétable

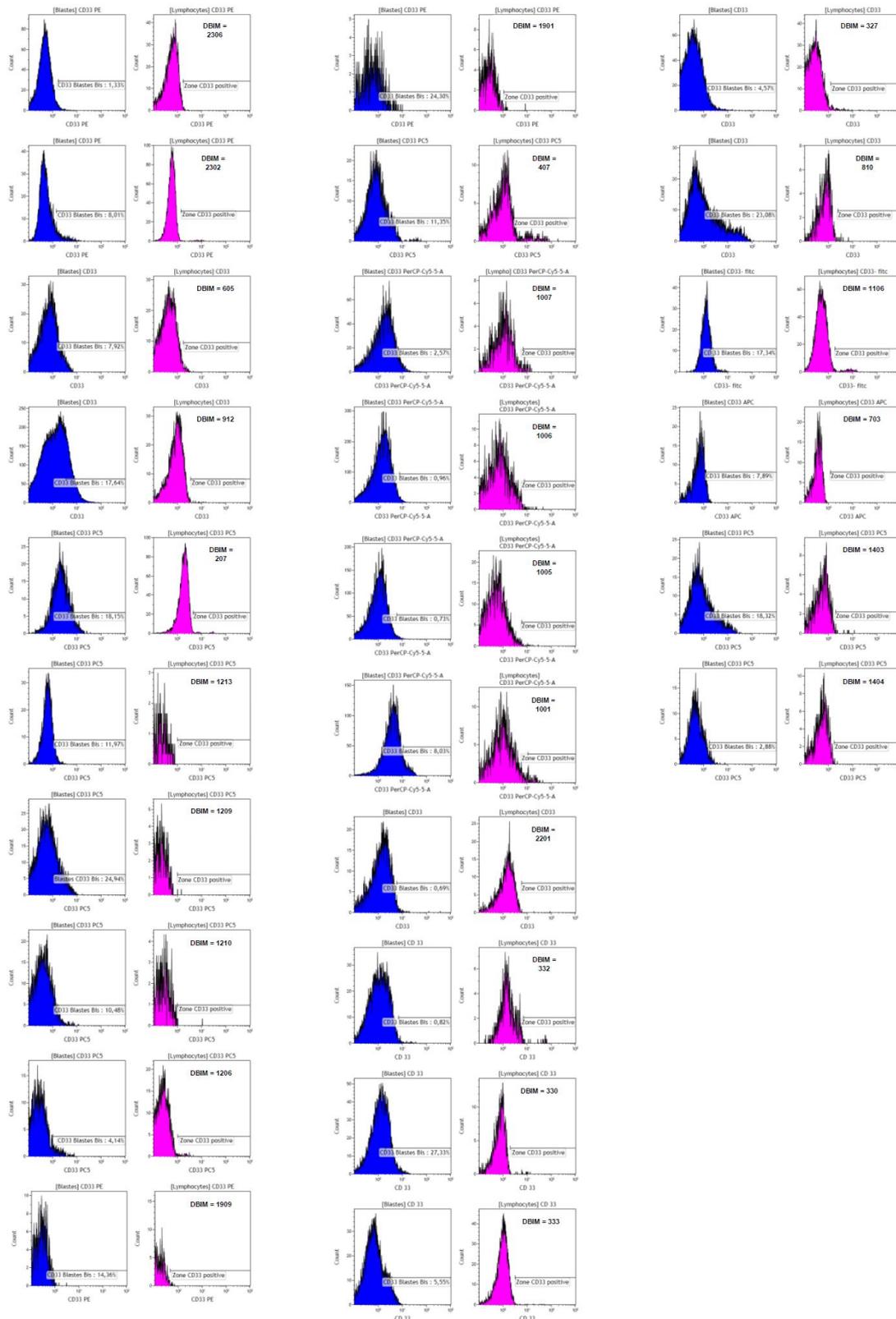
Percy	807	KANBE	18531	1341	1440	98,14	0,62	28,06	45,25806452
Percy	801	KERYV	19988	17351	1307	96,7	0,15	2,88	19,2
Percy	805	LERVI	9989	9004	387	99,93	0,05	3,99	ininterprétable
Percy	808	MASSY	3666	550	1393	82,18	1,37	7,56	5,518248175
Percy	809	PORMA	3193	168	1627	36,31	0,16	2,11	ininterprétable
<b>Pitié Salp.</b>	2102	JEAJA	60651	7627	30534	73,8	0,04	1,88	47
Pitié Salp.	2101	MOUMA	14369	7342	577	99,88	0,09	4,51	50,11111111
<b>Pontoise</b>	2701	BADSE	30288	3907	4659	88,46	-6,51	20,6	ininterprétable
Pontoise	2702	MILLE	90614	4198	8445	95,83	-0,32	13,89	ininterprétable
<b>Rouen</b>	1105	THIEL	51080	893	10564	59,35	0,36	3,39	9,416666667
Rouen	1106	MERPI	23389	3540	8631	17,34	0,71	1,41	1,985915493
Rouen	1107	CAVHE	32527	3821	2424	91,57	0,52	3,02	5,807692308
Rouen	1109	MAHMO	3093	129	1796	41,09	0,48	1,74	ininterprétable
Rouen	1110	DELDA	20544	10661	919	98,92	0,89	8,43	9,471910112
Rouen	1111	COBYV	25989	3488	10044	89,65	0,56	10,99	19,625
<b>Saint Cloud</b>	703	CHAAN	9035	2128	1718	7,89	0,37	0,68	1,837837838
Saint Cloud	702	THOMA	5215	4757	127	24,76	0,27	0,44	ininterprétable
<b>Valenc. &amp; Lens</b>	1801	DUMIR	26084	3266	2014	99,66	0,1	8,11	81,1
Valenc. & Lens	1804	MAILL	5823	4924	485	90,48	0,19	1,55	8,157894737
Valenc. & Lens	1805	OREVI	77024	4159	30637	65,62	0,29	1,89	6,517241379
Valenc. & Lens	1802	SOLJA	66095	4198	33127	92,5	0,1	15,68	156,8
Valenc. & Lens	1803	TERAN	5845	4300	572	99,81	0,1	28,76	287,6
Valenc. & Lens	1405	CARJE	8304	4490	1166	82,63	0,32	9,65	30,15625
Valenc. & Lens	1402	DHERE	23390	2962	8113	93,01	0,67	11,26	16,80597015
Valenc. & Lens	1403	MOCMI	14961	4661	1395	18,32	0,47	1,57	3,340425532
Valenc. & Lens	1404	VAIJE	14557	2220	1369	2,88	0,44	0,58	1,318181818
<b>Versailles</b>	122	HEMPI	5145	1303	554	99,08	0,35	55,89	159,6857143
Versailles	121	TAFPH	5060	4781	65	99,96	1,17	41,01	ininterprétable

**Annexe 8. Tableau récapitulatif des résultats ininterprétables (les cases colorées en jaune fluo sont les raisons pour lesquelles les résultats ont été exclus)**

