

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LUMINY

Le 05-10-2016

Par Monsieur **VENTON Geoffroy**

Né à La Seyne sur Mer le 25 Octobre 1986

APPROCHES THERAPEUTIQUES METABOLIQUES ET IMMUNOLOGIQUES DES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES

**Pour obtenir le grade universitaire de DOCTEUR de l'UNIVERSITE d'AIX
MARSEILLE**

Discipline : **Pathologies Humaines**

Spécialité : **Oncologie**

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Pierre MORANGE	PRESIDENT
Monsieur le Professeur Régis COSTELLO	DIRECTEUR DE THESE
Monsieur le Docteur Joseph CICOLINI	EXAMINATEUR AMU
Monsieur le Professeur Guillaume CARTON	RAPPORTEUR
Monsieur le Professeur Philippe MANIVET	RAPPORTEUR
Monsieur le Professeur Charles DUMONTET	EXAMINATEUR EXTRA-AMU

AIX-MARSEILLE UNIVERSITE

FACULTE DE MÉDECINE DE MARSEILLE

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE

T H È S E

Présentée et publiquement soutenue devant

LA FACULTÉ DES SCIENCES DE LUMINY

Le 05-10-2016

Par Monsieur **VENTON Geoffroy**

Né à La Seyne sur Mer le 25 Octobre 1986

ACUTE MYELOID LEUKEMIA: IMMUNOLOGIC AND METABOLIC APPROACHES

**Pour obtenir le grade universitaire de DOCTEUR de l'UNIVERSITE d'AIX
MARSEILLE**

Discipline : **Pathologies Humaines**

Spécialité : **Oncologie**

Membres du Jury :

Monsieur le Professeur Pierre MORANGE	PRESIDENT
Monsieur le Professeur Régis COSTELLO	DIRECTEUR DE THESE
Monsieur le Docteur Joseph CICOLINI	EXAMINATEUR AMU
Monsieur le Professeur Guillaume CARTON	RAPPORTEUR
Monsieur le Professeur Philippe MANIVET	RAPPORTEUR
Monsieur le Professeur Charles DUMONTET	EXAMINATEUR EXTRA-AMU

Remerciements

Remerciements

Au Jury,

Je tiens à remercier le Professeur Pierre MORANGE pour avoir accepté de présider ce jury de thèse et pour la grande disponibilité dont il a fait preuve ces dernières années, lors de mes précédentes sollicitations. En espérant que ces travaux et les précédents constituent la base d'une collaboration plus étroite entre cliniciens et biologistes. Je remercie également les Professeurs Guillaume CARTRON et Philippe MANIVET d'avoir accepté la conséquente charge de travail d'être les rapporteurs de ma thèse auprès de l'école doctorale. Je remercie également le Professeur Charles DUMONTET et le Docteur Joseph CICOLINI d'avoir accepté d'examiner mon travail de thèse et de participer à ce jury. Enfin, je tiens à remercier le Professeur Régis COSTELLO. Tout d'abord pour avoir dirigé mes travaux de thèse durant ces 30 derniers mois, mais je tiens à le remercier plus largement pour son encadrement, son soutien tant sur le plan hospitalo-universitaire que personnel et pour la confiance qu'il me témoigne.

A tous mes collaborateurs, durant ces longues années de médecine et de recherche,

En premier lieu je tiens à remercier Ismail, président de la société Advanced BioDesign, pour son soutien sans faille ces deux dernières années et pour m'avoir permis de collaborer sur un sujet aussi ambitieux et passionnant. Un grand merci aussi à Guillaume, pour sa disponibilité, sa patience, son écoute, ses conseils extrêmement précieux qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Enfin, je remercie plus largement toutes les personnes de chez Advanced BioDesign, notamment Milly et Gerry pour leurs conseils et leurs commentaires éclairés. J'espère que cette collaboration continuera encore longtemps et que ce projet ira très loin !

Je remercie également tous les membres du TAGC, étudiants, chercheurs, personnel administratif... Un énorme merci à Céline et Yasmine pour leur aide incalculable et immensément précieuse, que ce soit à la paillasse ou dans cette lutte terrible m'opposant quotidiennement à ces deux logiciels diaboliques que sont Word et Excel. Sans elles, je n'y serais pas arrivé. Je les remercie aussi pour leur disponibilité et leur gentillesse au quotidien. Et surtout bravo pour m'avoir supporté tout ce temps.

Je remercie également Magalie et la plateforme TGML pour leur aide concernant les analyses transcriptomiques et les validations en RT-qPCR. Enfin merci à Cathy, Pascal, Geneviève, Alexandre et Michel pour toutes ces discussions enrichissantes, ou juste amusantes.

J'en profite pour remercier l'équipe du Professeur Eric VIVIER au CIML avec qui j'ai fait mes premiers pas en recherche. Je remercie notamment Sophie et Emilie pour leur sympathie et leur soutien à l'heure de mes premières expérimentations murines et autres mémoires de Master II.

Je remercie aussi tout le personnel soignant et non soignant du service d'hématologie et de thérapie cellulaire de l'hôpital de la Conception. Merci au Professeur Gérard SEBAHOUN, à Laure (The Revenant), Cédric, Vadim, Julien, Anaïs, Carole, Sophie (x2), Christine, Thibault, Sarah, Fanny, Romain, Geoffrey, Isabelle, Corinne... et pardon si j'en oublie ! Travailler à vos côtés rend les journées moins longues.

Merci aux Dr SANDERSON et POUILLIN pour leur implication et leur approvisionnement sans faille en cellules souches hématopoïétiques !

Merci également à tout le personnel et les biologistes des laboratoires d'hématologie de la Conception et de la Timone pour leurs compétences et leur collaboration précieuse au quotidien. Un grand merci à Corinne Brunet pour les screening CD34+CD38- qui nous ont

permis de gagner un temps précieux et merci également à Isabelle Arnoux pour sa formation expresse à Kaluza et au gaiting ALDEFLUOR.

Je n'oublie pas toutes les personnes de l'Institut Paoli Calmettes avec qui j'ai eu le plaisir de collaborer et tout ce qu'elles m'ont apporté tant sur le plan professionnel qu'humain. Merci à Diane, Béa, Danielle, Caroline, Florence, Angela, Laurence et Sabine. Une pensée amicale pour Roberto et Jean qui sont loin et qui me manque. Enfin je tiens également à remercier le Professeur Didier BLAISE pour son enseignement et son encadrement pédagogique durant mes deux années passées à l'Institut.

Je tiens à remercier également mes co-internes. C'est agréable d'apprendre son métier auprès de camarades aussi sympathiques. Je ne sais pas comment ça se passe dans les autres spécialités, mais en hématologie à Marseille, l'ambiance est saine et sereine. Pourvu que ça dure. Merci donc à Aude, Anne, Anne-Charlotte, Sylvain, Ilhem, Colombe, Benjamin, Claire, Margaux, Marie, Ferdinand et Julien (remercié deux fois ! Il devient donc officiellement la personne la plus remercié de ces remerciements) !

En dernier lieu, je tiens à remercier plusieurs délégués de l'industrie pharmaceutique, avec qui j'ai tissé au fil des années des liens qui dépassent le cadre professionnel. Anne, Dalila, Jean-Rémy, Nathalie, Caroline, Noria, Jean-Christophe, Armelle, Philippe, Florence (x2), Sylvie, Véronique et Virginie, merci pour tout. C'est un plaisir de travailler avec vous.

A mes amis,

A Pierre... quelle histoire... Donc si je résume tout commence fin PCEM2 sur un désaccord politique majeur en pleine campagne électorale. Mais comme la plupart des Français on se rend vite compte que la politique c'est des conneries sauf pour ceux qui en font. De manière concomitante on découvre surtout que sur des sujets véritablement importants et graves

comme PES ou le cinéma, nos opinions concordent. Bien. Débute alors une amitié sincère qui dure depuis presque 11 ans (oui, oui, fais les comptes) ! Bien sûr le destin s'en mêle et sur une succession de twist improbables que ne renierait pas Night Shyamalan, moi, qui me destinais initialement à l'oncologie solide et toi à la biologie polyvalente (pour je te cite « en foutre le moins possible »), nous nous retrouvons désormais tous deux à arpenter le chemin sinueux de l'hématologie hospitalo-universitaire. N'importe quoi. Néanmoins, pour ma part, je trouve que le hasard fait bien les choses et je me considère comme privilégié de te compter parmi mes amis et les personnes en qui j'ai le plus confiance (sauf quand tu prétends perdre ton téléphone et/ou tes clés). Si tu as lu mes remerciements depuis le début, tu conviendras avec moi qu'il s'agit de remerciement de rang A. Ayant été cité en premier, tu récoltes donc 32 points SIGAPS.

A Jean Camille (alias JC Love) Toi aussi, tu t'es lancé dans cette improbable entreprise hospitalo-universitaire. Je ne doute pas vraiment de ta réussite puisque diplômé de la plus grande école d'agronomie Parisienne, et bientôt titulaire de deux doctorats, dont un en médecine, tu es sans nul doute le bonhomme le plus brillant de la fac (PU-PH inclus) voir de la région PACA (après pour être honnête, je ne connais pas vraiment tous les gens de la région PACA). Ce qui m'inquiète d'avantage, c'est que tu te lasses rapidement de l'orthopédie et de l'oncologie (d'ici trois ans tu en auras probablement fait le tour), que tu bazardes tout, et que tu te relances dans des études de polytechniques et d'ostéopathie de manière concomitante, pour ne pas t'ennuyer. Attention Jean Camille, l'horloge tourne et tu n'as toujours pas commencé ta carrière politique, ce qui réduit drastiquement mes chances d'être premier ministre un jour. J'espère que je ne me suis pas tapé l'intégral d'House of Cards, de Marseille et de Baron noir (quelle purge) pour rien ! Bon passons. Cher Jean-Camille saches toutefois que tu comptes parmi mes amis les plus précieux. Tu es quelqu'un de profondément juste et honnête. Malgré ton emploi du temps de ministre, tu trouves toujours le temps pour tes amis et tu sais être là pour eux quand ils en ont besoin. Enfin je

suis très heureux de débiter ce nouveau projet scientifique avec toi. Tout ceci s'annonce passionnant. Le sarcome n'a qu'à bien se tenir, ses jours sont comptés ! Je profite de ces remerciements pour saluer comme il se doit Sarah, ta chère et tendre.

A Nono. Je ne vais pas te mentir. Lorsque tu m'as annoncé avoir soutenu ta thèse avec succès, sanctionnée des félicitations du jury et du prix thèse, et ce, seulement 48 heures après la qualification de l'Islande contre l'Angleterre à l'euro, je me suis dit que la matrice avait été sévèrement piratée. Mais trêve de plaisanterie, que la distance Marseille – Cayenne / Fort-de-France est pesante. Pourquoi partir si loin ? Seul un pervers narcissique ferait cela. Je n'ai désormais plus personne pour m'accompagner lors de mes marathons cinématographiques de série B ou Z ? Malgré tout, notre amitié demeure intacte et grâce à Scorecast nous pouvons toujours débriefer l'actualité footballistique en direct. L'essentiel est sauf me diras-tu. J'espère toutefois, un peu égoïstement sans doute, que les années à venir réduiront la distance qui nous sépare.

Je tiens à remercier aussi tous mes amis de longue date (5ans et plus, recommandations HAS 2016). Merci donc à Anne Sophie, Alexis, Aurélie (x3), Benoit, Delphine, Florian, Morgane, Olivier P. (qui eut cru que tu figurerais dans cette partie !), Pascal, Pierre Arthur, Simon et Thomas.

A mes amis de moins longue date, qui intégreront prochainement le groupe précédent. Merci à Antoine, Clara, Elodie, Joe, Manal, Oliver L., Pierrot et Vincent.

A ma famille,

Un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont toujours soutenu au cours de ces longues études.

Merci à ma grand-mère présente et à mes grands-parents qui ne sont plus là. J'espère qu'ils sont heureux de voir que j'ai hérité de leur abnégation.

Merci à Marraine, Tonton, Guillaume, mon cousin et grand frère (il n'y pas de rationnel biologique à cette phrase, rassurez-vous) et Manu.

Merci à Tati B. Alisson, Cédric et Adeline.

Merci à Tonton et Belinda.

Merci à Jean-Paul (Alias Popaul), Joël, Corinne et JaJa, qui ont toute leur place dans cette rubrique.

Une pensée affectueuse pour le clan Montoya : Guy, Nadia, Régis, Caroline, Gaétan et Eloïse (The last one)

Pour conclure ces remerciements, je dédie cette thèse, la précédente, mon parcours, tous les efforts et sacrifices déjà consentis et ceux à venir à ma Mère, mon Père et Julie que j'aime. Leur indéfectible soutien et amour me portent au quotidien.

« Soyez vous-même ! *Tous* les autres sont déjà pris »

Oscar Wilde

SOMMAIRE

Liste des figures et tableaux	11
Abréviations	13
Résumé	15
Abstract	17
INTRODUCTION GENERALE	19
PARTIE 1, Approche Métabolique : Evaluation d'un inhibiteur des Aldéhydes Déshydrogénases comme traitement innovant dans les Leucémies Aigues Myéloïdes	25
I. Introduction et prérequis	27
1. Généralités sur les Leucémies Aigues Myéloïdes	
A) Physiopathologie et épidémiologie des LAM	
B) Classification des LAM	
C) Clinique et biologie des LAM : du diagnostic au pronostic	
2. Traitements des Leucémies Aigues	32
A) Traitement standard : chimiothérapies d'induction et de consolidation	
B) Greffe Allogénique de Cellules Souches Hématopoïétiques	
C) Le paradoxe thérapeutique des LAM	
3. Cellules Souches Leucémiques : Définitions et limite conceptuelle	38
A) Définitions et propriétés des Cellules Souches Leucémiques	
B) Limite du concept de Cellules Souches Leucémiques	

4.	Propriétés des Aldéhydes Déshydrogénases et du DIMATE	40
	A) Aldéhydes Déshydrogénases : propriétés et fonctions	
	B) Aldéhydes Déshydrogénases et Leucémies Aigues Myéloïdes	
	C) Le KIR : DIMATE	
II.	Principaux Résultats	44
	A) Le DIMATE est un puissant inhibiteur des ALDHs	
	B) Le DIMATE présente une cytotoxicité majeure sur plusieurs lignées de LAM humaines	
	C) Le DIMATE entraîne une apoptose irréversible, via la voie des caspases 3/7, des cellules leucémiques traitées. Cette apoptose peut être prévenue par un prétraitement au Glutathion Mono éthylique Ester.	
	D) Le DIMATE présente une cytotoxicité majeure sur des populations enrichies en cellules souches leucémiques, mais contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, le DIMATE présente une innocuité sur les cellules hématopoïétiques saines	
	E) Modèle Murin n°1 : Chez des souris NOG, xénotreffées avec des cellules leucémiques humaines enrichies en cellules souches leucémiques, le DIMATE éradique spécifiquement les cellules leucémiques humaines et épargne les cellules sanguines murines saines	
	F) Modèle Murin n°2 : Chez des souris SCID CB17, transplantées avec des cellules de lignées leucémiques HL-60, le DIMATE présente une activité anti tumorale similaire à l'association Daunorubicine /Cytarabine	
	G) Une analyse comparative transcriptomique du DIMATE permet d'explicitier plus finement les mécanismes d'action du DIMATE	
III.	Perspectives	65
IV.	Conclusions Partie 1	69
	Publication de référence de la partie 1	71

PARTIE 2, Approche Immunologique : Analyse Transcriptomique des Cellules Natural Killer chez les patients atteints de Leucémies Aigues Myéloïdes	81
I. Introduction : Cellules Natural Killer et Hémopathies Malignes	83
II. Analyse transcriptomique des cellules Natural Killer chez les patients atteints de Leucémies Aigues Myéloïdes	85
III. Conclusion Partie 2	87
Publication de référence de la Partie 2	89
PARTIE 3, Approche Pharmacogénomique Fondamentale de la diminution de la morbidité et de la mortalité liée aux traitements : Exemple de l'étude de la Cytidine Désaminase	103
I. Introduction : Leucémies Aigües Myéloïdes, Cytidine Deaminase et Cytarabine	105
II. Leucémies Aigües Myéloïdes, Cytidine Deaminase et Azacytidine	106
III. Conclusion Partie 3	108
Publication de référence de la Partie 3	109
CONCLUSION GENERALE	117
LISTE DES PUBLICATIONS GENERALES	120
PUBLICATIONS ANNEXES	125
REFERENCES	153

Liste des Figures et Tableaux

Figure 1 : Origines et métabolismes intracellulaire des différentes aldéhydes apoptogéniques

Figure 2 : Altérations génétiques des gènes gouvernant les ALDHs chez 166 patients atteints par une LAM

Figure 3 : Survie moyenne selon la présence ou l'absence d'altération génétique des gènes des ALDHs

Figure 4 : Identification en cytométrie en flux, d'une population de Myéloblastes CD34+CD38-

Figure 5 : Evaluation de l'activité ALDH en cytométrie de flux

Figure 6 : Suivi de l'activité ALDH dans les populations HL-60, CSH saines et CSL

Figure 7 : Profil de cytotoxicité du DIMATE sur différentes lignées de LAM

Figure 8 : Traitement par GSH et préservation des cellules HL-60 de l'effet apoptotique du DIMATE

Figure 9 : Profils de cytotoxicité du DIMATE, et des chimiothérapies conventionnelles sur les CSL

Figure 10 : Prolifération des CSH après traitement par le DIMATE et les chimiothérapies conventionnelles

Figure 11 : Pourcentage de survie des CSL et des CSH en fonction des concentrations de DIMATE.