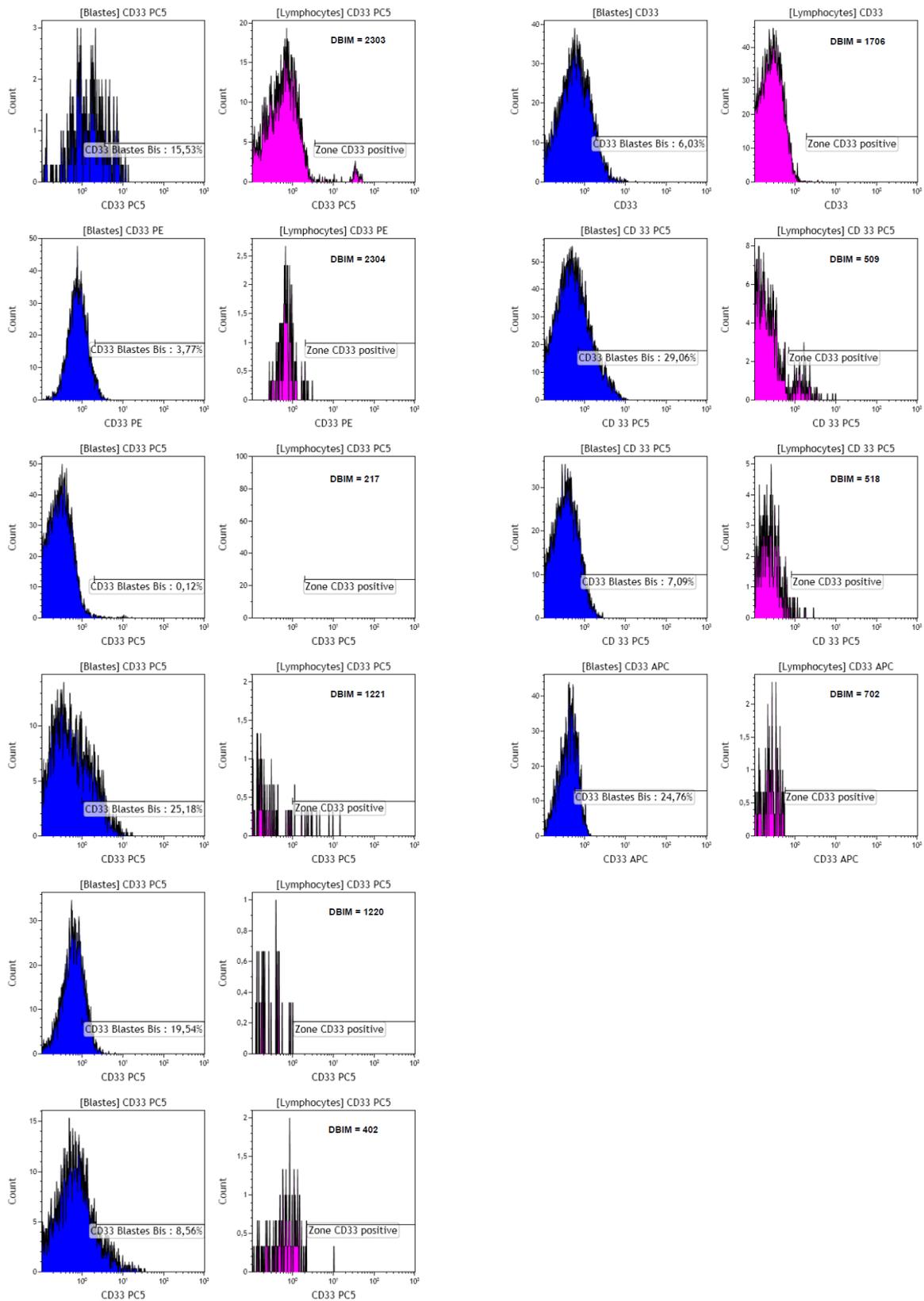
Centres	DBIM (numéro d'inclusion ALFA-0701)	Patients (initiales)	Nombre de cellules (population [A])	Nombre de blastes (population [Blastes])	Nombre de lymphocytes (population [Lympho])	Pourcentage de blastes (population [Blastes Bis])	Mean CD33 [Lympho]	Mean CD33 [Blastes]	Ratio mean CD33 [Blastes] / mean CD33 [Lympho]
<b>Amiens</b>	2303	BEACL	97343	515	10152	15,53	-0,06	1,72	ininterprétable
Amiens	2301	BONLU	24655	19981	312	96,28	1,02	6,8	ininterprétable
Amiens	2309	LANMI	12203	9481	1065	63,67	-0,29	0,97	ininterprétable
Amiens	2304	WOJGA	7485	5146	151	3,77	0,77	0,91	ininterprétable
<b>Avicenne</b>	606	RENDA	14212	8633	287	99,71	1,2	23,77	ininterprétable
<b>Créteil</b>	203	BERNI	97552	53242	8399	98,64	-0,52	12,03	ininterprétable
Créteil	214	CHEMO	149948	94787	6042	85,09	-0,19	7,54	ininterprétable
Créteil	215	COCHE	50332	22074	7162	99,18	-0,48	21,6	ininterprétable
Créteil	217	COREV	44663	37497	0	0,12	-0,1	-0,28	ininterprétable
Créteil	204	DEBAB	99360	55085	14846	87,32	-0,35	2,77	ininterprétable
Créteil	216	MEETA	149956	126818	5122	49,37	-0,47	1,71	ininterprétable
Créteil	201	MISLU	98587	3589	9229	50,57	-3,53	3,33	ininterprétable
Créteil	211	MORCA	47285	2533	21834	64,98	-0,16	4,7	ininterprétable
Créteil	205	VIACH	50745	8138	23422	40,37	-0,53	1,34	ininterprétable
<b>Dijon</b>	1216	BORCL	8531	5200	415	51,77	-0,13	1,22	ininterprétable
Dijon	1221	DECLU	17178	3788	3060	25,18	-0,57	0,84	ininterprétable
Dijon	1212	GUEHE	52147	2768	13494	45,85	-0,34	1,45	ininterprétable
Dijon	1219	JOUBE	5932	4791	17	36,28	-0,01	0,94	ininterprétable
Dijon	1215	KOECL	7248	4666	981	45,22	-0,66	1,4	ininterprétable
Dijon	1211	LECHE	19335	3371	1561	41,12	-0,04	1,51	ininterprétable
Dijon	1220	NAUJE	5267	4530	164	19,54	-0,14	0,7	ininterprétable
Dijon	1217	SKRAN	27250	3771	4153	94,01	-0,28	6,23	ininterprétable
<b>Hôtel Dieu Paris</b>	1916	ALLJA	9715	3599	424	59,74	0,28	1,71	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1913	BOSJE	2502	459	1210	90,2	0,19	5,07	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1906	HAFMH	9891	5723	284	99,91	0,76	8,07	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1907	HUCMI	4300	553	371	95,12	0,74	39,45	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1911	LOUFL	3715	981	329	98,98	2,43	24,8	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1914	QUIMA	3320	1354	164	99,7	1,73	7,77	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1912	RAYST	3781	1514	21	99,67	0,25	34,96	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1910	TCHPI	3114	487	701	93,43	0,18	19,99	ininterprétable
Hôtel Dieu Paris	1904	TEOLO	4353	751	188	98,14	3,59	18,29	ininterprétable
<b>IGR</b>	402	DACLE	6890	4488	288	8,56	0	0,8	ininterprétable
IGR	403	LECHE	75915	4008	62025	68,46	-0,35	4,17	ininterprétable
IGR	408	MAADA	11046	8724	490	81,67	-0,53	34,46	ininterprétable
<b>Lille, Dk, Rbx</b>	1707	BLOPA	85766	18537	3569	99,14	-0,38	15,76	ininterprétable
Lille, Dk, Rbx	2401	DETJA	34321	10961	1857	97,56	-0,35	8,7	ininterprétable

Lille, Dk, Rbx	1504	DUFFR	41676	7938	7646	98,78	-0,06	21,12	ininterprétable
Lille, Dk, Rbx	1703	JOUMA	50177	16404	783	82,86	-0,21	3,74	ininterprétable
Lille, Dk, Rbx	1704	JUIAR	36018	18226	3460	99,29	-0,35	23,07	ininterprétable
Lille, Dk, Rbx	1706	KHOFA	50631	10206	29080	6,03	-0,16	0,6	ininterprétable
Lille, Dk, Rbx	1505	POUCH	48796	33910	1154	94,06	-0,15	8,87	ininterprétable
<b>Limoges</b>	<b>509</b>	<b>BARSI</b>	<b>99561</b>	<b>16179</b>	<b>20920</b>	<b>29,06</b>	<b>-0,43</b>	<b>0,66</b>	<b>ininterprétable</b>
Limoges	504	COLMA	74717	5431	30218	91,88	-0,32	10,56	ininterprétable
Limoges	518	DAYNI	18678	8706	1629	7,09	-0,04	0,28	ininterprétable
Limoges	507	DEVGE	86867	31275	10527	83,51	-0,41	3,79	ininterprétable
Limoges	511	ELIGU	21568	17819	954	87,63	-0,36	4,6	ininterprétable
Limoges	503	FARPI	32791	24616	6088	49,28	-0,27	1,42	ininterprétable
Limoges	512	GATPE	49633	9358	14442	83,56	-0,24	3,8	ininterprétable
Limoges	501	JUIJE	24585	8929	6922	98,87	-0,44	6,79	ininterprétable
Limoges	506	LAVYV	43930	29773	4714	81,26	-0,16	2,87	ininterprétable
Limoges	514	LAVGE	15868	11592	819	99,93	-0,17	18,76	ininterprétable
Limoges	502	LEBSI	32459	6751	6825	87,68	-0,21	3,98	ininterprétable
Limoges	517	NEZDA	94935	7983	12324	88,84	-0,14	4,27	ininterprétable
Limoges	508	REGMA	37048	5665	3910	90,49	-0,19	4,6	ininterprétable
Limoges	515	TIBER	94676	20066	18858	98,59	-0,25	16,42	ininterprétable
<b>Nice</b>	<b>2209</b>	<b>AUSFR</b>	<b>32519</b>	<b>6367</b>	<b>4571</b>	<b>83,13</b>	<b>-0,02</b>	<b>12,52</b>	<b>ininterprétable</b>
Nice	2204	LENJA	26794	5773	849	84,2	-0,28	20,65	ininterprétable
Nice	2206	MARCO	29428	11544	2098	74,98	-0,04	6,13	ininterprétable
<b>Paris St Louis</b>	<b>301</b>	<b>RABMA</b>	<b>24099</b>	<b>6749</b>	<b>1063</b>	<b>97,93</b>	<b>-0,61</b>	<b>38,72</b>	<b>ininterprétable</b>
<b>Percy</b>	<b>804</b>	<b>ERNDA</b>	<b>4888</b>	<b>4014</b>	<b>376</b>	<b>86,45</b>	<b>-0,07</b>	<b>0,62</b>	<b>ininterprétable</b>
Percy	811	GOULA	8670	437	1513	96,34	0,74	29,55	ininterprétable
Percy	805	LERVI	9989	9004	387	99,93	0,05	3,99	ininterprétable
Percy	809	PORMA	3193	168	1627	36,31	0,16	2,11	ininterprétable
<b>Pontoise</b>	<b>2701</b>	<b>BADSE</b>	<b>30288</b>	<b>3907</b>	<b>4659</b>	<b>88,46</b>	<b>-6,51</b>	<b>20,6</b>	<b>ininterprétable</b>
Pontoise	2702	MILLE	90614	4198	8445	95,83	-0,32	13,89	ininterprétable
<b>Rouen</b>	<b>1109</b>	<b>MAHMO</b>	<b>3093</b>	<b>129</b>	<b>1796</b>	<b>41,09</b>	<b>0,48</b>	<b>1,74</b>	<b>ininterprétable</b>
<b>Saint Cloud</b>	<b>702</b>	<b>THOMA</b>	<b>5215</b>	<b>4757</b>	<b>127</b>	<b>24,76</b>	<b>0,27</b>	<b>0,44</b>	<b>ininterprétable</b>
<b>Versailles</b>	<b>121</b>	<b>TAFPH</b>	<b>5060</b>	<b>4781</b>	<b>65</b>	<b>99,96</b>	<b>1,17</b>	<b>41,01</b>	<b>ininterprétable</b>

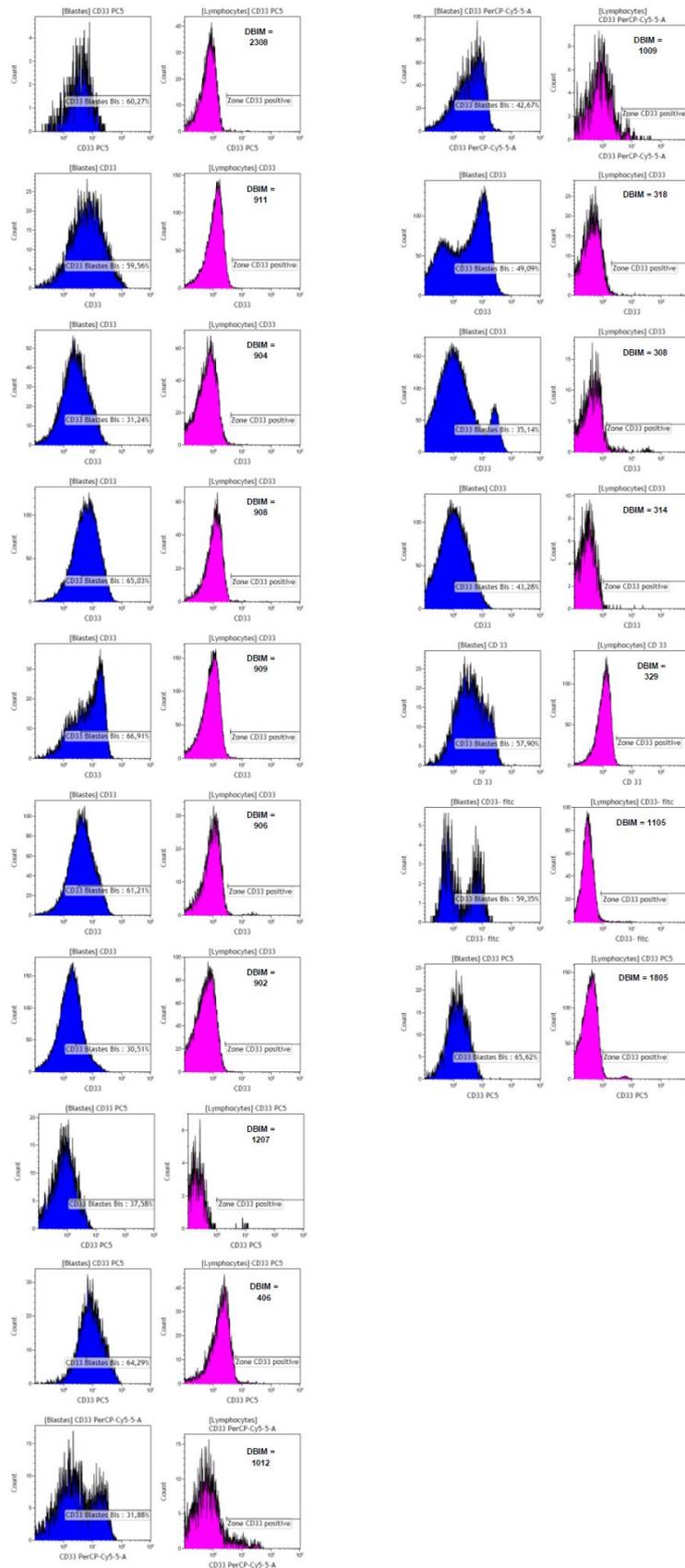
## Annexe 9. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 1) : patients ayant une expression blastique du CD33 < 30% et un ratio < 5 (bleu = blastes ; fuchsia = lymphocytes)