Figure 12 : Schéma expérimental du modèle murin n°1

Figure 13 : Monitoring in vivo des cellules hCD45+ et mCD45 +en fonction des conditions de traitement

Figure 14 : Volume tumoral après 20 jours de traitement en fonction des conditions thérapeutiques

Figure 15 : Modification de l'expression génique des cellules leucémiques HL-60 en fonction du traitement

Figure 16 : Projet SEFALDIN

Figure 17 : Evaluation du potentiel clonogénique des CSH saines après traitement par DIMATE

Figure 18 : Corrélation entre l'activité ALDH et la sensibilité au DIMATE

Figure 19 : Activation de la Cellule NK

Tableau 1 : Classification FAB des LAM

Tableau 2 : Classification OMS des LAM

Tableau 3 : Caractéristiques des patients leucémiques inclus

Tableau 4 : Valeurs des IC₅₀ pour le DIMATE dans différentes lignées leucémiques

Tableau 5 : Valeurs des IC₅₀ pour le DIMATE et les chimiothérapies conventionnelles sur les CSL

ABBREVIATIONS

ADCC : Antibody Dependant Cytotoxicity = Cytotoxicité dépendante des anticorps

ALDH : Aldéhyde Déshydrogénase

ATRA : Acide Tout Transrétinoïque

CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité

CSH : Cellule Souche Hématopoïétique

CSL : Cellule Souche Leucémique

Ara-C: Cytarabine

DNR: Daunorubicine

DIMATE: Dimethyl Ampal Thiolester

FAB: French-American-British classification

G-CSF: Granulocyte – Colony Stimulating Factor

GVHD : Graft Versus Host Disease = Maladie du greffon contre l'hôte

GVL : Graft Versus Leukemia = Greffon contre leucémie

JAK2 : Janus Kinase 2

KIR : Killer immunoglobulin-like récepteur

LAL : Leucémie Aigue Lymphoblastique

LAM : Leucémie Aigüe Myéloblastique

NCRs: Natural Cytotoxicity Receptor

NK: Natural Killer

NKG2D : Natural-Killer Group 2 receptor

PBMC: Peripheral Blood Mononuclear Cells = Cellules Mononuclées Sanguine Périphériques

PCR : Polymerase Chain Reaction

PV: Polycythemia Vera

SMD: Syndrome Myélodysplasique

SMP : Syndrome Myéloprolifératif

WHO : World Health Organisation =Organisation Mondiale de la Santé

RESUME

Cette thèse s'inscrit dans une démarche moderne de recherche translationnelle, entre la médecine clinique et la recherche fondamentale en oncohématologie. A travers tous ces travaux nous avons cherché à proposer une approche fondamentale, transversale et innovante de la problématique du traitement des leucémies aiguës myéloïdes (LAM).

Bien que différentes approches soient présentées dans ce manuscrit, la majeure partie des travaux a été consacrée à l'évaluation du Dimethyl Ampal Thiolester (DIMATE), un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénases (ALDHs) de type 1 et 3, comme traitement innovant dans la LAM. L'intérêt croissant au cours de ces dernières années pour ces enzymes intra cytoplasmiques que sont les ALDHs, s'explique par leurs utilisations comme marqueurs pour distinguer les cellules souches, saines ou cancéreuses, au sein de différents tissus, comme le tissu hématopoïétique.

Avant d'être reconnu comme un marqueur des cellules souches, notamment leucémiques, les différents types d'ALDHs étaient connus pour contrôler le niveau intra cytoplasmique de trois aldéhydes apoptogéniques endogènes que sont le methional, le malondialdéhyde et le 4-hydroxynonanal. Les cellules cancéreuses se protègent de ces aldéhydes apoptogéniques grâce aux ALDHs qui oxydent ces derniers en acides carboxyliques non apoptogéniques.

Le traitement des LAM demeure une problématique clinique majeure. En effet, malgré un taux de rémission complète moyen d'environ 70% avec les traitements conventionnels, la survie moyenne des patients porteurs d'une LAM n'excède pas les 50% à 5 ans. A ce titre, le DIMATE, semble être un médicament d'avenir. Le DIMATE présente une toxicité majeure sur plusieurs lignées leucémiques humaines et sur des cellules souches leucémiques issues de patients. De manière remarquable, le DIMATE à ces doses anti-leucémiques présente une innocuité quasi-totale sur les cellules souches hématopoïétiques saines. In vivo, chez la souris, le DIMATE permet d'éradiquer spécifiquement les cellules leucémiques humaines xénogreffées et présente en monothérapie une efficacité similaire à l'association Cytarabine + Daunorubicine qui constitue le standard thérapeutique actuel.

Ces résultats encourageants vont servir de support conceptuel à la mise en place prochaine d'essais cliniques.

ABSTRACT

This thesis proposes an approach of modern translational research, between clinical medicine and fundamental research in hematology-oncology. Through these works, we have wished to propose a fundamental, transversal and innovative approach of the treatment of Acute Myeloid Leukemia (AML).

The main part of the works presented in this manuscript is based on the evaluation of Dimethyl Ampal Thiolester (DIMATE), a type 1 and 3 Aldehydes Dehydrogenases (ALDHs) inhibitor as an innovating treatment for AML. Interest in ALDH is due to its activity as a marker for identification of stem cell in different tissues. The different species of ALDHs control the levels of 3 endogenous apoptogenic aldehydes: methional, malondialdehyde and 4-hydroxynonenal. Cancer cells protect themselves from the apoptogenic effect of these aldehydes by the ALDHs that oxidize them to their non-apoptogenic carboxylic acids.

The vast majority of patients with AML achieve complete remission (CR) after standard induction chemotherapy. However, the majority subsequently relapses and dies of the disease. Therefore, AML remains a clinical challenge and new therapies are urgently needed. For this, DIMATE appears as a promising drug. In vitro, DIMATE is a powerful ALDH inhibitor and has a major cytotoxic activity on human AML cell lines. Moreover, DIMATE is highly active against leukemic population enriched in LSCs, but, unlike conventional chemotherapy, DIMATE is not toxic for healthy hematopoietic stem cells which retained after treatment their self-renewing and multi-lineage differentiation capacity. In immunodeficient mice, xenografted with human leukemic cells, DIMATE eradicates specifically human AML cells and spares healthy mouse hematologic cells. Moreover, DIMATE showed the same efficiency than the association Daunorubicin + Cytarabine, which is considered as the gold standard for AML induction. Results from our work open new therapeutic perspectives in AML and provide a conceptual support for initiation of a phase I-II clinical trials, but also innovating cellular therapy.

Introduction générale :
problématiques cliniques du
traitement des leucémies aiguës
myéloïdes

Introduction générale : problématiques cliniques du traitement des leucémies aiguës myéloïdes

L'oncohématologie est la discipline médicale clinique spécialisée dans le diagnostic et le traitement des hémopathies malignes. Les hémopathies malignes sont des affections cancéreuses, dont le point de départ se situe au niveau de la médullaire osseuse ou des ganglions lymphatiques. Dans la plupart des cas aucune étiologie précise n'est retrouvée. Néanmoins, l'exposition aux radiations ionisantes, aux dérivés benzéniques, certaines infections virales, ainsi que certaines anomalies génétiques constitutionnelles sont significativement associées à un risque accru de développer une hémopathie maligne. En 2001, puis en 2008 (Sabattini *et al*, 2010), l'organisation mondiale de la santé (OMS) proposait une classification des hémopathies malignes. Cette dernière a été affinée en 2016 (Cazzola, 2016). L'aspect morphologique des cellules hématologiques ou des précurseurs hématopoïétiques impliqués dans le processus néoplasique, constituait historiquement la base des classifications. Il s'efface désormais pour laisser place à des classifications diagnostiques plus complexes basées, outre sur la morphologie cellulaire, sur des aspects cliniques, immunophénotypiques, cytogénétiques et moléculaires. Ces classifications, plus globales, permettent aux cliniciens de caractériser plus finement les hémopathies et de mieux appréhender leurs pronostics, souvent lié à leurs statuts cytogénétiques / moléculaires.

Outre les problématiques du diagnostic et du pronostic, les hémopathies malignes posent un véritable problème quant à leurs approches thérapeutiques. Bien que de nouvelles molécules et de nouvelles stratégies thérapeutiques innovantes voient régulièrement le jour, beaucoup d'hémopathies malignes conservent un pronostic médiocre. C'est notamment le cas des

leucémies aigues myéloïdes (LAM). En effet, chez les patients traités pour une LAM, il existe une discordance majeure entre le taux de rémission complète, souvent satisfaisant, obtenu avec les traitements standards et le taux de guérison effectif. La rechute, souvent le fait d'une maladie tumorale résiduelle persistante (MRD), demeure fréquente. Cette MRD constitue donc un enjeu clinique majeur. La persistance de la MRD a plusieurs étiologies possibles : échappement d'un clone tumoral résiduel au système immunitaire, sélection de clones tumoraux résistants aux traitements conventionnels, persistantes de cellules souches tumorales, persistance d'un microenvironnement pathologique aboutissant à la génération permanente de cellules tumorales (niche tumorale). La détection et l'éradication de la MRD sont donc des enjeux majeurs afin d'optimiser le traitement des LAM.

Une autre problématique thérapeutique récurrente, inhérente aux traitements des LAM, est celle de la mortalité / morbidité liées aux traitements (TRM). En effet, la plupart des drogues et procédures utilisées en pratique clinique présentent des toxicités sur les différents organes (peau, nerfs périphériques, tube digestif, reins...). Il apparaît donc important d'adapter ces traitements en prenant en compte les spécificités de chaque patient afin d'optimiser la balance bénéfice risque à titre individuel.

A travers ce travail de thèse et nos différents travaux, nous souhaitons proposer une approche transversale, fondamentale et pré-clinique du traitement des LAM.

La première et principale partie de ce manuscrit, proposera une approche « métabolique » du traitement des LAM, en se consacrant à l'évaluation d'un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénases comme traitement innovant dans les LAM. Nous détaillerons notamment les perspectives prometteuses qu'offre ce type de molécule, notamment celle de potentiellement réhabiliter la greffe autologue de cellules souches hématopoïétiques dans le traitement des LAM.

La deuxième partie de ce travail, proposera une approche « immunologique » et sera consacrée à l'étude des cellules Natural Killer (NK) et à leurs altérations chez les patients atteints d'une LAM. Nous verrons comment les cellules NK en présence de blastes leucémiques voient leur cytotoxicité diminuée. A travers une étude phénotypique et transcriptomique, nous démontrerons comment l'expansion *in vitro* des cellules NK de patients leucémiques permet de restaurer les propriétés cytotoxiques de ces dernières.

La troisième et dernière partie de ce manuscrit, plus courte, proposera une approche « pharmacogénétique » à travers un exemple de recherche transversale, celui des Cytidine Désaminase. Nous verrons comment une approche de recherche fondamentale peut rapidement aboutir à une application clinique visant à diminuer la TRM.

Partie 1, Approche Métabolique :
Evaluation d'un inhibiteur des
Aldéhydes Déshydrogénases comme
traitement innovant dans les Leucémies
Aigues Myéloïdes

Partie 1, Approche Métabolique : Evaluation d'un inhibiteur des Aldéhydes Déshydrogénases comme traitement innovant dans les Leucémies Aigues Myéloïdes

I-Introduction et prérequis

1. Généralités sur les Leucémies Aigues Myéloïdes

Les leucémies aiguës sont des affections cancéreuses graves du tissu hématopoïétique, caractérisées par l'arrêt de différenciation et la prolifération incontrôlée dans la moelle et le sang de précurseurs hématopoïétiques. La prolifération de ces cellules immatures va entraver l'hématopoïèse physiologique et potentiellement envahir plusieurs organes, notamment hématopoïétiques. Il existe deux principaux types de leucémies aiguës selon la nature du précurseur atteint : la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et la leucémie myéloïde aiguë (LAM). La LAL est la plus fréquente chez l'enfant avec un pic d'incidence entre 2-5 ans. La LAM est la leucémie aiguë la plus répandue chez les adultes (Jemal *et al*, 2010). Les LAM peuvent être primitives (*de novo*) ou secondaires à des hémopathies myéloïdes chroniques comme les Syndrome Myélodysplasiques (SMD) ou les Syndromes Myéloprolifératifs (SMP).

A) Physiopathologie et épidémiologie des LAM

Dans les LAM un précurseur hématopoïétique myéloïde (myéloblaste) présente un blocage de maturation et une prolifération incontrôlée qui aboutit à une invasion de la moelle osseuse, du sang et des organes, hématopoïétiques ou non. Sans traitement, la LAM est rapidement et spontanément fatale. Le pronostic de la LAM repose sur plusieurs facteurs: l'âge, le statut cytogénétique ou moléculaire de la maladie et la réponse aux différents traitements.

L'incidence de LAM est estimée entre 5 et 8 cas pour 100 000 individus. Rarement diagnostiquée avant l'âge de 40 ans, l'âge médian au moment du diagnostic est d'environ 65 ans. L'incidence augmente avec l'âge et les hommes sont plus touchés que les femmes (sex-ratio = 1,5) (Deschler & Lübbert, 2006).

Plusieurs facteurs de risque de LAM ont été identifiés : le tabagisme, l'exposition à des produits chimiques tels que le benzène (solvant utilisé notamment dans l'industrie pétrochimique et présent dans la fumée de cigarette), certains détergents, peintures et décapants. Certaines drogues de chimiothérapies (comme les alkylants) utilisées pour traiter d'autres cancers, sont pourvoyeuses de LAM secondaires. Il en est de même concernant l'exposition à de trop fortes doses de rayonnements ionisants dans le cadre thérapeutique ou non. Des hémopathies myéloïdes chroniques comme les SMP ou les SMD sont également à haut risque de transformation en LAM secondaires (Deschler & Lübbert, 2006). Enfin, certaines anomalies génétiques constitutionnelles comme la trisomie 21, par exemple, exposent à un risque relatif de LAM 20 fois supérieure à celui de la population générale (Pedersen-Bjergaard *et al*, 2008).

B) Classification des LAM

Initialement, huit différents sous-types de LAM, de M0 à M7 ont été décrits à travers le système français-américano-britannique (FAB) créé en 2001 et qui reposait uniquement sur la morphologie et le degré de différenciation des blastes (**Tableau 1**) (Bennett *et al*, 1976a) (Bennett *et al*, 1985). En 2008, une classification plus complète, est proposée par l’OMS. Cette dernière intègre la présence ou non d’anomalies génétiques et/ou moléculaires récurrentes qui modifient drastiquement le pronostic, favorablement ou péjorativement (**Tableau 2**) (Vardiman, 2010). Cette nouvelle classification, qui incorpore des éléments pronostics, propose une approche cliniquement plus pertinente. Par ailleurs, le pourcentage de blastes médullaires nécessaires pour poser le diagnostic de LAM a été ramené à 20% contre 30% initialement.

Classification franco-américano-britannique (FAB)	
M0	LAM avec Myéloblastes indifférenciés
M1	LAM avec Myéloblastes sans maturation
M2	LAM avec Myéloblastes avec maturation
M3	LAM Promyélocytaire
M4	LAM Myélomonocytaire
M5	LAM Monoblastique
M6	Erythroleucémie
M7	LAM Mégacaryoblastique

Tableau 1: Classification FAB des LAM (Bennett *et al*, 1976)

Classification de l'organisation mondiale de la santé (OMS 2008)

LAM avec anomalies génétiques récurrentes

- LAM avec t(8;21)(q22;q22); RUNX1-RUNX1T1
- LAM avec inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22), CBFβ/MYH11
- LAM promyélocytaire with t(15;17)(q22;q12); PML/RARA
- LAM avec t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
- LAM avec t(6;9)(p23;q34); DEK-NUP214
- LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2), RPN1-EVI1
- LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13); RBM15-MKL1
- LAM avec t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL
- LAM avec mutation NPM1
- LAM avec mutation CEBPA

Tableau 2: Classification OMS des LAM (Vardiman, 2010)

C) Clinique et biologie des LAM : du diagnostic au pronostic

Il n'existe pas de signe clinique spécifique de la LAM. Le diagnostic est suspecté devant une ou plusieurs cytopénies cliniquement symptomatiques ou non (altération de l'état général (AEG), syndrome anémique (dyspnée, pâleur..), hémorragies cutanéomuqueuses et/ou ecchymoses secondaires compliquant thrombopénie, agranulocytoses fébriles...). Ces cytopénies sont le fait de l'envahissement médullaire par les myéloblastes qui entravent l'hématopoïèse physiologique. On parle de syndrome d'insuffisance médullaire.

Les myéloblastes peuvent envahir le sang, les ganglions lymphatiques (adénopathies), la rate (splénomégalie), le foie (hépatomégalie). Dans certains cas, les myéloblastes peuvent envahir

les méninges (envahissement liquide céphalo-rachidien (LCR) et système nerveux central (SNC)), les nerfs périphériques, les gonades ou la peau (leucémides). Enfin lorsque le taux de myéloblastes circulants dépasse 100G/L, il existe un risque de leucostase et de ralentissement du flux capillaire cérébrale et pulmonaire.

Le diagnostic de LAM est posé par la ponction/aspiration de moelle (myélogramme). Un pourcentage de blaste médullaire supérieur à 20% est nécessaire pour affirmer le diagnostic. Un immunophénotypage, une analyse cytogénétique et en biologie moléculaire sont également réalisés sur les myéloblastes médullaires. Une ponction lombaire peut être discutée si le patient présente des facteurs de risque ou des signes cliniques en faveur d'un envahissement du SNC. Un typage des antigènes leucocytaires humains (typage HLA) est nécessaire avant toute chimiothérapie dans l'éventualité où une greffe allogénique de CSH serait nécessaire.

Le pronostic des LAM (favorable, intermédiaire 1 et 2, défavorable) repose sur le statut cytogénétique et moléculaire de ces dernières. Le pronostic repose essentiellement sur le caryotype des myéloblastes médullaires qui est le facteur prédictif majeur d'un risque de rechute important et de mauvaise réponse au traitement. Certaines anomalies chromosomiques ou cytogénétiques peuvent être en effet de bon ou de mauvais pronostic (Chen *et al*, 2010) (Orozco & Appelbaum, 2012) (Grimwade *et al*, 2010). Par exemple, une translocation entre les chromosomes 15 et 17, ou translocation t (15; 17) permettant le diagnostic d'une leucémie promyélocytaire aiguë (LAM3) est associée à un pronostic favorable. Inversement les LAM présentant des délétions des chromosomes 5 ou 7, ou avec un caryotype complexe sont de mauvais pronostic. Les LAM avec un caryotype normal présentent un pronostic intermédiaire sauf anomalies moléculaires sous-jacentes.

En effet, plusieurs anomalies moléculaires ont également un impact significatif sur le pronostic des LAM. Le gène FLT3 est le plus fréquemment muté dans les LAM et semble être

activé dans un tiers des cas de LAM. Des duplications en tandem (ITD) dans son domaine juxta-membranaire de FLT3 sont observées dans 25% des cas de LAM. D'autres types de mutations peuvent intéresser la boucle d'activation de FLT3. Les patients porteurs d'une mutation FLT3 -ITD présentent généralement un mauvais pronostic. Par exemple, un patient avec une cytogénétique normale (risque intermédiaire théoriquement) aura un pronostic défavorable s'il présente une mutation FLT3-ITD (Thiede *et al*, 2002). Une autre mutation notable, généralement associée à un pronostic favorable est la mutation NPM1. Les patients présentant isolément cette mutation ont une réponse accrue à la chimiothérapie et une meilleure survie. Cependant, si cette dernière est associée à une mutation de FLT3, cet avantage pronostic de NPM1 est gommé (Brunet *et al*, 2012) (Gale *et al*, 2008). A l'image de NPM1, des mutations du gène CEBPA sont détectées chez 15% des patients à cytogénétique normale et sont associées à une durée de rémission et une survie globale (OS) plus longue (Fröhling *et al*, 2004).