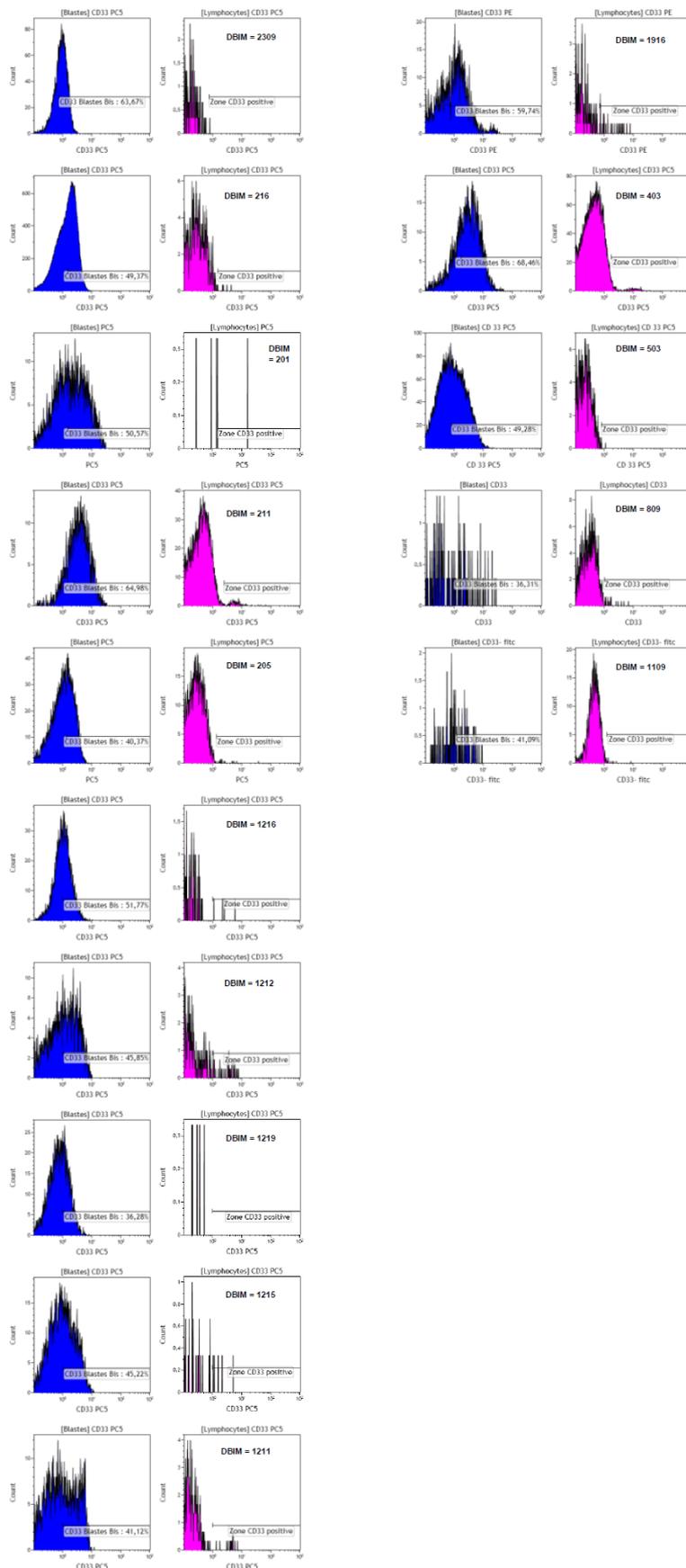
## Annexe 10. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 1) : patients ayant une expression blastique du CD33 < 30% et un ratio ininterprétable



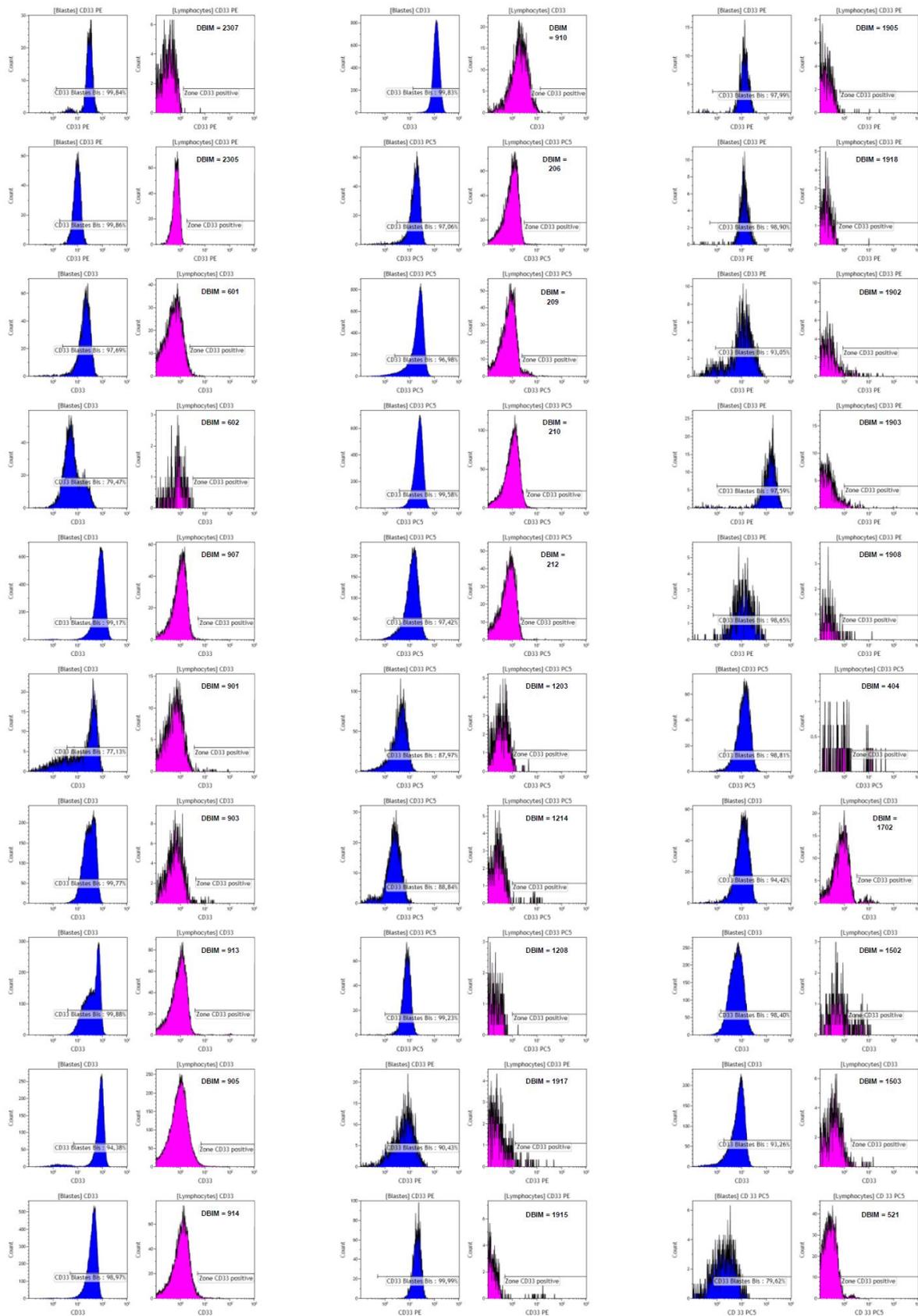
## Annexe 11. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 2) : patients ayant une expression blastique du CD33 entre 30% et 70% et un *ratio* entre 5 et 12