2. Traitements des Leucémies Aigues

Le traitement des LAM, chez les sujets jeunes repose classiquement sur la chimiothérapie intensive. Une greffe allogénique de CSH doit être envisagée lorsque le patient est en situation de rechute. La greffe doit également être envisagée en première ligne si le patient est réfractaire au traitement d'induction et/ou si ce dernier présente une cytogénétique défavorable. Chez les personnes âgées le traitement est plus compliqué du fait de l'impossibilité d'utiliser de hautes doses de chimiothérapie ou de proposer une greffe. Bien que le pourcentage de RC soit satisfaisant après le traitement standard (induction +

consolidation), une grande partie des patients rechute et la mortalité à cinq ans reste importante surtout en cas de cytogénétique défavorable.

A) Traitement standard : chimiothérapies d'induction et de consolidation

Le traitement d'induction, constitue le traitement d'attaque des LAM et repose sur de la chimiothérapie haute dose. Son but est d'obtenir une rémission complète, de réduire drastiquement le nombre de cellules leucémiques et permettre la reprise d'une hématopoïèse efficace. Les personnes âgées (>65 ans) ou sévèrement co-morbides ne peuvent bénéficier de ce type d'approche thérapeutique. Des inductions avec des doses moins importantes de chimiothérapie peuvent être néanmoins proposées.

Tous les sous-types de LAM bénéficient d'une induction similaire associant de la cytarabine (Ara-C) à une anthracycline. Chez les patients de moins de 65 ans la combinaison classique « 3 + 7 » associe de la daunorubicine (DNR) (45 mg / m² à 90 mg / m² par voie intraveineuse pendant 3 jours) et de l'ara-C à dose standard (100 mg à 200mg / m² /jour en perfusion continue sur 7 jours). Le traitement d'induction permet d'obtenir des taux de rémission complète de l'ordre de 75% chez les patients âgés de 18 à 65 ans et 65% chez les patients de plus de 65 ans.

Un sous type particulier de LAM, la LAM3 promyélocytaire, constitue une exception thérapeutique. Cette dernière est presque universellement traitée avec de l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA) en plus d'une chimiothérapie d'induction, classiquement une anthracycline. L'ATRA (45 mg/m²/jour répartis en deux doses) favorise la différenciation des promyélocytes leucémiques en cellules matures et a montré un bénéfice franc en terme de survie sans progression (PFS) et de survie globale (OS) par rapport au groupe traité uniquement avec de la chimiothérapie. Aujourd'hui on se dirige pour ces patients vers des traitements sans chimiothérapie, associant de l'ATRA et de l'Arsenic (Burnett *et al*, 2015).

L'induction est considérée comme un succès si la rémission complète est obtenue. Un traitement par chimiothérapie haute dose dit de « consolidation » est alors proposé. Ce traitement a pour but de maintenir une RC prolongée et de diminuer le risque de rechute. Cette chimiothérapie post rémission est constituée d'ara-C à haute dose (HIDAC). Les hautes doses d'ara-C sont de l'ordre de 1000 à 3000 mg / m² IV pendant 1 à 3 heures toutes les 12 heures. Six à douze perfusions peuvent être administrées selon les protocoles. Chez les patients âgés de moins de 65 ans, la consolidation par HIDAC a démontré un bénéfice sur la survie globale, en particulier chez les patients avec un pronostic favorable. Sur l'ensemble des patients de moins de 65 ans la consolidation par HIDAC permet d'obtenir une PFS à 4 ans de 44%, mais au prix d'une TRM de l'ordre de 5%. En revanche, chez les patients de plus de 65ans la consolidation par HIDAC n'apporte pas de bénéfice significatif sur l'OS ou la PFS (Jemal *et al*, 2010) (Jemal *et al*, 2004) (Cheson *et al*, 2003) (Döhner *et al*, 2010).

Enfin, la stratégie thérapeutique à adopter chez les sujets âgés et/ou fragiles atteints de LAM reste encore très débattue. Les personnes âgées ne peuvent souvent pas tolérer la toxicité majeure d'une chimiothérapie d'induction. Dans cette population la TRM d'une induction standard se situe entre 15 et 30%. D'autres traitements moins intensifs peuvent être proposés : des agents oraux comme de l'hydroxyurée, de l'ara-Cc à faible dose» (20 mg / m² injection sous-cutanée deux fois par jour pendant 10 jours), des agents hypométhylants (azacitidine ou decitabine). Néanmoins les effets attendus sont modestes et il s'agit plus là d'une approche palliative.

B) Greffe Allogénique de Cellules Souches Hématopoïétiques

La greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques (CSH) à partir d'un donneur intrafamilial HLA identique (greffe dite géno-identique) constitue actuellement la meilleure

stratégie thérapeutique anti-leucémique, notamment chez les patients avec un pronostic défavorable, permettant de diminuer drastiquement le risque de rechute lorsque la greffe est réalisée de manière précoce. Classiquement, le pouvoir thérapeutique de la greffe allogénique repose sur deux mécanismes d'action complémentaires. Le conditionnement, à travers de fortes doses de chimiothérapies et/ou de radiothérapie, permet une réduction importante des cellules tumorales résiduelles permettant un contrôle de la maladie en attendant le déclenchement du contrôle anti-tumoral immunologique assuré par les effecteurs immuns allogéniques apportés par le greffon, qui assureront le contrôle de la MRD à long terme. On parle alors d'effet « Graft-versus-leukemia » (GVL). Un effet adverse de la greffe allogénique de CSH est l'effet « Graft-versus-host » (GVH). La GVH chronique ou aigue correspond à une réaction alloimmune dirigée contre les cellules et les tissus sains de l'hôte, pouvant entraîner des lésions d'organes extrêmement graves et conduire au décès du patient. A noter cependant que le risque de rechute leucémique est corrélé au degré de réactivité immunologique entre le donneur et le receveur. Le risque de rechute est plus faible en présence de GVH chronique. A l'inverse, le risque de rechute augmente en l'absence de GVH aigue, de greffes déplétées en lymphocytes T ou de greffes syngéniques (Tauro *et al*, 2005) (Sullivan *et al*, 1981) (Maraninchi *et al*, 1987) (Blaise *et al*, 1995) (Gale *et al*, 1994).

Il existait historiquement deux principales limites au développement de la greffe allogénique de CSH. La disponibilité d'un donneur intrafamilial HLA identique représentait une première limitation importante à la greffe. En France, les fratries étant de petites tailles, ce n'est le cas que dans un tiers des cas. Cependant, une meilleure maîtrise des techniques de greffes et des régimes de conditionnement permet depuis plusieurs années de greffer les patients à partir de donneurs extra-familiaux inscrits sur des fichiers de volontaires, mais aussi à partir de sang de cordon et à partir de donneurs intrafamiliaux partiellement compatibles (Spitzer *et al*, 2000) (Sullivan *et al*, 1981) (Ciurea *et al*, 2015). La TRM liée à la greffe allogénique représentait la

seconde limitation importante de cette technique. En effet, en situation standard (conditionnement myéloablatif), chez un patient de moins de 50 ans la mortalité liée à la procédure se situe entre 15 et 20%. Cette mortalité augmentait de façon croissante en fonction de l'âge du patient, du nombre de ses comorbidités, du niveau de persistance de la MRD. Enfin, les conditionnements myéloablatifs sont pourvoyeurs de GVH. Cependant, depuis plus de dix ans, le développement de conditionnements à intensité réduite (RIC) a permis de diminuer drastiquement la TRM et l'incidence de la GVH, sans impact sur la PFS et la survie globale (Gyurkocza *et al*, 2010) (Khouri *et al*, 1998) .

C) Le paradoxe thérapeutique des Leucémies Aigues Myéloïdes

Bien que les chimiothérapies conventionnelles permettent l'obtention d'un taux important de rémission (entre 65 et 75% selon les tranches d'âges), les patients finissent, pour une grande partie d'entre eux, par rechuter et décéder de leur pathologie, avec une survie à 5 ans qui n'excède guère les 50% (Cheson *et al*, 2003). Plusieurs hypothèses ont été émises afin d'expliquer ce paradoxe. La principale est celle de la persistance d'une maladie résiduelle (MRD) à l'origine de la rechute. Cette MRD pourrait avoir différentes origines. Il peut classiquement s'agir de la persistance d'un clone leucémique, issue d'une sélection darwinienne stochastique. Ce clone, chimio-résistant par définition, conduirait à la rechute et à l'émergence d'une maladie plus chimio-réfractaire. Cela pourrait expliquer le faible taux de réponse aux traitements des patients en rechutes.

L'échappement d'un clone tumoral résiduel au système immunitaire pourrait expliquer les rechutes plus tardives. Après le traitement d'induction et de consolidation, la réduction drastique de la masse tumorale pourrait permettre au système immunitaire de contrôler la MRD devenue quasiment indétectable. Cependant, un clone finirait par échapper à ce contrôle

immun (Lavigne & Acres, 1989) (Jiang *et al*, 1997). Cette approche de la MRD et du contrôle immunitaire, est un argument en faveur du rationnel de la greffe allogénique de CSH dans les LAM. En effet, les CSH du donneur vont s'expandre chez le receveur et aboutir à un système immunitaire adoptif qui va exercer une pression allo immune sur la MRD, ce dont le système immunitaire d'origine du receveur n'était plus capable (cf. paragraphe B)(Asai *et al*, 1998) .

Par ailleurs, à l'image des tumeurs solides, un concept de « cellule souche leucémique (CSL) » a également été avancé (cf. ci-dessous). Les cellules tumorales d'une LAM pourraient s'organiser selon une hiérarchie proche de celle du tissu hématopoïétique sain (Bonnet & Dick, 1997a). Les myéloblastes dits « standard », d'une part peu résistants à la chimiothérapie et d'autre part avec des capacités de prolifération et de division importantes, mais limitées dans le temps. Par opposition, on distingue les CSL, de divisions lentes, résistantes aux chimiothérapies traditionnelles(Costello *et al*, 2000), avec des capacités d'auto-renouveaulement et une clonogénicité quasiment illimitée. Ces CSL, même en très petite quantité, constitueraient une MRD capable de reconstituer *ad integrum* la maladie et ainsi conduire à la rechute (Bonnet & Dick, 1997a).

Enfin, plus récemment, des travaux sur le microenvironnement médullaire ont abouti au concept de « niche hématopoïétique pathologique ». Des dérégulations dans les voies de signalisation du microenvironnement médullaire, des anomalies impactant les interactions CSH/niche ou un microenvironnement pro-inflammatoire pourraient aboutir à la génération spontanée de CSL et donc une maladie se régénérant en permanence, et donc expliquer en partie les rechutes (Raaijmakers *et al*, 2010) (Kode *et al*, 2014) (Wang *et al*, 2014).

Bien évidemment, la rechute des patients porteurs d'une LAM est une problématique biologique (et clinique) complexe, et un seul paradigme ne peut prétendre l'appréhender dans son entièreté. La rechute est probablement le fait d'une interaction complexe entre tous les

points cités précédemment. Par exemple, la CSL, en plus d'être chimio-résistante, présente une immunogénicité très faible et échappe ainsi au système immunitaire (Costello *et al*, 2000).

3. Cellules Souches Leucémiques : Définitions et limite conceptuelle

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la définition des CSL. Pour des raisons explicitées plus loin, nous avons choisi de retenir la définition CD34+CD38-ALDH+ comme définition des CSL.

A) Définitions et propriétés des Cellules Souches Leucémiques

En 1997, Bonnet et Dick, décrivent pour la première fois une sous population leucémique CD34+CD38- avec un fort pouvoir clonogène. Contrairement aux cellules CD34+CD38+, les cellules leucémiques humaines CD34+CD38- transplantées dans des souris immunodéprimées permettent une excellente prise de greffe tumorale et un développement de la leucémie chez les souris transplantées. Les auteurs parlent pour la première fois de CSL et émettent l'hypothèse selon laquelle les LAM s'organiseraient selon une hiérarchie calquée sur le tissu hématopoïétique sain, avec d'une part des CSL présentant un pouvoir clonogène extrêmement important et d'autre part des cellules blastiques standards avec des propriétés d'auto-renouveaulement beaucoup plus limitées (Bonnet & Dick, 1997). Par la suite, les propriétés de ces CSL ont été largement étudiées. Les CSL sont résistantes aux chimiothérapies conventionnelles et présentent une faible immunogénicité, ce qui leur permet d'échapper au système immunitaire (Costello *et al*, 2000). Par ailleurs, de manière intéressante, les LAM de type 0, spontanément de mauvais pronostic indépendamment de leurs statuts cytogénétiques,

sont très riches en CSL (Costello *et al*, 1999a). Bien que la définition CD34+CD38- des CSL proposée par Bonnet et Dick date de presque 20 ans, cette dernière est toujours d'actualité. En effet, depuis plusieurs années, de nombreux travaux ont cherché à définir plus finement les CSL, sans jamais aboutir à une définition absolue et/ou consensuelle. Plusieurs définitions et/ou marqueurs ont été proposés : dépendance à un gène suppresseur de tumeur (Pten), expression d'une oncoprotéine (MLL/GAS7), expression d'un miRNA particulier (miR-126), signature transcriptomique spécifique, ou profil cytométrique multiparamétrique complexe (Yilmaz *et al*, 2006) (So *et al*, 2003) (Lechman *et al*, 2016) (Gal *et al*, 2006)...

Parmi toutes ces définitions, celle proposée par Gerber et al. en 2012 a particulièrement attiré notre attention. Les auteurs ont identifiés une sous population leucémique CD34+CD38- avec une importante activité Aldéhyde Déshydrogénase (ALDH) en cytométrie en flux extrêmement enrichie en CSL (Gerber *et al*, 2012). Au sein de cette population CD34+CD38- ALDH+ déjà très enrichie en CSL, les auteurs ont distingué une population ALDH^{int} encore plus riche en CSL.

B) Limite du concept de Cellules Souches Leucémiques

Bien que de nombreuses expérimentations *in vivo* et *in vitro*, accréditent le concept de CSL, il est difficile de corroborer cliniquement cette théorie (il est quasiment impossible de prouver chez l'homme que la rechute soit entièrement supportée par les CSL). La rechute pourrait être le fait de l'émergence de clones résistants issus d'une sélection stochastique Darwinienne et la CSL ne pourrait être qu'un artefact de laboratoire (Kelly *et al*, 2007) (Kern & Shibata, 2007). Par ailleurs, la CSL pourrait être le fruit de la dédifférenciation d'un blaste standard en CSL (Passegué *et al*, 2003).

Enfin, un microenvironnement médullaire dérégulé pourrait être à l'origine de la génération permanente de CSL (Raaijmakers *et al*, 2010) (Kode *et al*, 2014) (Wang *et al*, 2014). Néanmoins les CSL demeurent des cibles thérapeutiques privilégiées comme l'attestent de nombreux travaux récents (Schinke *et al*, 2015) (Prost *et al*, 2015) (Etchin *et al*, 2016).

4. Propriétés des Aldéhydes Déshydrogénases et du DIMATE

Notre collaboration avec Advanced BioDesign (ABD) nous donne l'opportunité d'évaluer une thérapeutique innovante dans le cadre des LAM, le DIMATE, qui est un inhibiteur des Aldéhydes Déshydrogénases de type 1 et 3 (ALDH 1 et 3). C'est la raison pour laquelle nous avons décidé de retenir la définition CD34+CD38-ALDH+ comme définition de la CSL.

A) Aldéhydes Déshydrogénases : propriétés et fonctions

L'intérêt croissant au cours de ces dernières années pour ces enzymes intra cytoplasmiques que sont les aldéhydes déshydrogénases (ALDHs), s'explique par leurs utilisations comme marqueurs pour distinguer les cellules souches, saines ou cancéreuses, au sein de différents tissus. En effet, les cellules souches, normales ou tumorales, hématopoïétiques ou non, expriment une forte activité ALDH en cytométrie en flux (Hess *et al*, 2004) (Storms *et al*, 1999) (Moreb, 2008) (D'Angelo & Wicha, 2010) (Ma & Allan, 2011).

Avant d'être reconnu comme un marqueur des cellules souches, les différents types d'ALDH (1 à 3) étaient connus pour contrôler le niveau intra cytoplasmique de trois aldéhydes apoptogéniques endogènes que sont le methional, le malondialdéhyde (MDA) et le 4-hydroxynonanal (HNE). Les cellules cancéreuses se protègent de ces trois aldéhydes

apoptogéniques grâce aux ALDHs qui oxydent ces derniers en acides carboxyliques non apoptogéniques (Fournet *et al*, 2013) (**Figure 1**).

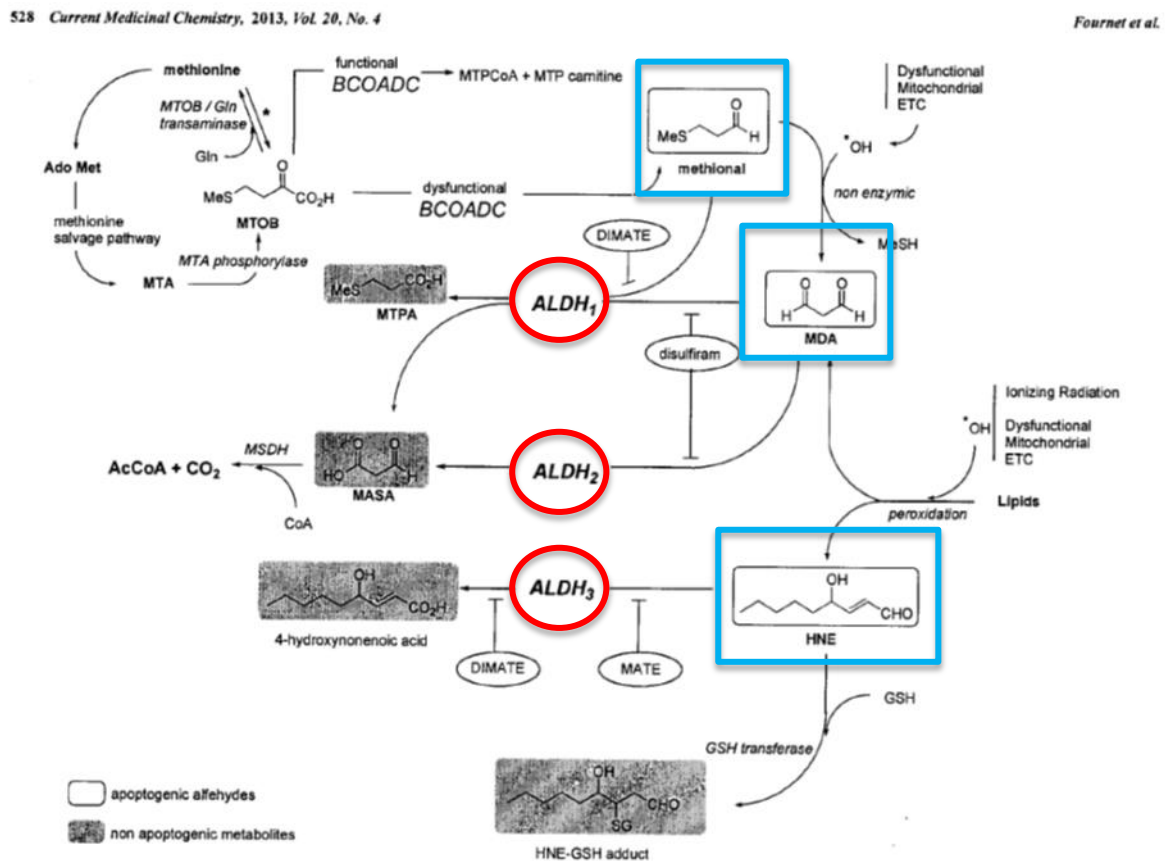


Figure 1 : Origines et métabolismes intracellulaire des différentes aldéhydes apoptogéniques : transformation par les ALDHs du methional, du MDA et du HNE, en métabolites non-apoptogéniques et cibles intracellulaires du DIMATE (Fournet *et al*, 2013)

B) Aldéhydes Déshydrogénases et Leucémies Aigues Myéloïdes

Outre la définition de la CSL proposée par Gerber et al. (cf. plus haut) faisant intervenir le niveau d'activité des ALDHs en cytométrie en flux (Gerber *et al*, 2012), plusieurs travaux ont exploré le rôle que pouvaient jouer les ALDHs dans les LAM. Dans les LAM, les gènes gouvernant les ALDHs sont retrouvés amplifiés ou surexprimés dans 42% des cas, impactant la survie péjorativement (Gao *et al*, 2013) (Cerami *et al*, 2012) (**Figure 2 et 3**).