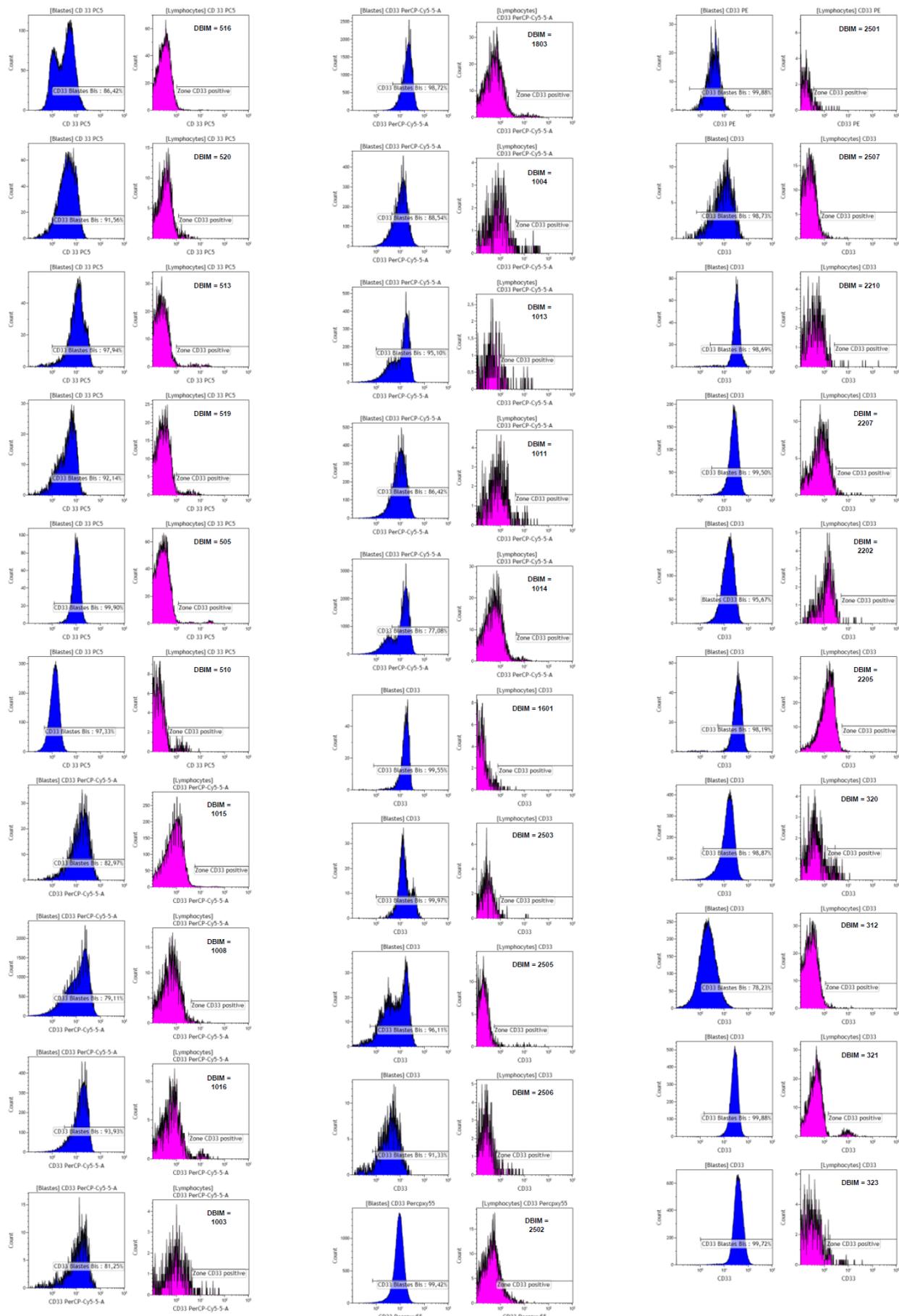


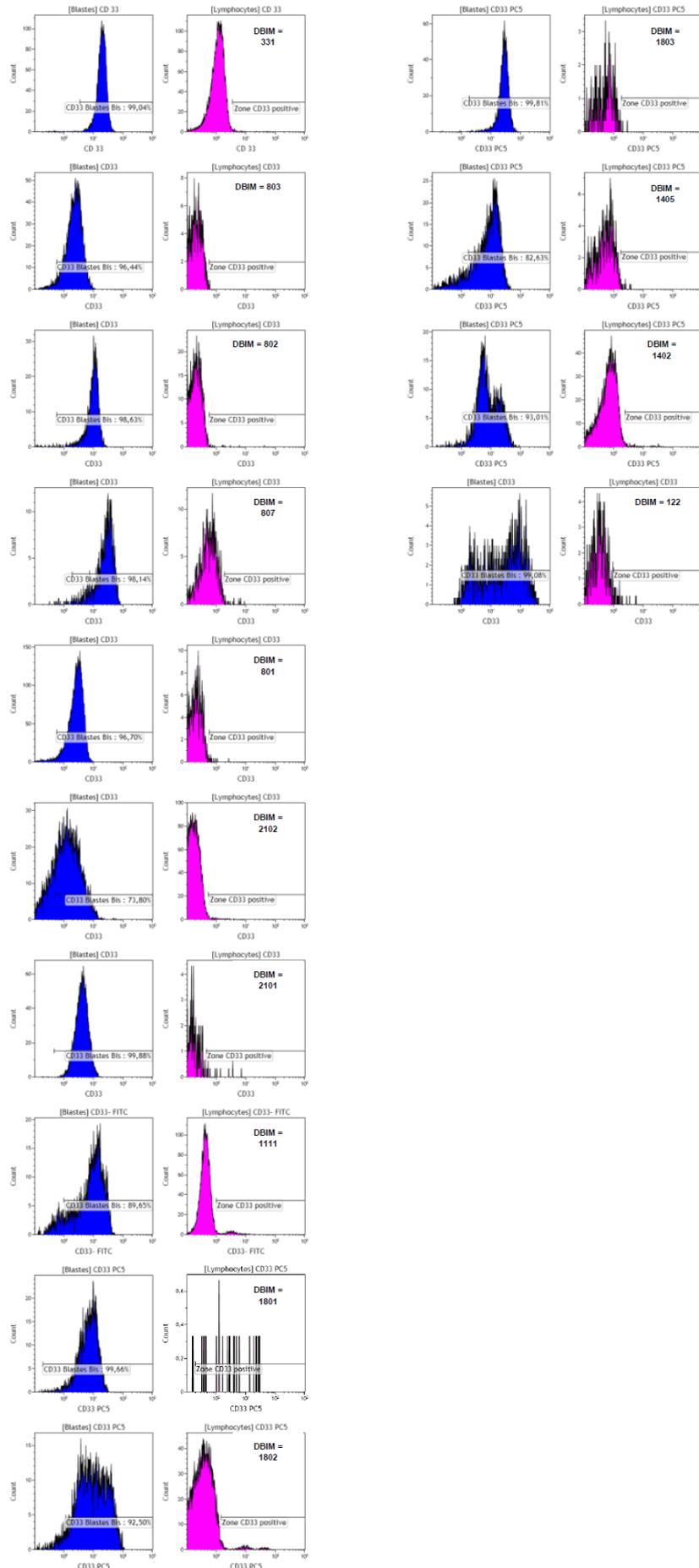
## Annexe 12. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 2) : patients ayant une expression blastique du CD33 entre 30% et 70% et un *ratio* ininterprétable



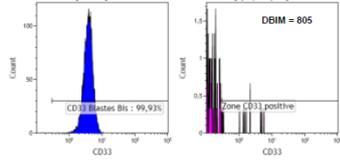
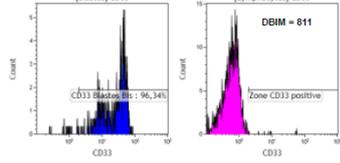
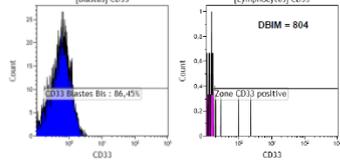
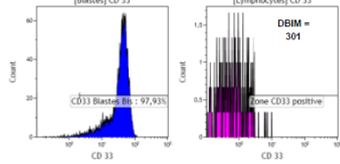
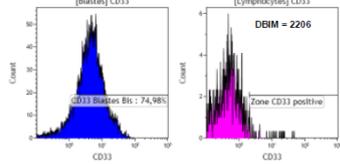
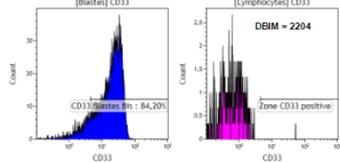
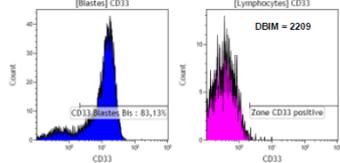
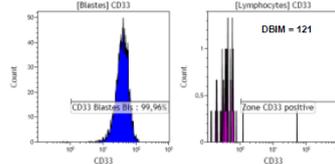
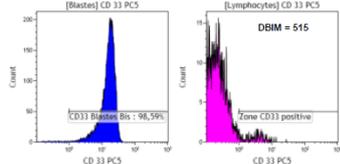
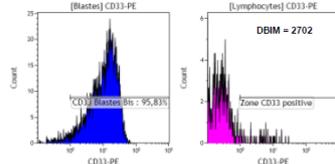
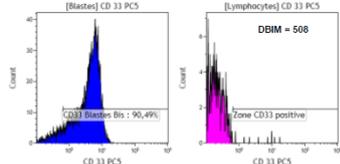
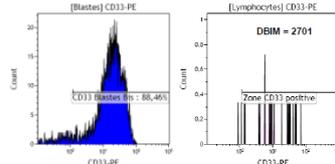
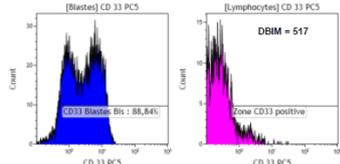
## Annexe 13. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 3) : patients ayant une expression blastique du CD33 > 70% et un ratio > 12