Altered in 69 (42%) of 166 cases/patients

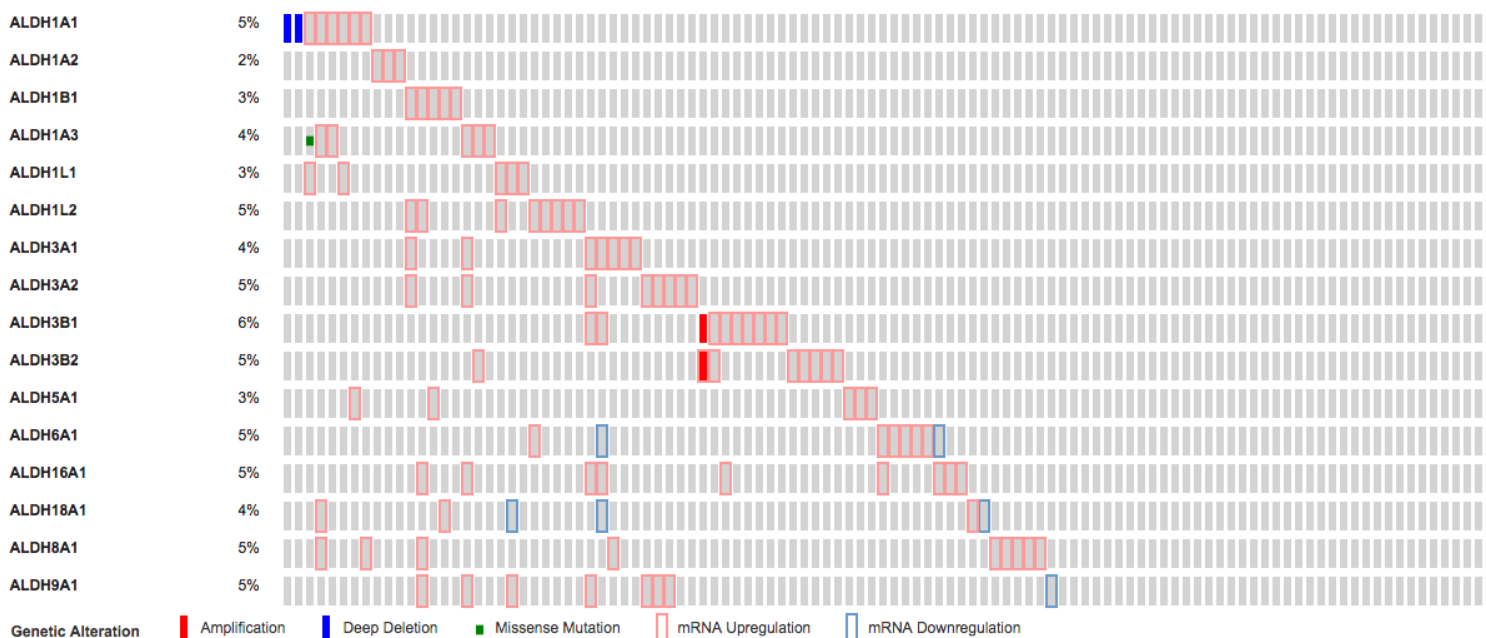


Figure 2 (Données extraites de la base de données cBioportal) : Altérations génétiques des gènes gouvernant les ALDHs chez 166 patients atteints par une LAM (Gao *et al*, 2013)

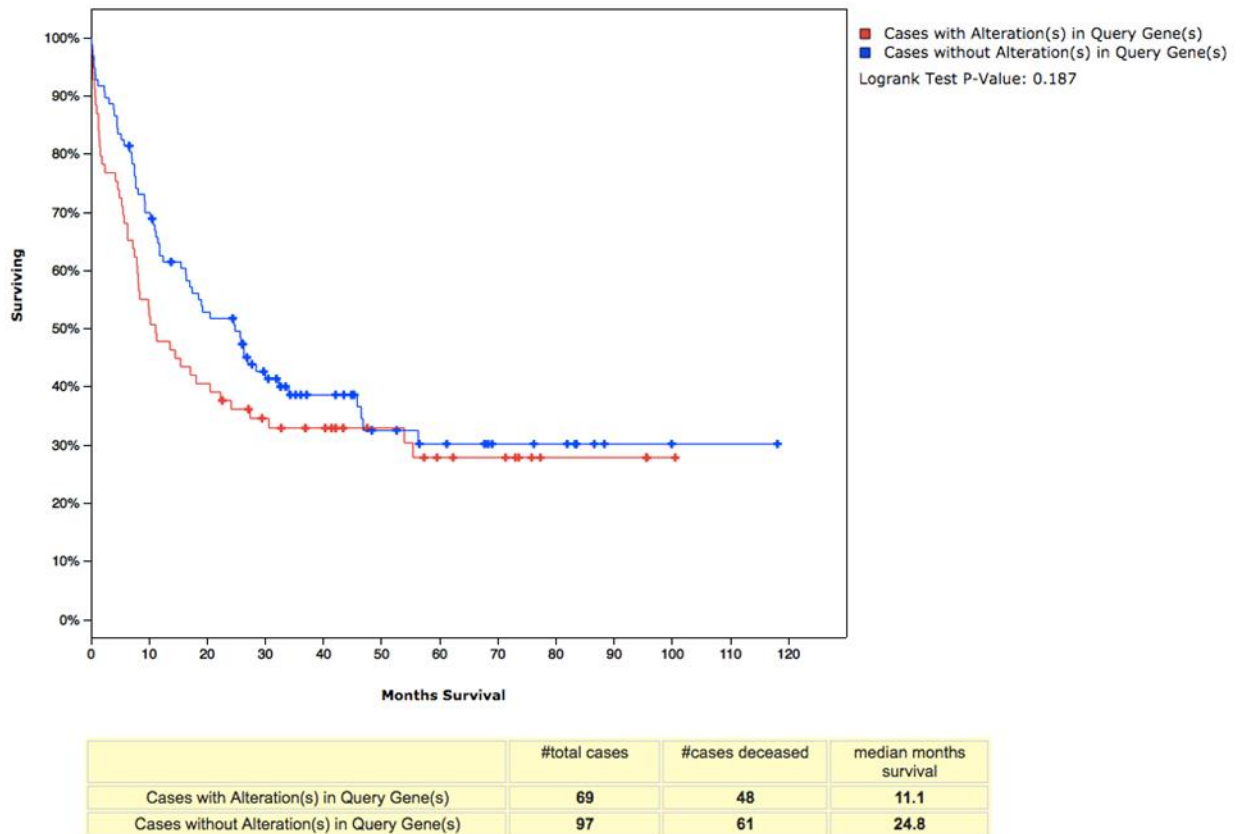


Figure 3 (Données extraites de la base de données cBioportal) : Survie moyenne selon la présence ou l'absence d'altérations génétiques des gènes gouvernant les ALDHs (Cerami *et al*, 2012)

C) Le Dimethyl Ampal Thiolester : DIMATE

Parmi la famille des inhibiteurs acétyléniques des ALDHs, le DIMATE est une drogue intéressante dans le traitement des cancers. Le DIMATE est un α,β , acétyléniques aminothiolo ester N- substitué et un inhibiteur actif, enzyme-dépendant et irréversible des ALDHs 1 et 3. Le DIMATE est une molécule ayant déjà été étudié en cancérologie solide, et sa toxicité sélective sur le tissu néoplasique a été mise en évidence. Dans le cadre des tumeurs de prostate notamment, le DIMATE entraîne une apoptose irréversible sur les cellules humaines

d'adénocarcinome de prostate et seulement un effet cytostatique sur le tissu épithélial prostatique humain sain (Quash *et al*, 2008). Par ailleurs, en hématologie, le DIMATE induit une apoptose irréversible des cellules lymphomateuses murines BAF3, chimio-résistantes et insensibles au disulfiram, un autre inhibiteur des ALDHs (Roch *et al*, 1996). Les principales voies d'inhibition des ALDHs ciblées par le DIMATE sont présentées sur la **Figure 1**.

II-Principaux Résultats

Les paragraphes ci-dessous reviennent sur les principaux résultats obtenus lors de l'évaluation du DIMATE *in vitro* et *in vivo* comme thérapeutique innovante dans les LAM. Un rappel succinct sur les méthodes et techniques employées sera fait avant chaque résultat. A noter que le matériel et les méthodes employés lors des différentes expérimentations sont détaillés dans la partie « *Materials and methods* » de l'article « *Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors* » (cf publication de référence de la partie 1)

A) Le DIMATE est un puissant inhibiteur des ALDHs

Afin d'évaluer la capacité du DIMATE à inhiber l'activité des ALDHs, l'activité ALDH de trois populations cellulaires d'intérêt a été mesurée en cytométrie en flux avec le kit ALDEFLUOR distribué par Stem Cell. Les trois populations cellulaires évaluées ont été les suivantes :

- Cellules humaines leucémiques HL-60. La lignée HL-60 est une lignée leucémique dérivée d'une LAM2 issue d'une femme âgée de 36 ans,
- Myéloblastes humains CD34+CD38-, récupérés sur le sang circulant de patients porteurs d'une LAM avant toute chimiothérapie,
- Cellules souches hématopoïétiques saines, CD34+CD38-, récupérées depuis un greffon autologue après cytophérèse.

Les myéloblastes humains CD34+CD38- constituent une population leucémique enrichie en CSL. Ces myéloblastes ont été récupérés sur du sang circulant de 10 patients porteurs d'une LAM et admis dans le service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire (Pr R Costello) de l'hôpital universitaire de La Conception. Pour être inclus, les patients devaient présenter un pourcentage de blastes circulants d'au moins 20% avec au moins 30% de blastes CD34+CD38-. Tous les patients répondant à ces critères ont été prélevés indépendamment de leur sexe, leur âge, du type de LAM ou de leurs statuts cytogénétiques. Les caractéristiques des dix patients inclus dans cette étude sont résumées dans le **Tableau 3**. Les blastes ont été par la suite extraits du sang circulant par Ficoll, puis un tri magnétique CD34+ a été réalisé afin d'isoler les blastes CD34+. Enfin l'activité ALDH, avant et après traitement par le DIMATE, le statut CD38- et la viabilité ont été analysés en cytométrie en flux (**Figure 4**).

Concernant les CSH saines CD34+CD38-, ces dernières sont issues de greffons autologues collectés après cytophères chez des patients en rémission complète pour des hémopathies lymphoïdes (Myélome, Lymphomes de haut grade) avant intensification thérapeutique et autogreffe. Par la suite, les mêmes modalités expérimentales décrites concernant les myéloblastes CD34+CD38- ont été appliquées.

L'ensemble de cette étude a été approuvé par le comité d'éthique de la Méditerranéen V (Ref. 15.013) et l'Agence National de la Sécurité du Médicament (Ref. 150054B-11).

AML	Age	Sex	Type	Circulating Blasts	de novo or secondary AML	Previous treatments	Cytogenetic
UPN1	74	F	AML1	60%	Secondary to myelodysplastic syndrome	5 cycles of Azacitidine	45,XX, + del(7q)
UPN2	79	F	AML1	81%	de novo	Induction + consolidation elderly patients (cytarabine idarubicin)	Complex karyotype + del(5q)
UPN3	77	M	AML1	83%	de novo	Standard induction (daunorubicin – cytarabine)	normal karyotype
UPN4	64	F	AML0	25%	Secondary to primary myelofibrosis	Double induction (daunorubicin – cytarabine followed by cytarabine-idarubicin)	Complex karyotype
UPN5	75	M	AML0	40%	Secondary to myelodysplastic syndrome	Untreated	Complex karyotype + del(5q) + del(7q)
UPN6	73	F	AML5	22%	de novo	Induction + consolidation elderly patients (cytarabine- idarubicin)	t(6;11) MLL-AF6
UPN7	71	M	AML5	34%	Secondary to myelodysplastic syndrome	Induction + consolidation elderly patients (cytarabine - idarubicin)	Del(5q), del(7q), del(17p)
UPN8	91	F	AML0	59%	de novo	Untreated	Unknown
UPN9	48	M	AML7	27%	Secondary to chronic myelomonocytic leukemia.	2 cycles of Azacitidine + 2 cycles of Decitabine	Normal karyotype
UPN10	78	M	AML5	80%	de novo	Non	Normal karyotype

AML : Acute Myeloid Leukemia; UPN : Unic Patient Number; WHO: World Health Organization

Tableau 3 : Caractéristiques des patients leucémiques inclus

L'activité ALDH des cellules HL-60, des CSH normales et des CSL a été monitorée à H0, et à H24 avec ou sans traitement par du DIMATE à la dose de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (**Figure 5**).

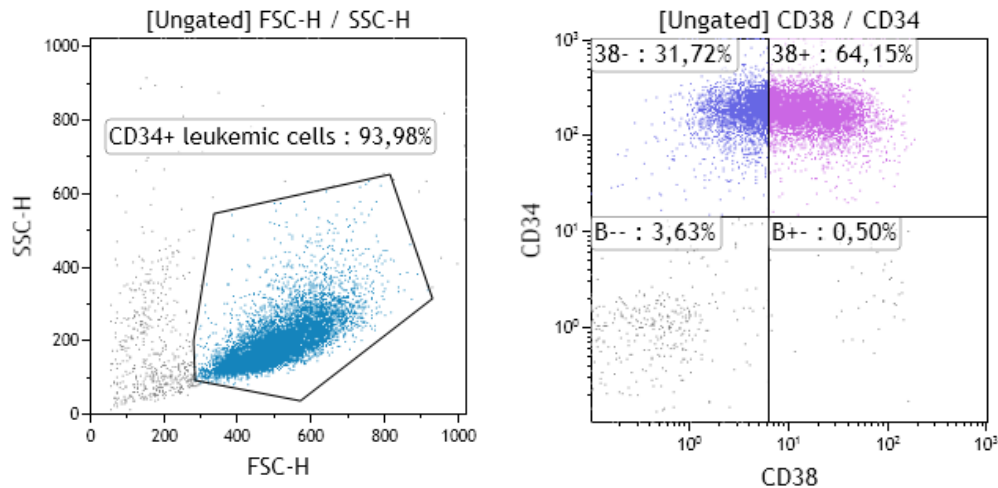


Figure 4 : Identification en cytométrie en flux, après tri magnétique CD34+, d'une population de Myéloblastes CD34+CD38- enrichie en Cellules Souches Leucémiques

A H0, le pourcentage moyen de cellules HL-60 ALDH+ était de 37,5% (ESM \pm 14,6). En ce qui concerne les CSH saines et les CSL, les pourcentages moyens de cellules ALDH+ étaient respectivement de 6,1 % (ESM \pm 5,3) et de 63,7 % (ESM \pm 10.45). Après 24 heures de culture cellulaire, sans traitement, le pourcentage moyen de cellules ALDH + dans les trois populations (HL-60, CSH, CSL) est resté sensiblement inchangé (35.3% ESM \pm 15 ; 67,7% ESM \pm 2.6 and 6.2% ESM \pm 5.6, respectivement). En revanche, après 24 heures de culture cellulaire en présence de DIMATE à la dose de $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$, le pourcentage de cellules HL-60 ALDH+ s'est effondré à 0% ($p < 0,001$) dans tous les réplicas techniques ($n=3$). De la même manière, le pourcentage de CSL ALDH+ a drastiquement diminué à 2,3% (ESM \pm 1.1)

($p < 0,001$). Enfin, le pourcentage de CSH ALDH+ a également diminué jusqu'à 1,1% (SEM ± 0.5) ($p < 0,001$) (**Figure 6**).