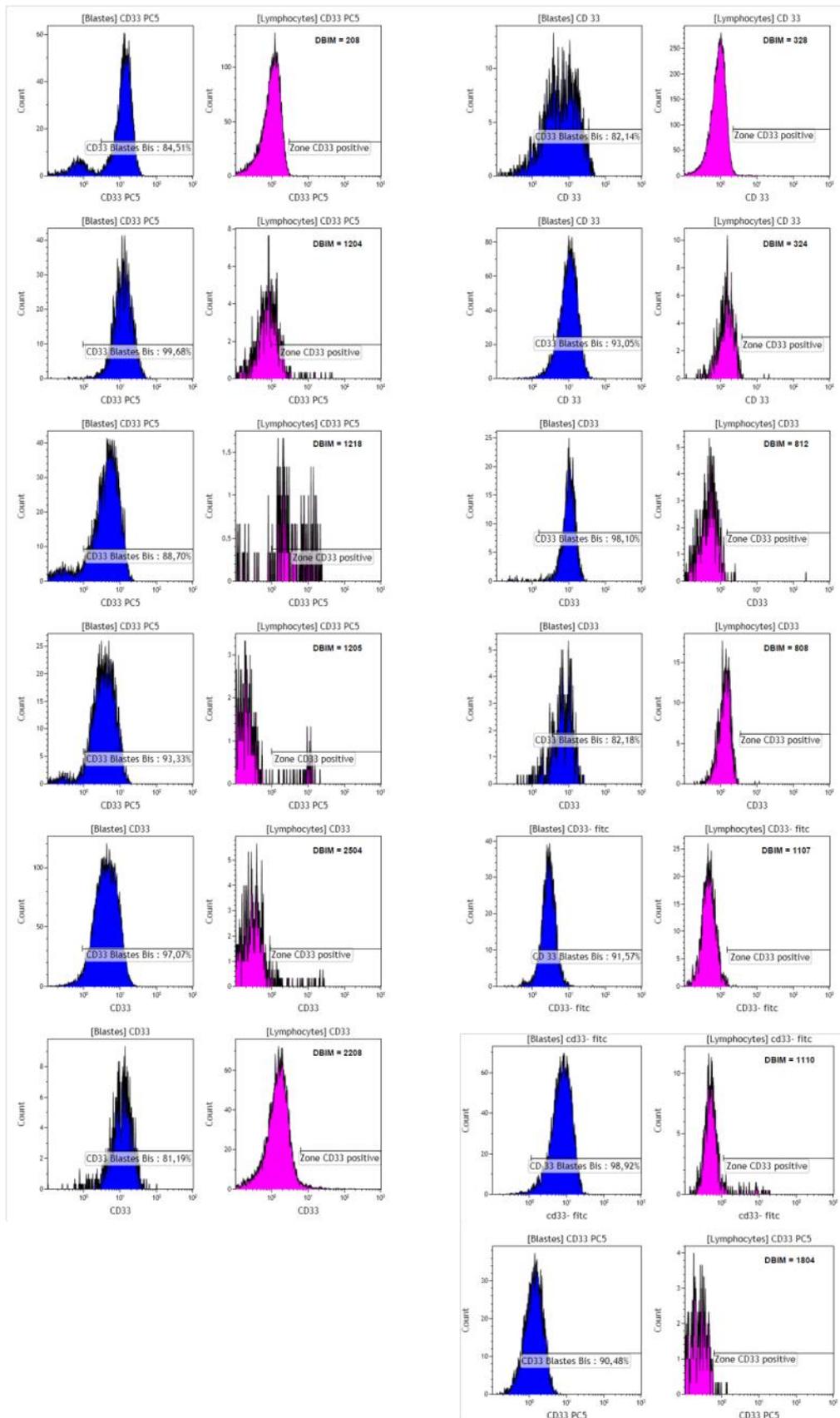




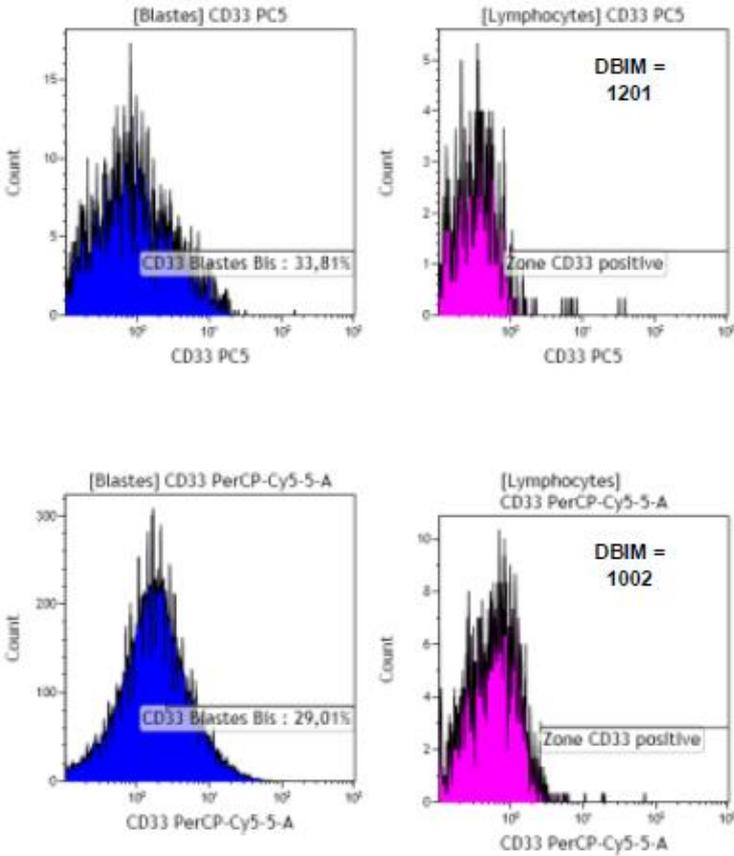




**Annexe 15. Histogrammes de CMF réanalysés (catégorie 4) : patients ayant une expression blastique du CD33 > 70% et un ratio entre 5 et 12**



**Annexe 16. Histogrammes de CMF réanalysés (catégories 5 et 6) : patients "hors seuil"**



## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : schéma des mécanismes de leucémogénèse myéloïde et des principales cibles thérapeutiques (1 = anticorps monoclonaux, 2 = inhibiteurs de tyrosine kinase ou de transduction du signal, 3 = agents différentiants, 4 = inducteurs de l'apoptose) (2) (8).....	22
<b>Figure 2</b> : probabilité de rechute, survie sans rechute (RFS) et survie globale (OS) chez les adultes jeunes (A, C et E ; âgés de 18 à 60 ans) et chez les adultes de plus de 60 ans (B, D et F) avec LAM en fonction des catégories de risque de l'ELN (11).....	24
<b>Figure 3</b> : leucémides (6).....	26
<b>Figure 4</b> : chlorome (The New England Journal of Medicine).....	26
<b>Figure 5</b> : composants majeurs d'un cytomètre en flux (45).....	39
<b>Figure 6</b> : focalisation hydrodynamique (48).....	40
<b>Figure 7</b> : focalisation du laser.....	41
<b>Figure 8</b> : focalisation des 3 lasers (50).....	42
<b>Figure 9</b> : diffusion de la lumière par la cellule (49).....	43
<b>Figure 10</b> : principes de base de la fluorescence (52).....	44
<b>Figure 11</b> : marquage direct.....	45
<b>Figure 12</b> : marquage indirect.....	45
<b>Figure 13</b> : principaux fluorochromes (bandes bleues : longueurs d'excitation et bandes rouges : longueurs d'émissions) (53).....	46
<b>Figure 14</b> : marquage direct multiple.....	47
<b>Figure 15</b> : principaux fluorochromes tandems.....	48
<b>Figure 16</b> : banc optique classique.....	49
<b>Figure 17</b> : banc optique récent (cytomètre NAVIOS®) (50).....	49
<b>Figure 18</b> : préparation cellulaire pour le réglage des PMT.....	51
<b>Figure 19</b> : exemple de conversion analogique-digitale.....	52
<b>Figure 20</b> : vue d'ensemble des fuites de fluorescence.....	52
<b>Figure 21</b> : fuite de fluorescence entre deux fluorochromes (FITC et PE).....	53
<b>Figure 22</b> : exemples de compensations (FL1 = FITC ; FL2 = PE).....	54
<b>Figure 23</b> : <b>A</b> : dot-plots (biparamétriques) et <b>B</b> : histogrammes (mono-paramétriques) (Kaluza®).....	56
<b>Figure 24</b> : réalisation d'une fenêtre puis conditionnement d'un nouveau dot-plot sur cette fenêtre avec Kaluza®.....	58
<b>Figure 25</b> : rétro-fenêtrage réalisé à partir du dot-plot CD19/CD45 : visualisation de la position et de la maturation des hémotogones en lymphocytes B.....	59
<b>Figure 26</b> : fenêtrage croisé permettant d'afficher sur un même graphique les lymphocytes CD19+, CD20+ et CD5- (Kaluza®).....	60
<b>Figure 27</b> : réalisation d'une "live gate" ([A]) sur dot-plot taille/structure (Kaluza®).....	61
<b>Figure 28</b> : stratégie de fenêtrage sur un dot-plot CD45/structure.....	62
<b>Figure 29</b> : analyse systématique en cinq couleurs (FITC, PE, ECD, PC5, PC7).....	65
<b>Figure 30</b> : schématisation de la molécule CD33 (57).....	66
<b>Figure 31</b> : marquage CD33 en cytométrie en flux sur moelle normale.....	67
<b>Figure 32</b> : schéma du gemtuzumab ozogamicin pour injection (MYLOTARG®) (60).....	69
<b>Figure 33</b> : action du GO et paramètres affectant son efficacité (62).....	70
<b>Figure 34</b> : équilibre du taux de GO entre le sang et la moelle en fonction du pourcentage des blastes (62).....	71

<b>Figure 35</b> : analyse de Kaplan-Meier de la survie sans événement (EFS) (A), de la survie globale (B) et de la survie sans rechute (C) (1) .....	78
<b>Figure 36</b> : histogramme SS/FS permettant l'isolement de la population [A] après exclusion des déchets.....	84
<b>Figure 37</b> : histogramme SS/CD45 permettant l'isolement des différentes populations au sein de la fenêtre [A] (populations [Blastes], [Lympho], [Mono], [Gr] (Lympho = lymphocytes, Mono = monocytes, Gr = granuleux) .....	85
<b>Figure 38</b> : histogramme ayant permis la mise en place du seuil de positivité en première décade ( $10^0$ ).....	86
<b>Figure 39</b> : means de fluorescence de la population [Lympho] et de la population [CD33 Blastes Bis] : exemple d'un patient avec blastes CD33 positifs .....	87
<b>Figure 40</b> : stratégie finale d'analyse des résultats .....	88
<b>Figure 41</b> : stratégie finale d'analyse des résultats pour calcul du <i>ratio</i> .....	89
<b>Figure 42</b> : fluorochromes des anticorps choisis pour comparaison (24).....	90
<b>Figure 43</b> : exemple de lymphocytes CD33 positifs avec un seuil de positivité placé en première décade ( $10^0$ : blastes CD33 négatifs à ce seuil) et un seuil établi en fonction des lymphocytes (visualisation de la zone CD33 positive avec blastes CD33 positifs en réalité).92	92
<b>Figure 44</b> : exemple d'un patient avec blastes CD33 négatifs après redéfinition du seuil sur les lymphocytes.....	92
<b>Figure 45</b> : courbe de concordance entre le <i>ratio</i> de mean et le pourcentage de blastes CD33+ .....	93
<b>Figure 46</b> : séparation de l'ensemble des 200 patients en fonction de l'expression du CD33 .....	95
<b>Figure 47</b> : survie sans événement en fonction du seuil d'expression du CD33 et du traitement par GO.....	96
<b>Figure 48</b> : survie sans rechute en fonction du seuil d'expression du CD33 et du traitement par GO .....	97
<b>Figure 49</b> : survie globale en fonction du seuil d'expression du CD33 et du traitement par GO .....	98
<b>Figure 50</b> : comparaison des différents anti-CD33 avec réglage des PMT à 600 Volts .....	102
<b>Figure 51</b> : mauvaise discrimination de l'anticorps CD33 APC-Alexa Fluor <sup>®</sup> 750 .....	103
<b>Figure 52</b> : protocole CD33 avec visualisation de la stratégie de fenêtrage choisie (exemple d'un patient avec LAM).....	106
<b>Figure 53</b> : histogrammes obtenus lors du passage des billes Rainbow <sup>®</sup> sur le protocole CD33 9 couleurs.....	108

## Table des tableaux

<b>Tableau 1</b> : classification FAB des LAM (8) .....	20
<b>Tableau 2</b> : classification OMS 2008 des leucémies aiguës myéloïdes (6) .....	21
<b>Tableau 3</b> : groupe pronostique des LAM selon l'ELN (6) (11) .....	24
<b>Tableau 4</b> : pourcentage de patients par catégorie de rémission et groupe pronostique (60) .....	73
<b>Tableau 5</b> : survies sans rechute et globale chez les patients en CR ou CRp (60) .....	74
<b>Tableau 6</b> : protocoles ALFA-0701 et LAM 2006 IR (68) (69) .....	76
<b>Tableau 7</b> : études randomisées de chimiothérapies avec ou sans GO (71).....	80
<b>Tableau 8</b> : nombre et pourcentage de fichiers reçus et analysés .....	91
<b>Tableau 9</b> : répartition des bras contrôle et GO en fonction du seuil d'expression du CD33 95	
<b>Tableau 10</b> : pronostic des patients en fonction du seuil d'expression du CD33 .....	96
<b>Tableau 11</b> : profil des patients en fonction du seuil d'expression du CD33 .....	100
<b>Tableau 12</b> : récapitulatif des résultats de comparaison des anti-CD33 (surlignés en jaune, les anticorps utilisables) .....	103
<b>Tableau 13</b> : panel d'anticorps en fonction des protocoles.....	104
<b>Tableau 14</b> : cibles d'intensité de fluorescence (MFI) à atteindre pour chaque fluorochrome .....	107

## Table des matières

Liste du corps enseignant .....	4
Remerciements.....	13
Droits d'auteurs.....	15
Liste des abréviations .....	16
Plan .....	17
Introduction.....	18
1. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM).....	19
1.1. Définition et critères diagnostiques.....	19
1.2. Epidémiologie.....	19
1.3. Classification des LAM.....	20
1.4. Physiopathologie des LAM : bases de la leucémogénèse .....	22
1.5. Facteurs pronostiques.....	23
1.6. Circonstances diagnostiques.....	25
1.6.1. Insuffisance médullaire .....	25
1.6.1.1. Lignée érythrocytaire : syndrome anémique .....	25
1.6.1.2. Lignée granuleuse : syndrome infectieux.....	25
1.6.1.3. Lignée plaquettaire : syndrome hémorragique .....	25
1.6.2. Syndrome tumoral .....	26
1.6.2.1. Syndrome tumoral évocateur d'une LAM .....	26
1.6.2.2. Syndrome tumoral présent à la fois dans les LAM et les LAL .....	27
1.6.3. Anomalies de l'hémogramme .....	27
1.6.3.1. Hyperleucocytose blastique .....	27
1.6.3.2. Cytopénies .....	27
1.6.3.3. Hémostase .....	27
1.7. Confirmation du diagnostic.....	28
1.7.1. Myélogramme.....	28
1.7.2. Analyse cytochimique.....	28
1.7.3. Immunophénotypage.....	28
1.7.4. Caryotype médullaire.....	29
1.7.5. Biologie moléculaire .....	30
1.8. Bilan et prise en charge des complications initiales.....	30
1.8.1. Syndrome de lyse tumorale .....	30
1.8.1.1. Diagnostic.....	30
1.8.1.2. Traitement .....	31
1.8.2. Coagulopathie de consommation .....	31
1.8.2.1. Diagnostic.....	31
1.8.2.2. Traitement .....	31
1.8.3. Leucostase.....	31
1.8.4. Neutropénie fébrile .....	32
1.9. Principes thérapeutiques des LAM.....	32
1.9.1. Traitement des adultes jeunes : 18 à 60 ans .....	32
1.9.1.1. Traitement d'induction .....	32
1.9.1.2. Traitement de post-rémission .....	32
1.9.2. Traitement des patients âgés : 60 ans et plus.....	33
1.9.2.1. Patients âgés de 60 à 74 ans .....	33
1.9.2.2. Patients âgés de 75 ans ou plus .....	33
1.9.3. Traitement des LAM en rechute .....	34
1.9.4. Thérapies ciblées moléculaires .....	34
1.9.4.1. Agents différentiants .....	34
1.9.4.2. Inducteurs d'apoptose.....	35
1.9.4.3. Les inhibiteurs de kinases.....	35
1.9.4.4. Les anticorps monoclonaux .....	36
2. Principes de cytométrie en flux .....	38
2.1. Fonctionnement d'un cytomètre en flux.....	38
2.1.1. Historique.....	38