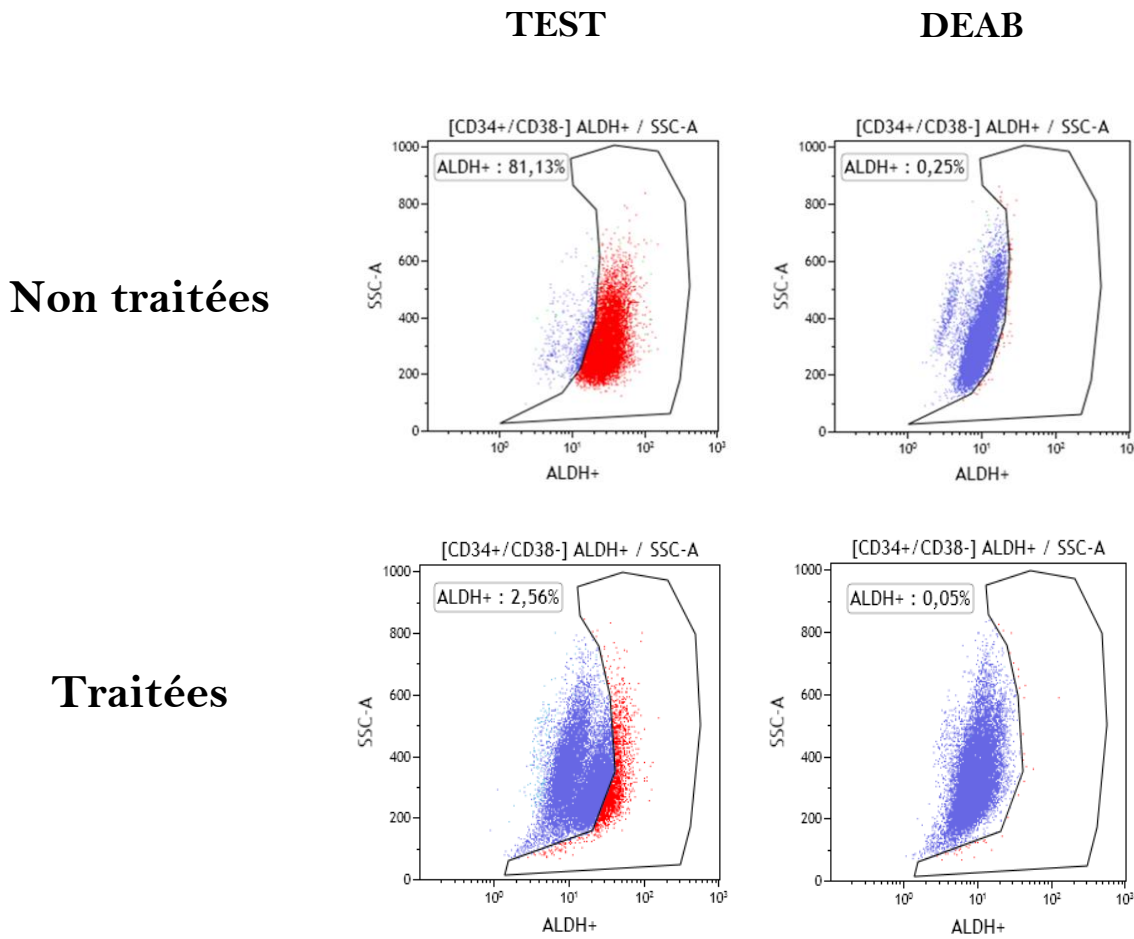


Figure 5 : Evaluation de l'activité ALDH en cytométrie de flux. Exemple de profils cytométrique ALDH sur des cellules leucémiques CD34+CD38- (enrichies en CSL), après 24 heures de culture cellulaire avec et sans DIMATE 5 μ mol.l⁻¹. Le DEAB est le contrôle négatif indispensable à l'interprétation de chaque test ALDEFLUOR

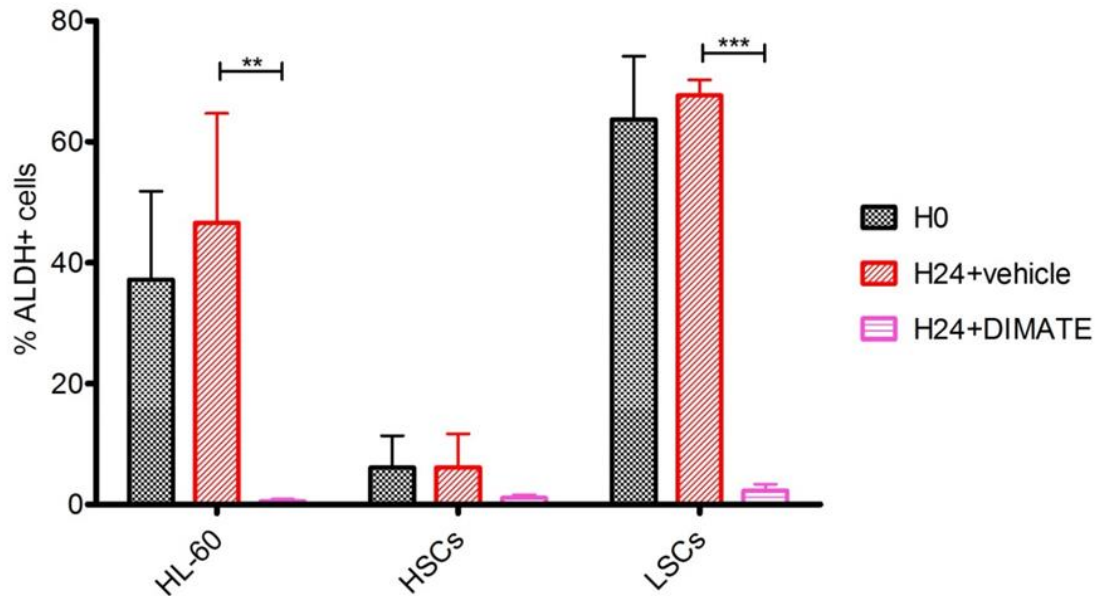


Figure 6 : Suivi de l'activité ALDH dans les populations HL-60, Cellules Souches Hématopoïétiques (=HSCs) et Cellules Souches Leucémiques (=LSCs) à HO et après 24 heures de culture cellulaire avec et sans DIMATE 5 μ mol.l-1.

B) Le DIMATE présente une cytotoxicité majeure sur plusieurs lignées de Leucémies Aigues Myéloïdes humaines

Sur les lignées leucémiques suivantes : HL-60 (dérivée de LAM2), Kasumi-1 (dérivée de LAM2), Kasumi-3 (dérivée de LAM0), MOLM-14 (dérivée de LAM5) et KG-1 (dérivée de LAM6) les concentrations inhibitrices de 50% (IC50) pour le DIMATE étaient respectivement de 5,094 μ mol.L⁻¹(ESM \pm 0,1007); 12,2 μ mol.L⁻¹ (ESM \pm 0,4711); 1,67 μ mol.L⁻¹ (ESM \pm 0,04758); 3,287 μ mol.L⁻¹ (ESM \pm 0,2039) and 8,028 μ mol.L⁻¹ (ESM \pm 1,386). Avec un IC50 maximal inférieure 13 μ mol.L-1 (lignée Kasumi-1) le DIMATE présente une cytotoxicité majeure sur ces différentes lignées de LAM (Figure 7 et Tableau 4).

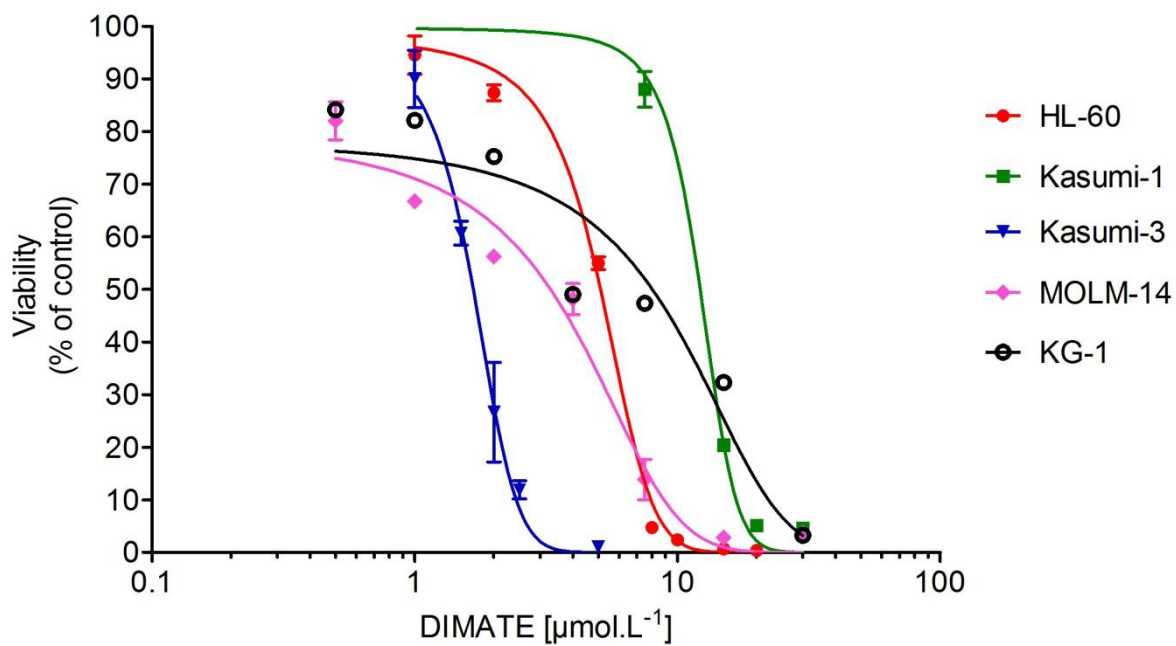


Figure 7 : Profil de cytotoxicité du DIMATE sur différentes lignées de LAM

	HL-60	Kasumi-1	Kasumi-3	MOLM-14	KG-1
IC50 (μmol.L⁻¹)	5.094	12.2	1.67	3.287	8.028
ESM (±)	0.1007	0.4711	0.04758	0.2039	1.386

Tableau 4 : Valeurs des IC50 (avec ESM) pour le DIMATE dans les lignées leucémiques suivantes : HL-60, Kasumi-1, Kasumi-3, MOLM-14 et KG-1

C) Le DIMATE entraîne une apoptose irréversible, via la voie des caspases 3/7, des cellules leucémiques traitées. Cette apoptose peut être prévenue par un prétraitement au Glutathion Mono éthylique Ester.

La voie de la « *Reduced Glutathion Transferase* » ou GSH transférase constitue une voie de secours pour la détoxification des cellules en cas d'inhibition des ALDHs (**Figure 1**). Cette voie nécessite du Glutathion (GSH) pour permettre une détoxification alternative du HNE en GSH-HNE. Cette voie s'avère suffisante pour détoxifier les aldéhydes apoptogéniques dans les cellules non tumorales, en cas d'inhibition des ALDHs. En revanche, les taux intracellulaires de GSH physiologiques ne permettent pas aux cellules tumorales de survivre en utilisant la voie de la GSH transférase en cas d'inhibition des ALDHs, ces dernières produisant beaucoup trop d'aldéhydes apoptogéniques. Cela explique, au moins en partie, la différence de sensibilité au DIMATE des cellules saines et tumorales. Comme mise en évidence par la **Figure 8**, les cellules HL-60 mises en culture 48 heures avec du DIMATE $10\mu\text{mol.L}^{-1}$ présentent une augmentation majeure des caspases 3/7 (stigmate d'apoptose) inversement proportionnelle à leur viabilité. En revanche, les cellules HL-60 prétraitées avec du Glutathion Mono éthylique Ester (GSH-MEE), un analogue du GSH, deviennent insensible au DIMATE, qui à la dose de $10\mu\text{mol.L}^{-1}$, n'induit plus d'apoptose chez ces cellules prétraitées. L'enrichissement préalable et artificiel en GSH permet aux cellules HL-60 de massivement détoxifier leurs aldéhydes apoptotiques via la voie de la GSH transférase après l'inhibition des ALDHs, ce qui n'est pas possible à l'état basal.

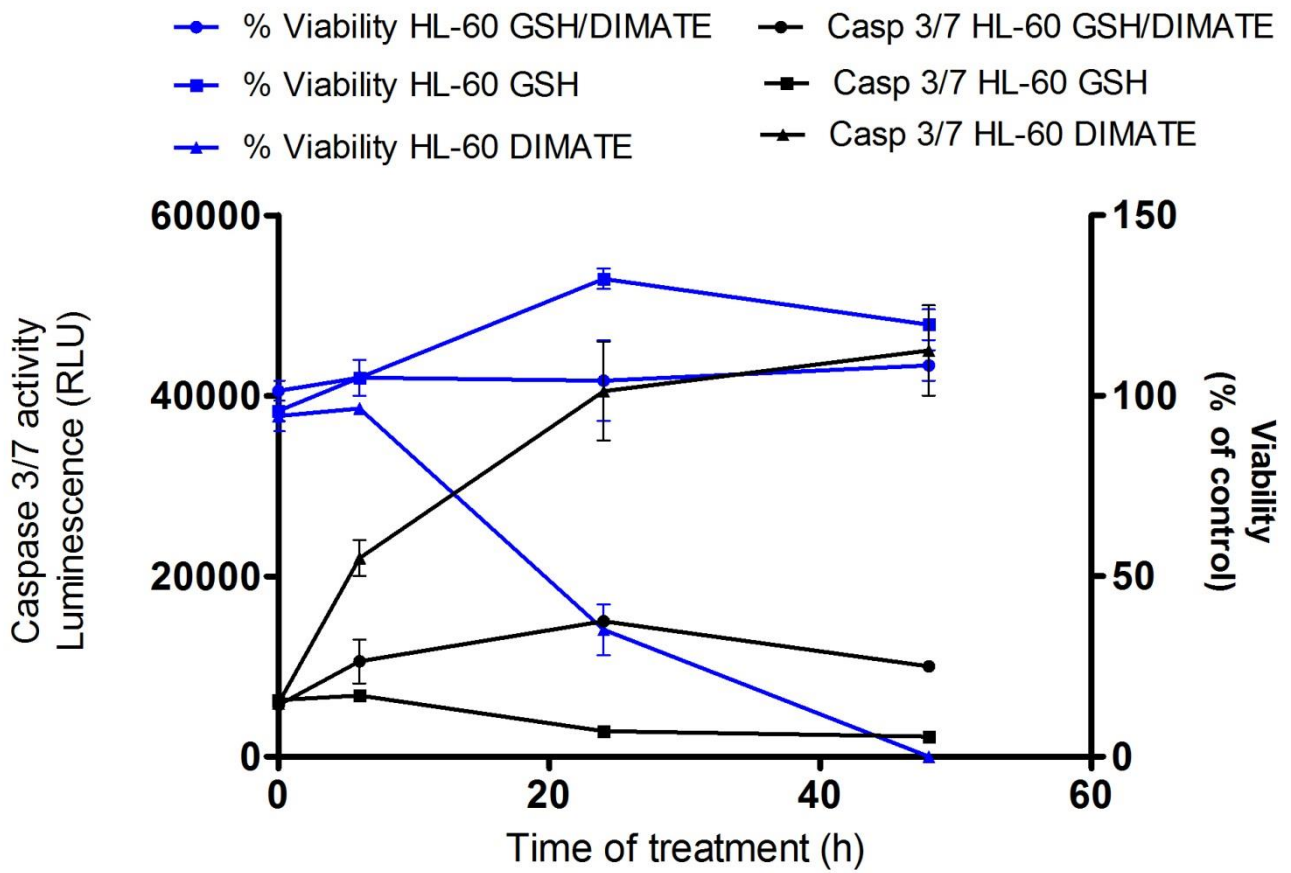


Figure 8 : Traitement par GSH et préservation des cellules HL-60 de l'effet apoptotique du DIMATE

D) *Le DIMATE présente une cytotoxicité majeure sur des populations enrichies en cellules souches leucémiques, mais contrairement aux chimiothérapies conventionnelles, le DIMATE présente une innocuité sur les cellules hématopoïétiques saines*

Dans un premier temps, la cytotoxicité du DIMATE a été évaluée sur une population leucémique humaine CD34+CD38-ALDH+ extrêmement enrichie en CSL. Sur cette population CD34+CD38-ALDH+ l'IC50 du DIMATE était de 2,8 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESM \pm 0,03). Pour cette même population leucémique riche en CSL, les IC50 de la DNR, de l'Ara-C et de l'azacytidine étaient respectivement de 0,132 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESM \pm 0,009), 1,5 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESM \pm 0,17) and 4,41 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (SEM \pm 0,4) (**Figure 9 et Tableau 5**).

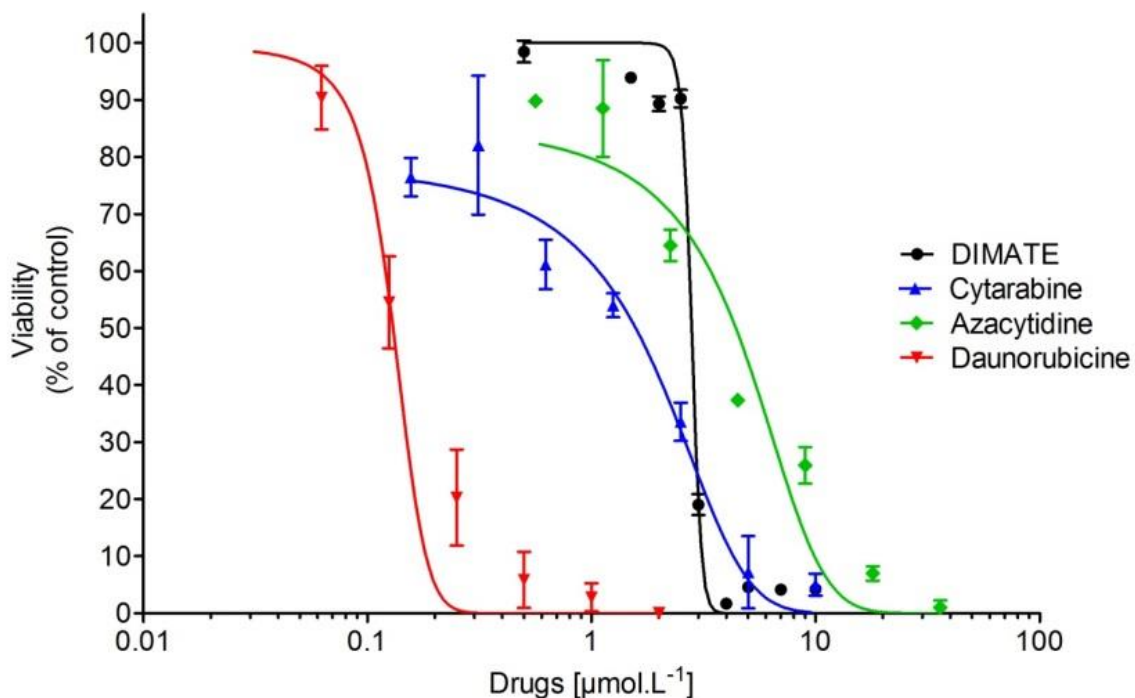


Figure 9 : Profils de cytotoxicité du DIMATE, de la Daunorubicine, de la Cytarabine et de l'Azacytidine sur des cellules leucémiques CD34+CD38-ALDH+

	DIMATE	Cytarabine	Daunorubicine	Azacytidine
IC50 ($\mu\text{mol.L}^{-1}$)	2.799	1.574	0.132	4.406
ESM (\pm)	0.032	0.166	0.009	0.413

Tableau 5 : Valeurs des IC50 (avec ESM) pour le DIMATE, la Daunorubicine, la Cytarabine et l'Azacytidine sur des cellules leucémiques CD34+CD38-ALDH+

Dans un second temps, des CSH saines, (CD34+CD38-) ont été mises en culture et traitées 48 heures avec les IC50 déterminées pour ces différentes drogues sur les CSL (CD34+CD38-ALDH+). Après 48 heures de culture, le ratio de prolifération moyen pour les CSH non traitées était de 300% (ESM \pm 4,398) et de 250% pour les CSH traitées avec du DIMATE (ESM \pm 3,665) ($p < 0,01$). Dans les groupes de CSH traitées avec de la DNR et de l'ara-C, il n'y a pas eu de prolifération cellulaire, mais au contraire une mortalité cellulaire respectivement de 20% (ESM \pm 4,691) ($p < 0,001$) and 40% (ESM \pm 3,417) ($p < 0,001$). Enfin, dans le groupe des CSH traitées avec du VIDAZA un effet cytotatique sur les CSH a été observé ($p < 0,001$) (**Figure 10**).