2.1.2. Composition d'un cytomètre .....	39
2.1.3. Système fluide : la focalisation hydrodynamique.....	40
2.1.4. Système optique.....	41
2.1.4.1. Le faisceau lumineux excitateur.....	41
2.1.4.2. Les paramètres analysés.....	42
2.1.4.2.1. La diffusion de la lumière dans l'axe .....	43
2.1.4.2.2. La diffusion de la lumière aux grands angles .....	43
2.1.4.2.3. La fluorescence .....	43
2.1.4.2.4. La collecte des signaux lumineux.....	48
2.1.5. Du système optique au système électronique.....	50
2.1.5.1. Les photomultiplicateurs (PMT) .....	50
2.1.5.2. Réglage des PMT .....	50
2.1.6. Système électronique.....	51
2.1.6.1. Le convertisseur analogique-digital.....	51
2.1.6.2. La compensation du signal .....	52
2.2. Traitement des données.....	55
2.2.1. Représentation des données.....	55
2.2.2. Principes généraux de la stratégie d'analyse.....	57
2.2.2.1. Le concept de fenêtrage .....	57
2.2.2.2. Stratégie consensus .....	60
3. CD33, gemtuzumab ozogamicin (GO : MYLOTARG®) et premières avancées .....	66
3.1. Le CD33.....	66
3.2. Présentation du gemtuzumab ozogamicin (GO).....	69
3.2.1. Dénomination et description du médicament expérimental.....	69
3.2.2. Indication.....	69
3.2.3. Mécanisme d'action du GO .....	70
3.2.4. Mécanismes de résistance .....	71
3.2.5. Résultats d'études cliniques internationales : des débuts difficiles pour le GO .....	72
3.2.5.1. Etudes cliniques internationales (60) .....	72
3.2.5.2. Taux de réponse.....	73
3.2.5.3. Survie .....	73
3.2.5.4. Effets indésirables attendus.....	74
3.2.5.5. Traitement en première ligne des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) en association avec une chimiothérapie .....	75
3.3. Protocoles ALFA-0701 et LAM 2006-IR : le retour du GO (68) (69).....	76
3.4. Résultats de l'étude ALFA-0701 (1).....	77
3.5. Premiers résultats de l'étude LAM 2006-IR (70).....	79
3.6. Synthèse des études les plus récentes sur l'action du GO sur les LAM : un retour nuancé et affiné.....	80
3.7. Résultats d'autres études cliniques incluant le niveau d'expression du CD33 .....	82
4. Etude de l'impact du CD33 sur l'action du GO en vue de la mise en place d'un nouveau protocole de CMF .....	83
4.1. Objectifs de l'étude.....	83
4.2. Matériel et méthode .....	83
4.2.1. Constitution de l'échantillonnage .....	83
4.2.2. Panels d'anticorps et variations inter-centres .....	83
4.2.3. Traitement des données.....	84
4.2.4. Méthode de choix des anticorps anti-CD33 de CMF pour comparaison.....	90
4.3. Résultats.....	91
4.3.1. Récupération et analyse des données informatiques.....	91
4.3.2. Etablissement du seuil de positivité CD33 .....	92
4.3.3. Lien entre l'expression du CD33 et l'efficacité thérapeutique du GO en clinique.....	94
4.3.4. Résultats de la comparaison d'anticorps anti-CD33.....	101
4.4. Mise en place du nouveau protocole CD33 (marquage de surface) .....	104
4.4.1. Ancien et nouveaux protocoles .....	104
4.4.2. Stratégie de fenêtrage .....	105

4.5. Proposition d'une standardisation inter-centres .....	107
4.5.1. Utilisation des billes Rainbow® .....	107
4.5.2. Protocole de standardisation à usage des centres .....	109
4.6. Discussion.....	109
Conclusion .....	112
Références bibliographiques.....	113
Table des annexes.....	119
Table des illustrations .....	147
Table des tableaux.....	149
Table des matières .....	150
Serment d'Hippocrate .....	153

## Serment d'Hippocrate

En présence des maîtres de cette école, de mes condisciples, je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la médecine.

Je dispenserai mes soins sans distinction de race, de religion, d'idéologie ou de situation sociale.

Admis à l'intérieur des maisons, mes yeux ne verront pas ce qui s'y passe, ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs ni à favoriser les crimes.

Je serai reconnaissant envers mes maîtres, et solidaire moralement de mes confrères. Conscient de mes responsabilités envers les patients, je continuerai à perfectionner mon savoir.

Si je remplis ce serment sans l'enfreindre, qu'il me soit donné de jouir de l'estime des hommes et de mes condisciples, si je le viole et que je me parjure, puissé-je avoir un sort contraire.



**Guillaume OLOMBEL**

## **Impact de l'expression du CD33 sur la réponse au gemtuzumab ozogamicin dans les leucémies aiguës myéloïdes**

### **Nouveau protocole de cytométrie en flux pour une détermination standardisée de l'expression du CD33 dans les leucémies aiguës myéloïdes**

#### **Résumé :**

Cette thèse a étudié, à l'aide de la cytométrie en flux, l'expression du CD33 sur les blastes des leucémies aiguës myéloblastiques des patients inclus dans l'étude ALFA-0701. Dans ce travail, 200 fichiers de cytométrie en flux ont été analysés dont 132 ont fait l'objet d'une étude de concordance. Les blastes ont été considérés comme CD33 positifs pour un seuil biologique supérieur à 30% (c'est-à-dire quand 30% ou plus d'entre eux exprimaient le CD33) <sup>et/ou</sup> un *ratio* (rapport de la fluorescence du CD33 des blastes sur la fluorescence du CD33 des lymphocytes) supérieur à 5. Un seuil d'intérêt thérapeutique a également été défini et placé à 70% d'expression blastique du CD33. Au-delà de ce seuil thérapeutique, le gemtuzumab ozogamicin a démontré une amélioration significative de la survie (survie sans événement, survie sans rechute et survie globale). Enfin, un nouveau protocole de détermination de l'expression du CD33 en cytométrie en flux a été établi pour standardiser le rendu des résultats du CD33.

**Mots-clés :** gemtuzumab ozogamicin, leucémie aiguë myéloblastique, cytométrie en flux, CD33

## **Impact of the CD33 expression on response to gemtuzumab ozogamicin in acute myeloid leukemia**

### **New flow cytometry protocol for a standardized determination of CD33 expression in acute myeloid leukemia**

#### **Abstract :**

This thesis studied, using flow cytometry, the CD33 blastic expression on acute myeloblastic leukaemia of the patients included in the ALFA-0701 study. In this work, 200 files of flow cytometry were analyzed, of which 132 were the subject of a correlation study. Blasts has been considered CD33 positive for a biological threshold greater than 30% (i.e. when 30% of them expressed the CD33) <sup>and/or</sup> a *ratio* (*ratio* of the CD33 blasts fluorescence on the CD33 lymphocytes fluorescence) greater than 5. A therapeutic interest threshold has also been defined and placed at 70% of CD33 blastic expression. Above this therapeutic threshold, gemtuzumab ozogamicin has demonstrated a significant improvement in survival (event-free survival, relapse-free survival and overall survival). Finally, a new flow cytometry protocol for the determination of CD33 expression was established in order to standardize the rendering of the CD33 results.

**Keywords :** gemtuzumab ozogamicin, acute myeloid leukemia, flow cytometry, CD33