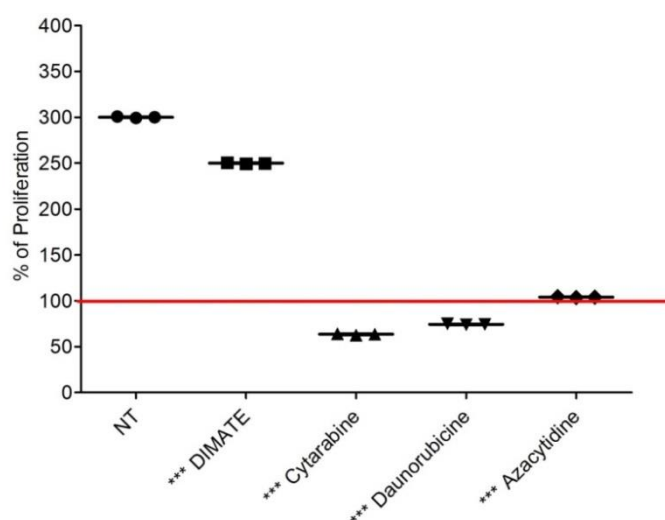


Figure 10 : Pourcentage de prolifération des cellules souches hématopoïétiques saines après 48 heures de mise en culture et de traitement avec les IC50 déterminées pour le DIMATE, la Daunorubicine, la Cytarabine et l'Azacytidine sur des cellules leucémiques CD34+CD38-ALDH

Puisque l'IC₅₀ du DIMATE pour les CSL est de 2,79 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESM \pm 0,04) et de 24,39 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ (ESM \pm 1,58) pour les CSH, nous avons pu déterminer une zone thérapeutique entre 5 et 9 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ au sein de laquelle le DIMATE éradique toutes les CSL et épargne 97% des CSH (Figure 11).

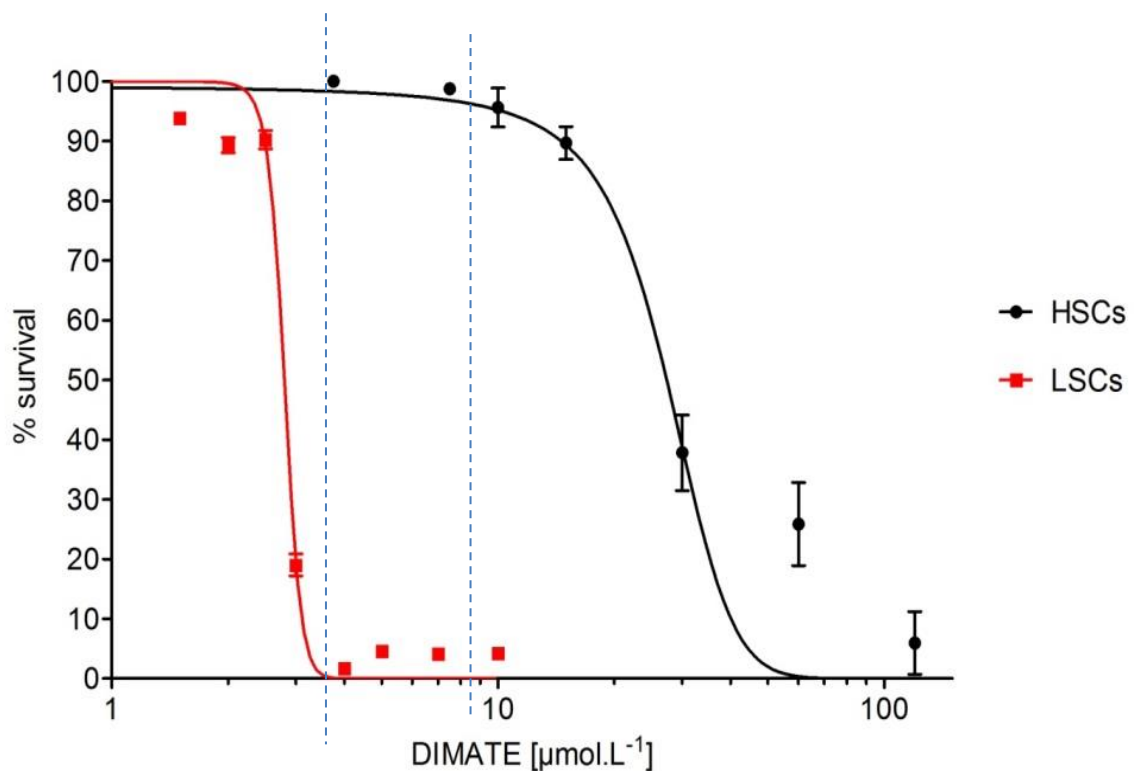


Figure 11 : Pourcentage de survie des CSL (=LSCs) et des CSH (=HSCs) en fonction des différentes concentrations de DIMATE. Entre les pointillés bleus, détermination d'une zone thérapeutique au sein de laquelle le DIMATE éradique toutes les CSL et épargne 97% des CSH

E) Modèle Murin n°1 : Chez des souris NOG, xéno-gréffées avec des cellules leucémiques humaines enrichies en cellules souches leucémiques, le DIMATE éradique spécifiquement les cellules leucémiques humaines et épargne les cellules sanguines murines saines

Trois millions de cellules leucémiques humaines (issues d'un patient porteur d'une LAM1 de mauvais pronostic, avec un caryotype complexe, réfractaire primaire, cf. UPN2, **Tableau 3**), CD34+CD38-, enrichies en CSL, ont été injecté à 15 souris NOG (NOD/SCID/IL2R γ^{null}). Après 4 semaines de délais permettant la prise de greffe des cellules leucémiques humaines chez les souris, ces dernières ont été randomisées en trois groupes de 5 :

- Un groupe non traité / contrôle (Véhicule)
- Un groupe DIMATE 14mg/kg
- Un groupe DIMATE 28mg/kg

Le DIMATE ou le véhicule (contrôle négatif) ont été administrés par voie intraveineuse 3 fois par semaine durant 4 semaines. A la fin de la période de traitement de 4 semaines, les souris ont été euthanasiées. La rate, le sang périphérique et la moelle osseuse ont été recueillies. Durant toute la période de traitement, des prélèvements périphériques de sang ont également été réalisés. Le tri et l'analyse des cellules leucémiques humaines (hCD45+) et des cellules sanguines murines saines (mCD45+) ont été réalisés en cytométrie de flux. Le schéma expérimental de ce modèle murin est présenté **Figure 12**.

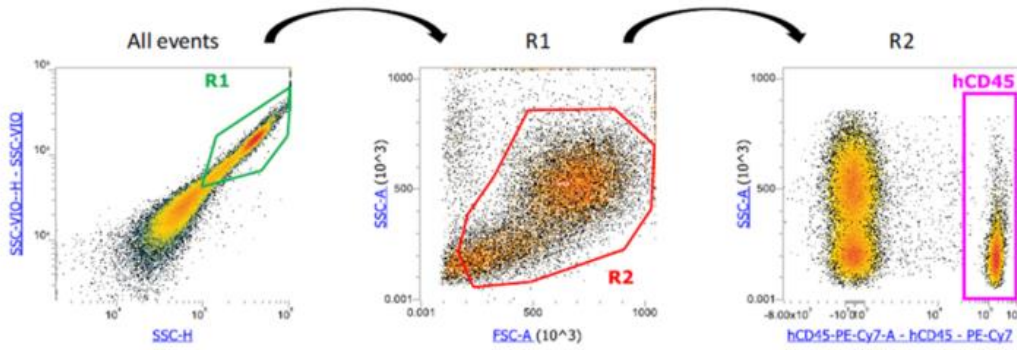
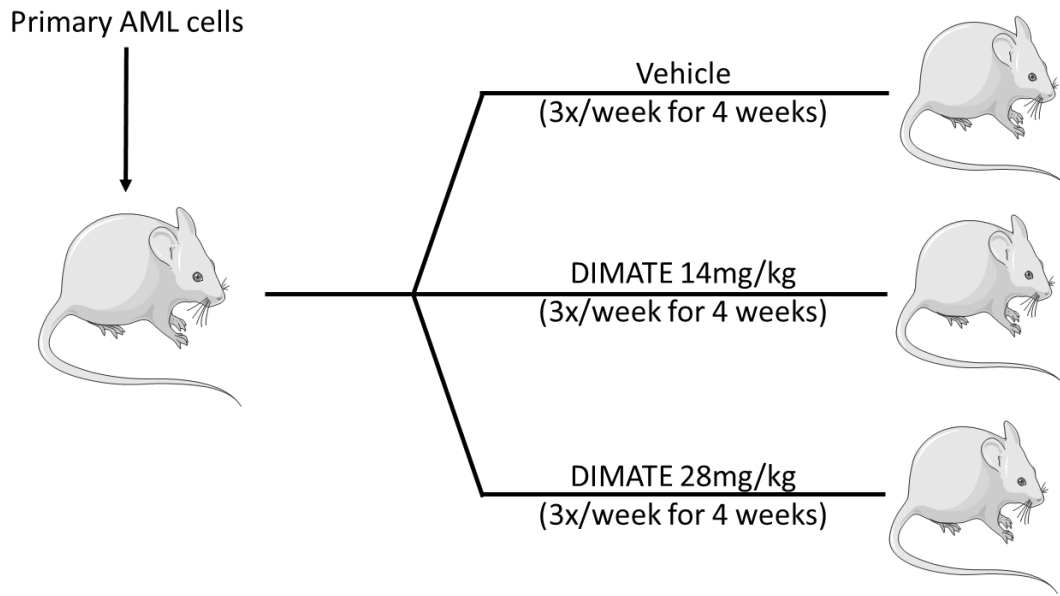


Figure 12 : Schéma expérimental du modèle murin n°1

Dans le groupe contrôle après 4 semaines de traitement, le nombre de cellules leucémiques circulantes hCD45+ a augmenté de 3.10^5 (ESM $\pm 1,3.10^5$) à $3,7.10^5$ (ESM $\pm 3,3.10^5$) (NS). En revanche, chez les souris traitées avec du DIMATE aux doses de 14mg/kg et 28mg/kg une diminution drastique des cellules humaines leucémiques hCD45+ a été observée par rapport au groupe contrôle. De 3.10^5 (ESM $\pm 1,3.10^5$) à $3,7.10^4$ (ESM $\pm 1,7.10^4$) dans le groupe DIMATE 14mg/kg ($p < 0,01$) et de 3.10^5 (ESM $\pm 1,3.10^5$) à $7,3.10^3$ (ESM $\pm 3.10^3$) dans le groupe DIMATE 28mg/kg ($p < 0,01$) (**Figure 13 A et C**). De plus, durant toute la période de traitement aucune toxicité n'a été observée sur les cellules hématologiques murines mCD45+ saines, que ce soit dans le groupe contrôle ou dans les groupes DIMATE (**Figure 13B**). A la fin des 4 semaines de traitement, toutes les souris ont été euthanasiées. Le poids de la rate ainsi que l'envahissement tumoral médullaire et splénique ont été évalués chez chacune des souris. Comparativement au groupe contrôle, dans les groupes de traitements DIMATE 14mg/kg et 28mg/kg l'infiltration splénique par des cellules de LAM humaines a drastiquement diminué de $1,7.10^7$ (ESM $\pm 9,9.10^6$) à $1,4.10^6$ (ESM $\pm 8,2.10^5$) dans le groupe DIMATE 14mg/kg ($p < 0,01$) et jusqu'à $1,3.10^5$ (ESM $\pm 7,2.10^4$) dans le groupe DIMATE 28mg/kg ($p < 0,01$) (**Figure 13D**). Concernant la pesée des rates, comparativement au groupe contrôle, le poids moyen des rates murines a diminué de 182g (ESM $\pm 74,2$ g) à 40,25g (ESM $\pm 19,4$ g) dans le groupe DIMATE 14mg/kg (NS) et jusqu'à 37,7g (ESM $\pm 7,9$ g) dans le groupe DIMATE 28mg/kg ($p < 0,05$) (**Figure 13F**). En ce qui concerne la moelle osseuse, comparativement au groupe contrôle, l'infiltration médullaire par les cellules de LAM humaines a diminué de $2,1.10^5$ (ESM $\pm 1,7.10^5$) à $1,2.10^5$ (ESM $\pm 9,3.10^4$) dans le groupe DIMATE 14mg/kg (NS) et jusqu'à $9,8.10^3$ (ESM $\pm 6,2.10^3$) dans le groupe DIMATE 28mg/kg ($p < 0,05$) (**Figure 13E**).

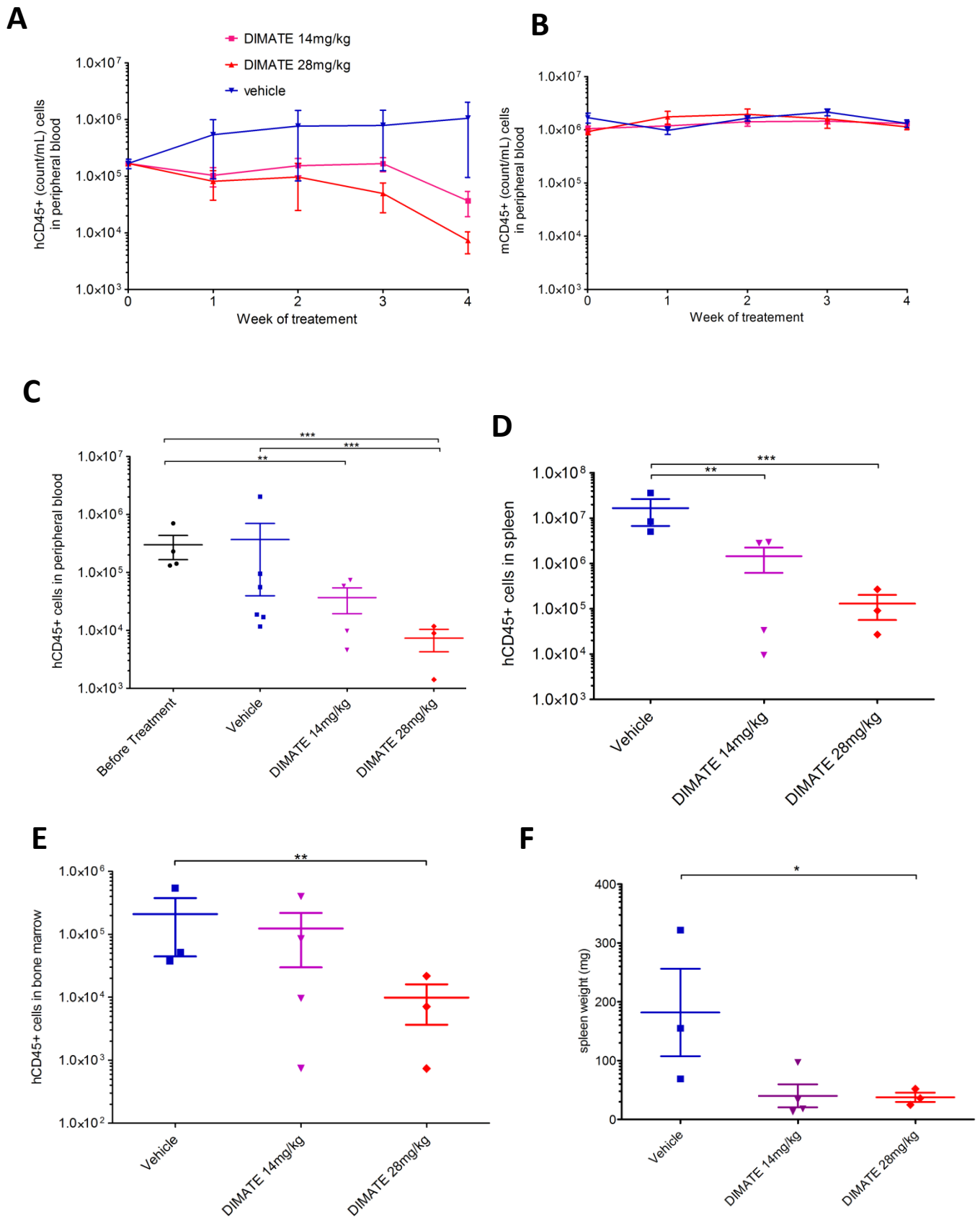


Figure 13 : Monitoring *in vivo* des cellules hCD45+ et mCD45+ en fonction des différents conditions de traitement

F) Modèle Murin n°2 : Chez des souris SCID CB17, transplantées avec des cellules de lignées leucémiques HL-60, le DIMATE présente une activité anti tumorale similaire à l'association Daunorubicine /Cytarabine

Vingt-cinq souris SCIB CB17 ont été injectées en sous cutané avec un million de cellules de lignées leucémiques humaines HL-60. Lorsque la taille des tumeurs a atteint un volume moyen de 100mm³ les souris ont été randomisées en 5 groupes de 5 souris :

- Un groupe non traité (Véhicule)
- Un groupe DIMATE 15mg/kg
- Un groupe DIMATE 30mg/kg
- Un groupe DIMATE 50mg/kg
- Un groupe associant de la DNR 4mg/kg avec de l'Ara-C 10mg/kg

Avant de commencer l'étude, il a été décidé pour des raisons éthiques, que les souris seraient sacrifiées lorsque la tumeur atteindrait le volume critique de 1600mm³. Le véhicule et toutes les drogues ont été administrés par voie intrapéritonéale, pendant 4 semaines. Le véhicule et le DIMATE trois fois par semaine. La DNR et l'ara-C deux fois par semaine. Après 20 jours de traitement, l'expérimentation a été arrêtée car les tumeurs avaient atteint le volume critique dans le groupe contrôle (1600mm³). A l'arrêt du traitement, le volume tumoral moyen était de 1532mm³ (ESM ±160) dans le groupe contrôle. En revanche, la prolifération tumorale a été significativement contrôlée dans les groupes DIMATE 15mg/kg, DIMATE 30mg/kg, DIMATE 50mg/kg et DNR 4mg/kg + ara-C 10mg/kg avec respectivement des volumes tumoraux moyens de 813mm³ (ESM ± 152) (p<0,01), 983mm³ (ESM ±232) (p<0,05), 821mm³ (ESM ± 185) (p<0,01) et 689mm³ (ESM ± 211) (p<0,01) (**Figure 14**). Il n'existe pas de différence statistiquement significative entre les différents groupes de traitement.

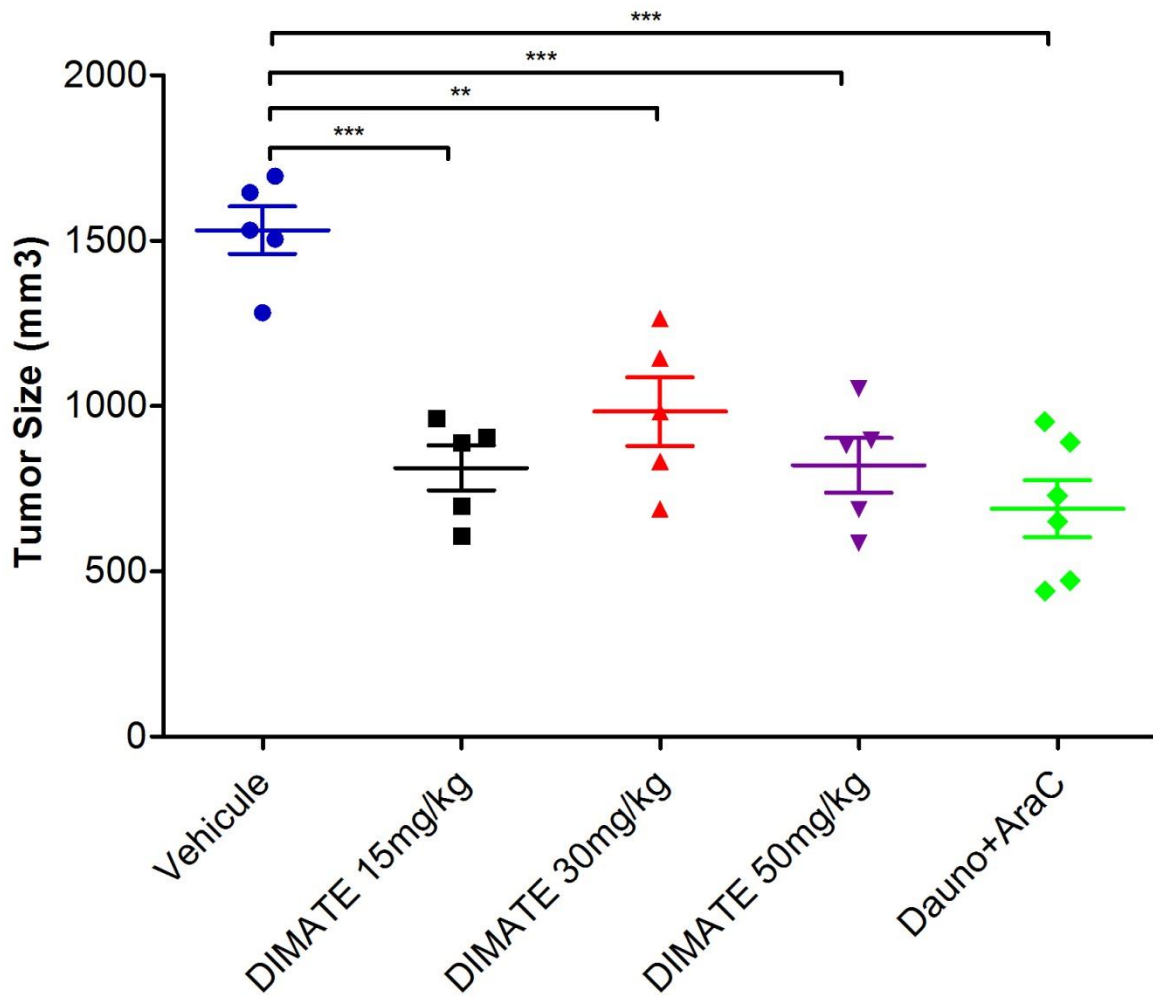


Figure 14 : Volume tumorale après 20 jours de traitement en fonction des différentes conditions thérapeutiques

G) Une analyse comparative transcriptomique du DIMATE permet d'explicitier plus finement les mécanismes d'action du DIMATE

Un million de cellules HL-60 ont été mise en culture dans quatre conditions de traitement différentes : sans traitement, avec du DIMATE $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (valeur IC50% du DIMATE sur les HL-60), Ara-C $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$ (valeur IC50% de l'Ara-C sur les HL-60), et une association DIMATE $5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ + Ara-C $0.1 \mu\text{mol.L}^{-1}$. Après six heures de cultures, les cellules ont été centrifugées et les ARN respectifs des quatre groupes ont été extraits. Une analyse transcriptomique comparative entre les quatre groupes a été conduite, avec un taux de faux positifs (FDR) de 0%. Quatre clusters hiérarchiques majeurs permettent de clairement distinguer les quatre groupes de traitement (**Figure 15**). Les deux principaux clusters (cluster I et II) permettent clairement de distinguer les cellules HL-60 traitées avec DIMATE (DIMATE et DIMATE + Ara-C) ou sans DIMATE (Ara-C seule et non traitées). Deux clusters plus fins (cluster III et IV) permettent de subdiviser les deux principaux clusters et donc de déterminer une signature transcriptomique spécifique de chaque groupe de traitement. Cette analyse transcriptomique comparative n'a pas mis en évidence de voie de signalisation intéressante dans le groupe Ara-C seule. En revanche, dans les groupes traités avec du DIMATE, l'analyse a permis de mettre en évidence la régulation de gènes et de voies impliquées dans le métabolisme et la transformation des aldéhydes apoptogéniques en acides carboxyliques non apoptogéniques par les ALDHs.

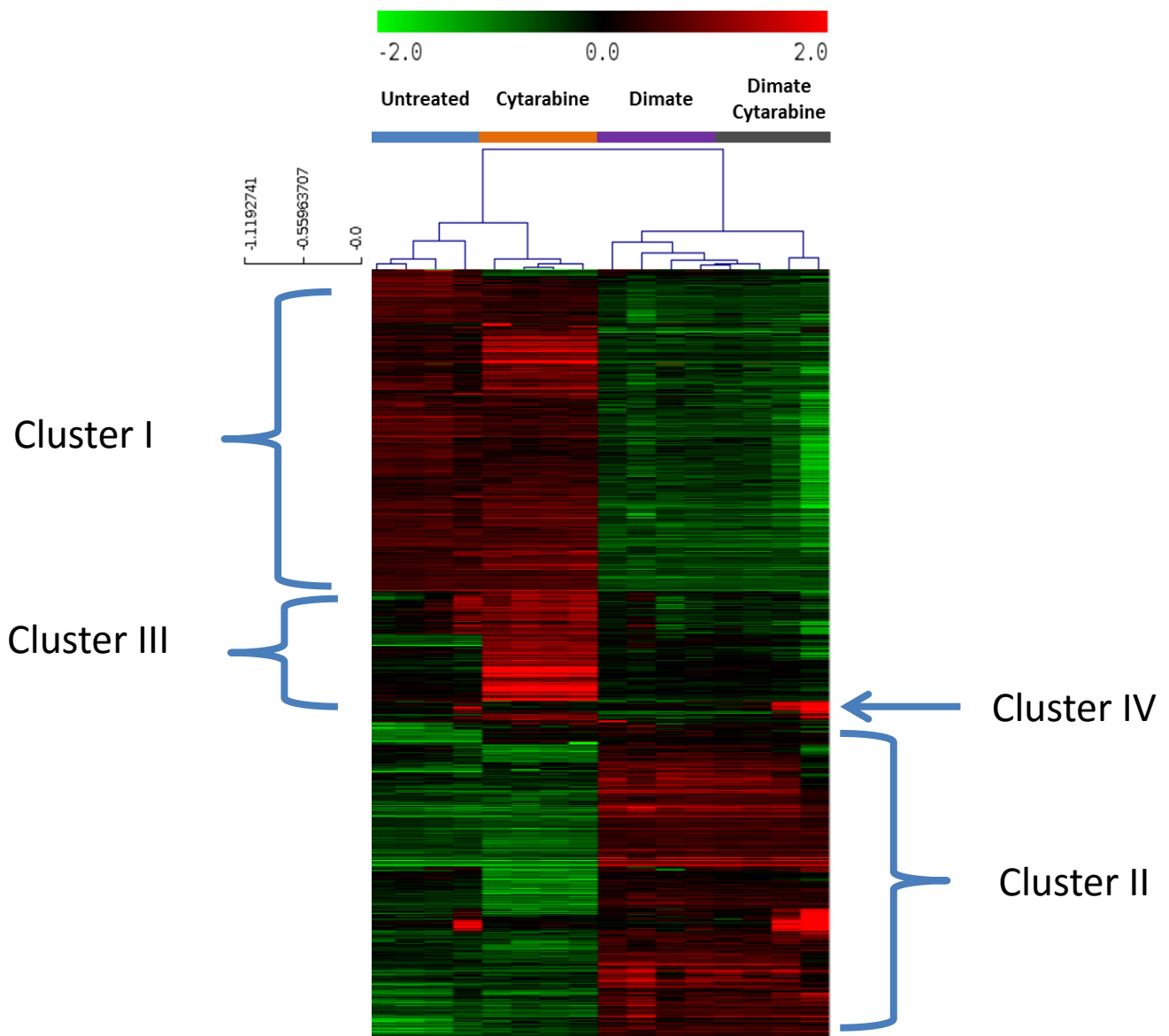


Figure 15 : Dendrogramme représentatif de la modification de l'expression génique des cellules leucémiques HL-60 en fonction des différentes conditions de traitement

En effet, dans les groupes de traitement par DIMATE, de nombreux gènes comme DIDT3, CHAC1, C5orf 39, HSPA6, IER2 ou AOC3 impliqués dans les métabolismes de détoxification cellulaire, dans la voie NF- κ B ou la voie des ALDHs sont surexprimés, tandis que WTAP et HSP90 sont sous exprimés. Au sein de la voie STAT3-NF κ B/DDIT3/CEBP β , le traitement par DIMATE entraîne une augmentation de l'expression de DDIT3. Une

production augmentée de protéines DDIT3 aboutit à la formation de complexe DDIT3-CEBPβ qui réduit drastiquement l'occupation du promoteur du gène de l'ALDH1A3, normalement occupé par CEBPβ seul et donc diminue massivement la transcription du gène ALDH1A3 (Canino *et al*, 2015). Si on s'intéresse plus spécifiquement au métabolisme de détoxification cellulaire, le traitement par DIMATE entraîne une surexpression de CHAC1 qui aboutit à une dégradation du glutathion intracellulaire (Crawford *et al*, 2015). Comme vu plus haut, le glutathion joue un rôle capital dans la détoxification des aldéhydes apoptogéniques. Par ailleurs, les gènes C5orf39 et du récepteur à l'Annexine II (AXIIR) sont surexprimés après traitement par DIMATE. Ces deux gènes sont notamment impliqués dans l'induction de l'apoptose à travers la voie des caspases. Le récepteur à l'Annexine II, par exemple, est situé dans le cytoplasme, se lie et active la caspase 8 qui va aboutir consécutivement à l'apoptose par une augmentation des caspases 3/7 (Xiong *et al*, 2013). Le traitement par DIMATE entraîne par ailleurs une surexpression du gène AOC3 qui code pour une des enzymes de la famille des semicarbazide amine oxydase qui convertissent les amines en aldéhydes apoptogéniques comme le HNE et le MDA. Enfin, le traitement par DIMATE mène à la surexpression du gène HSPA6 et à la sous expression des gènes HSP90 et WTAP. HSP90 gouverne la molécule chaperonne Hsp90 qui permet le maintien de proto-oncogènes comme WTAP. La production de Hsp90 augmente en cas de stress oxydatif et est indispensable à la prolifération et à la survie des cellules cancéreuses. Une surexpression de HSP90 entraîne une sous expression de HSPA6, et inversement. HSP90 est donc régulé proportionnellement à WTAP et inversement proportionnel à HSPA6 (Wong & Jay, 2016). Cette signature transcriptomique a été validée en RT-qPCR sur 6 gènes d'intérêts (données non montrées).

III-Perspectives thérapeutiques

L'ensemble des résultats obtenus, *in vivo* et *in vitro*, ont permis de mettre en évidence une toxicité sélective du DIMATE sur les cellules leucémiques humaines, qu'il s'agisse de cellules de lignées ou de CSL. Par ailleurs, le DIMATE, aux doses efficaces anti-leucémiques, présente une innocuité sur les CSH saines. Ces résultats innovants et encourageants vont servir de support conceptuel à de prochains essais cliniques. D'une part, un essai clinique de phase I-II à l'horizon 2018 chez les patients porteurs de LAM en rechute et/ou réfractaire (hors LAM de bon pronostic), ainsi que le projet SEFALDIN qui consisterait à une éradication concomitante *ex vivo* et *in vivo* des CSL résiduelles dans un contexte de greffe de cellules souches autologues (**Figure 16**).

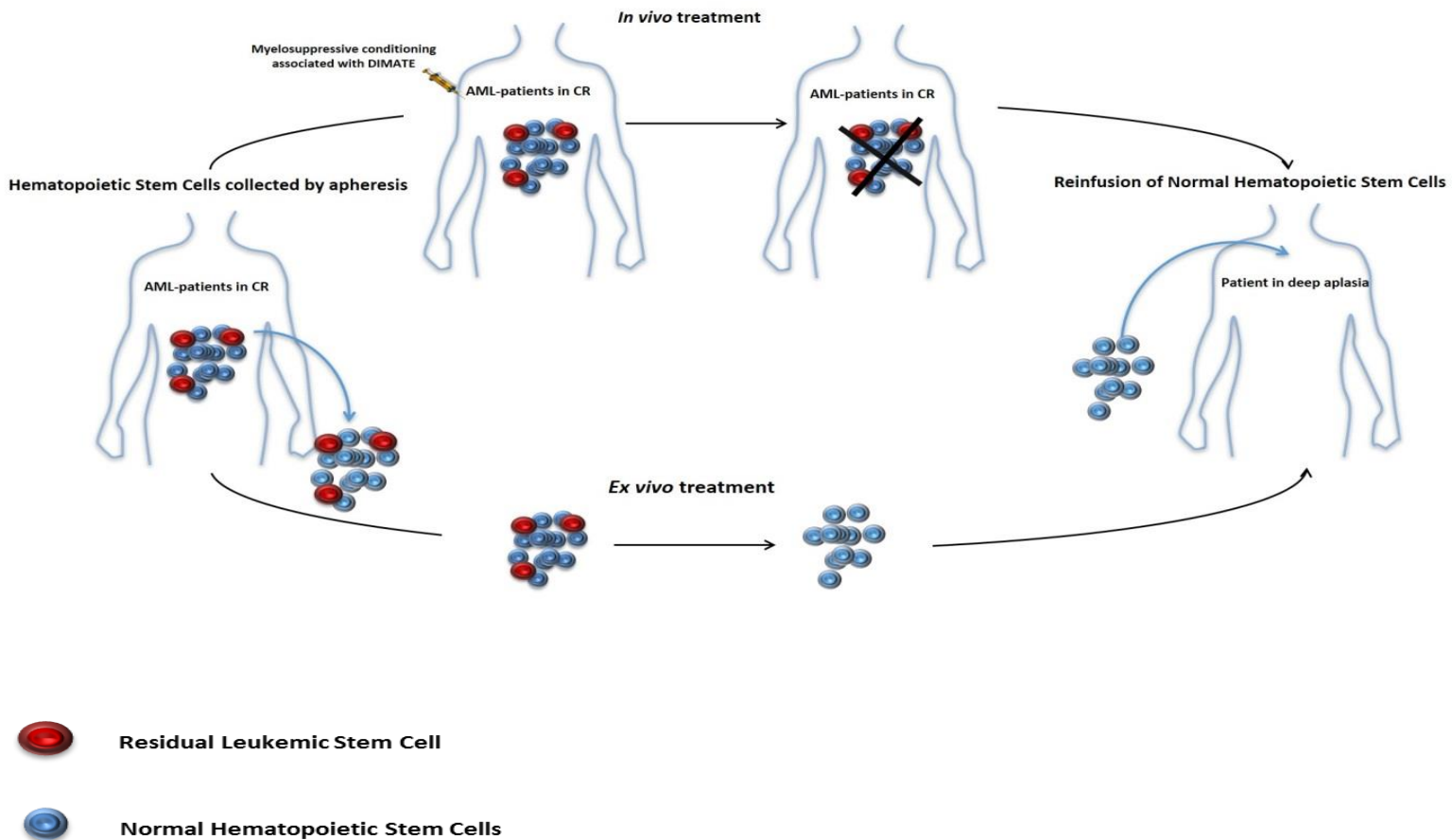


Figure 16 : Projet SEFALDIN

Il s'agit en réalité d'une autogreffe de CSH à conditionnement alternatif avec un greffon purgé de ses CSL résiduelles. L'autogreffe standard présente encore quelques indications dans les LAM (cf. revue EMC revue, Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques). Cependant, cette procédure reste d'utilisation très limitée pour plusieurs raisons, comme la contamination du greffon par des CSL résiduelles, la persistance de CSL chez le patient ou l'absence de procédure efficace et sans danger de purge des greffons (Wang *et al*, 2010). Enfin, contrairement à la greffe allogénique de CSH, dans les autogreffes de CSH, il n'y pas d'effet immunologique anti-tumorale rémanent. L'approche originale proposée par le projet SEFALDIN permet, en théorie, de surmonter ces écueils. Néanmoins, de nombreuses expérimentations *in vitro* et *in vivo* devront être menées afin de multiplier les preuves de concept du projet SEFALDIN et sécuriser la procédure avant le passage chez l'homme, car de nombreuses questions restent en suspens. Il est important de rappeler que l'ALDH1 joue un rôle important dans la différenciation cellulaire, notamment celle des CSH (Chute *et al*, 2006). On peut donc, par exemple, légitimement se demander si les CSH saines traitées par le DIMATE conservent leurs capacités d'autorenouveau et de différenciation après traitement ? Il semblerait que ce soit le cas comme l'attestent nos expérimentations de CFU (Colony Forming Unit). Des CSH saines (CD34+CD38-) ont été traitées pendant 48 heures avec du DIMATE à différentes concentrations. Puis ces dernières ont été lavées, et les tests de clonogénicité ont été réalisés. Deux semaines après le traitement par DIMATE, les capacités d'autorenouveau et de différenciation des CSH traitées ont été vérifiées, mais également leurs capacités à reconstituer le tissu hématopoïétique dans son entièreté. Comme présenté par la **Figure 17**, jusqu'à $7,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ de DIMATE, il n'y a pas de différence significative entre les CFU traités et non traités. Entre $7,5 \mu\text{mol.L}^{-1}$ et $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$ une diminution significative est observée sur les colonies CFU-E et CFU-GEMM ($p < 0,05$). Au-delà de $10 \mu\text{mol.L}^{-1}$, une

diminution drastique et significative est observée sur tous les colonies ($p < 0,01$). Plus aucune colonie n'est observée au-delà de $15 \mu\text{mol.L}^{-1}$.

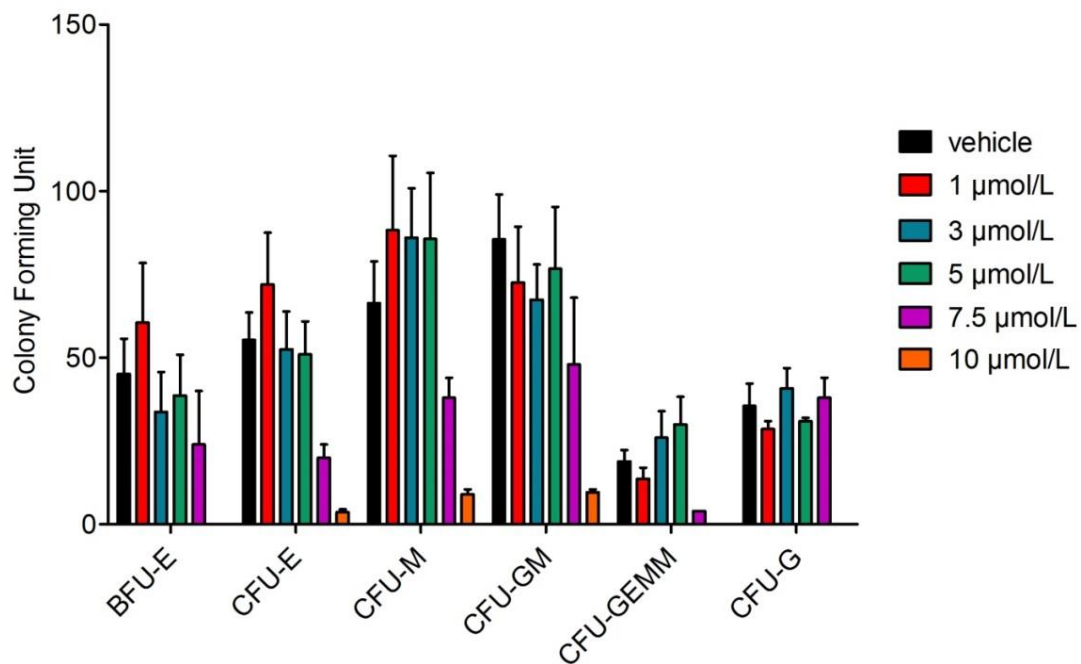


Figure 17 : Evaluation du potentiel clonogénique des cellules hématopoïétiques saines après 48 heures de traitement par différentes concentrations de DIMATE

Par ailleurs, on peut également se demander si le DIMATE ne voit pas son champ d'efficacité limité aux cellules tumorales ALDH+. Réciproquement, on peut se demander si une activité ALDH importante au sein d'une population tumorale donnée constitue un biomarqueur robuste et prédictif de la réponse au DIMATE. Comme le montre la **Figure 18**, l'activité ALDH semble être un bon biomarqueur prédictif de la réponse thérapeutique au DIMATE, bien que celui-ci soit loin d'être parfait. En effet, 65,81% des lignées tumorales avec une

activité ALDH élevée (> 5000 RFU (Relative Fluorescence Unit)) s'avèrent être sensibles au DIMATE (c'est-à-dire avec une $IC_{50} < 20 \mu\text{mol.L}^{-1}$). Réciproquement, 11,98% des lignées tumorales avec une haute activité ALDH sont résistantes au DIMATE. Parmi les 22,21 % de lignées tumorales avec une faible activité ALDH, 14,81 % s'avèrent sensibles au DIMATE et 7,40% y sont résistantes. De nouveaux biomarqueurs sont en cours de développement afin de pouvoir prédire plus précisément la sensibilité des différentes lignées tumorales au DIMATE.

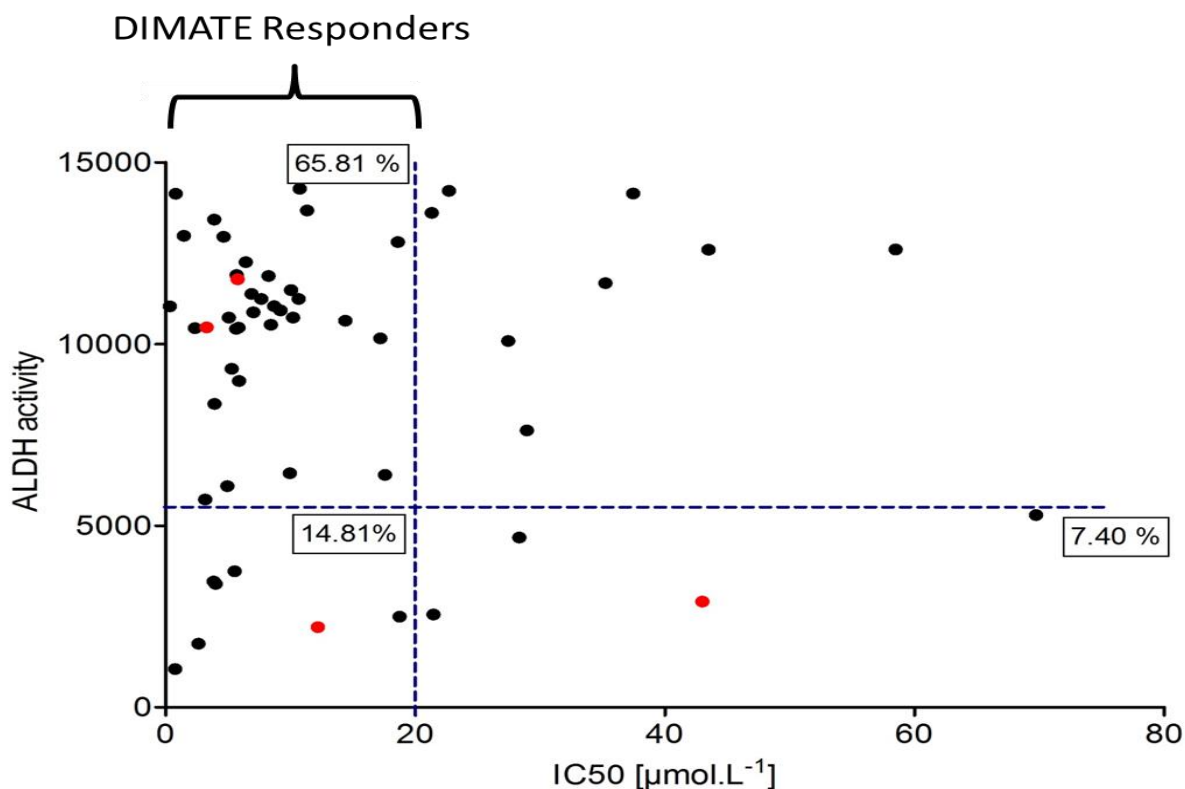


Figure 18 : Corrélation entre l'activité ALDH (en RFU) et la sensibilité au DIMATE. Les points rouges correspondent à des lignées hématopoïétiques

IV-Conclusions de la Partie 1

Malgré un taux de rémission complète moyen d'environ 70% avec les traitements conventionnels, la survie moyenne des patients porteurs d'une LAM n'excède pas les 50% à 5 ans (tous groupes pronostics confondus). De nouveaux traitements et de nouvelles approches thérapeutiques sont plus qu'urgentes et nécessaires. Le DIMATE, un inhibiteur des ALDH 1 et 3 semble être un médicament d'avenir. Le DIMATE présente une toxicité majeure sur plusieurs lignées leucémiques humaines et sur des CSL issues de patients. De manière remarquable, le DIMATE à ces doses anti-leucémiques présente une innocuité quasi-totale sur les CSH saines. *In vivo*, chez la souris, le DIMATE permet d'éradiquer spécifiquement les cellules leucémiques humaines xéno greffées et présente en monothérapie une efficacité similaire à l'association Ara-C + DNR qui constitue le standard thérapeutique actuel. Ces résultats encourageant vont servir de support conceptuel à la mise en place prochaine d'essais cliniques.

Publication de référence PARTIE 1

Partie 2, Approche Immunologique :
Analyse Transcriptomique des Cellules
Natural Killer chez les patients atteints
de Leucémies Aigues Myéloïdes

Partie 2, Approche Immunologique : Analyse Transcriptomique des Cellules Natural Killer dans les Hémopathies Myéloïdes

I-Introduction : Cellules Natural Killer et Hémopathies Malignes

Les cellules Natural Killer (NK) jouent un rôle central dans l'immunité innée, en particulier en ce qui concerne la surveillance et le contrôle des processus néoplasiques, notamment hématologiques (Vivier *et al*, 2008) (Vivier *et al*, 2011). Le rôle des cellules NK dans l'élimination des cellules leucémiques résiduelles a été démontré dans le cadre des greffes allogéniques de CSH, puisqu'une meilleure prise de greffe et un taux de rechute plus faible a été observé lorsque les cellules NK du donneur présentaient des récepteurs inhibiteurs (récepteurs KIR) incompatibles avec les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) du receveur (KIR-mismatch) (Ruggeri *et al*, 2008). L'activation des cellules NK et l'élimination des cellules cibles par ces dernières, reposent sur un équilibre fin entre les signaux activateurs et inhibiteurs en provenance de récepteurs membranaires qui vont soit entraver soit augmenter l'activité cytotoxique de la cellule NK (Costello *et al*, 1999) (**Figure 19**).

Les signaux inhibiteurs proviennent de l'interaction entre, d'une part les récepteurs inhibiteurs spécifiques des CMH comme les récepteurs inhibiteurs KIR (Killer immunoglobulin-like

récepteur), NKG2A (NK groupe protéine 2A) ou ILT-2 (Immunoglobulin-like transcript 2) et d'autre part les molécules du CMH de classe I. Toute cellule n'exprimant pas, ou anormalement, le CMH de classe I, n'est plus en mesure d'engager les récepteurs inhibiteurs de la cellule NK et devient donc une cible de cette dernière (Ljunggren & Kärre, 1990). A noter que la down-régulation des molécules du CMH I est une stratégie courante d'échappement au système immunitaire utilisée par les tumorales pour ne pas être reconnues par les TCR (T-cell receptor) des lymphocytes T (Garrido *et al*, 1995).

L'activation de la cellule NK, consécutive à l'absence de molécule du CMH I à la surface des cellules cibles, peut être renforcée par la présence de molécules co-activatrices et/ou de ligands des récepteurs activateurs des cellules NK à la surface de ces mêmes cellules cibles. Les NCRs ((Natural Cytotoxicity Receptor) à savoir NKp46/NCR1, NKp44/NCR 2 et NKp30/NCR3), NKG2D, DNAM-1 et aussi les corécepteurs tels que 2B4/CD244 ou NTBA jouent un rôle central dans l'activation des cellules NK (Moretta *et al*, 2000).

Une fois activée, la cellule NK éradique la cellule tumorale cible, préalablement opsonisée par des IgG, par toxicité cellulaire dépendante des anticorps (ADCC) via son récepteur CD16 (FcRIIIA). Plus précisément, c'est une activation de la voie de signalisation Fas/Fas-L et la synthèse de granules cytotoxiques (perforines / granzymes) qui va aboutir à la destruction de la cellule cible (Vivier *et al*, 2008) (Campbell & Hasegawa, 2013).

Un déficit de la cytotoxicité des cellules NK a été décrit dans de nombreuses hémopathies malignes (Baier *et al*, 2013) (Costello *et al*, 2002) (Sanchez *et al*, 2011) (Costello *et al*, 2004) (Rey *et al*, 2009). De manière intéressante, les cellules tumorales dans ces pathologies développent de nombreuses stratégies pour échapper au contrôle immun et entraver le pouvoir cytotoxique des cellules NK (Costello *et al*, 1999).

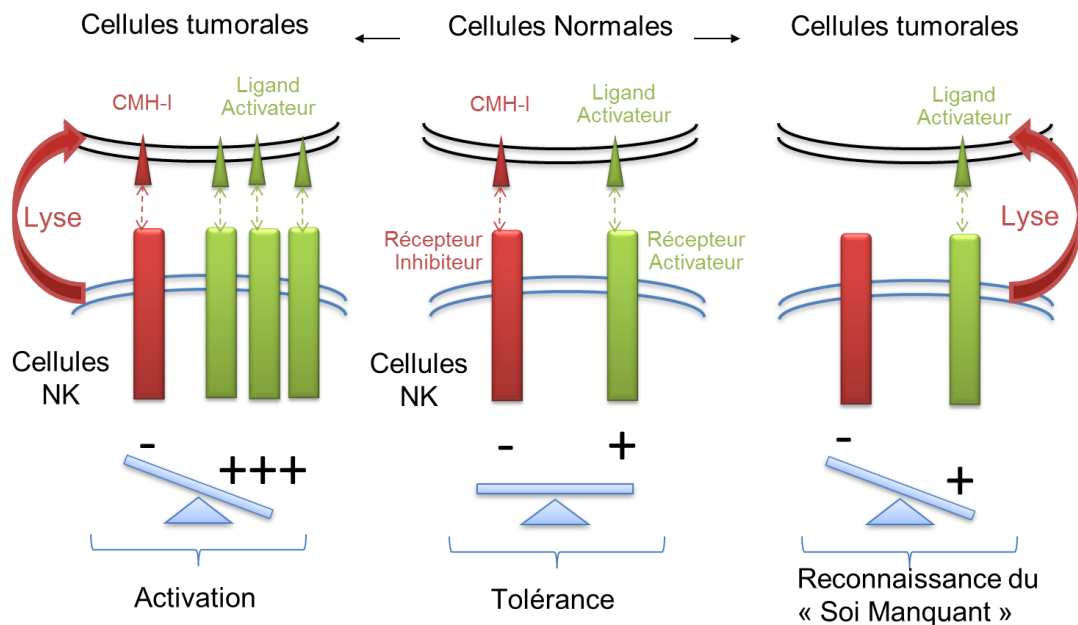


Figure 19 : Engagement des différents récepteurs activateurs ou inhibiteurs et activation de la cellule NK

II- Analyse transcriptomique des cellules Natural Killer chez les patients atteints de Leucémies Aigues Myéloïdes

Ce chapitre II propose un résumé de l'article «Natural killer cells in Acute Myeloid Leukemia Patients: From Phenotype to Transcriptomic Analysis ». Cet article est disponible dans son entièreté (Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion) dans la rubrique « Publication de référence de la partie 2 ».

Résumé de l'article «Natural killer cells in Acute Myeloid Leukemia Patients: From Phenotype to Transcriptomic Analysis »

Les chimiothérapies conventionnelles permettent l'obtention d'une rémission complète chez les patients porteurs d'une leucémie aigüe myéloïde (LAM) dans près de 65% des cas. Cependant la rechute est fréquente et la survie à 5 ans ne dépasse pas les 50%. Cela suggère la persistance de cellules leucémiques résiduelles à la fois résistantes à la chimiothérapie et capables d'échapper au système immunitaire. Les cellules Natural Killer (NK) des patients porteurs de LAM (NK-LAM) ont une expression diminuée de leurs NCRs ((Natural Cytotoxicity Receptor) à savoir NKp46/NCR1, NKp44/NCR 2 et NKp30/NCR3) comparativement aux cellules NK de donneurs sains (NK-DS). Les gènes codant pour NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 et NCR3/NKp30 sont localisés sur des loci et deux chromosomes différents. Pourtant leur régulation est finement coordonnée. Une cellule NK exprime dans la grande majorité des cas soit un niveau élevé (NCR^{bright}) ou un bas niveau (NCR^{dull}) d'expression de ces trois NCR de manière homogène. Cela suggère l'existence de facteurs de régulation positifs ou négatifs communs. Afin d'identifier des voies de signalisation ou des facteurs de transcription commun aux trois NCRs, nous avons réalisé une étude transcriptomique comparative entre des NK-LAM et NK-DS, avant et après expansion *in vitro*. L'analyse microarrays a permis de mettre en évidence une signature transcriptomique spécifique des cellules NK chez les patients LAM. L'expansion *in vitro* des cellules NK-LAM permet d'écraser cette signature et de up-réguler l'expression de molécules fondamentales impliquées dans la cytotoxicité des cellules NK comme les NCRs, NKG2D ou bien encore ETS-1. ETS-1 apparait en effet comme un facteur de transcription intéressant et un bon candidat pour expliquer la régulation coordonnée des trois NCRs, puisqu'il fixe une région spécifique et commune des promoteurs des trois NCRs. Ces résultats sont encourageants

quant à notre capacité à restaurer *in vitro* les fonctions cytotoxiques des NK-LAM et nous fournit une nouvelle preuve de concept pour supporter des thérapies cellulaires innovantes basées sur l'expansion *in vitro* des cellules NK et leurs réinjections chez les patients porteurs de LAM.

III-Conclusion de la Partie 2

Les cellules NK jouent un rôle majeur dans la surveillance immunitaire des cellules cancéreuses, notamment celles issues du tissu hématopoïétique. Dans les hémopathies malignes, les cellules cancéreuses mettent d'ailleurs fréquemment en place des stratégies d'échappement aux cellules NK. Le rôle des cellules NK dans les LAM est désormais bien connu et la bibliographie est très riche à ce sujet. Les cellules NK des patients LAM présentent notamment une down régulation membranaire de leurs NCRs. A travers nos travaux nous avons soulevé deux points inédits et importants. Tout d'abord, nous avons mis en évidence une signature transcriptomique spécifique des cellules NK chez les patients atteints par une LAM. Après une expansion *in vivo* de ces cellules NK provenant de ces patients leucémiques, cette signature transcriptomique est complètement écrasée et laisse place à la surexpression de molécules fondamentales impliquées dans la cytotoxicité des cellules NK comme les NCRs, NKG2D ou bien encore ETS-1. Ces résultats sont encourageants quant à notre capacité à restaurer *in vitro* les fonctions cytotoxiques des NK-LAM et nous fournit une nouvelle preuve de concept pour supporter des thérapies cellulaires innovantes basées sur l'expansion *in vitro* des cellules NK et leurs réinjections chez les patients porteurs de LAM. Le deuxième et dernier point important de ces travaux concerne le facteur de transcription ETS-1. ETS-1 fixe spécifiquement une zone commune des promoteurs des gènes des trois NCRs pourtant situés

sur des loci et des chromosomes différents, faisant d'ETS-1 un candidat sérieux pour expliquer la co-régulation si fine des NCRs.

Publication de référence PARTIE 2

Partie 3, Approche Pharmacogénomique
Fondamentale de la diminution de la
morbidité et de la mortalité liée aux
traitements : Exemple de l'étude de la
Cytidine Désaminase

Partie 3, Approche Pharmacogénomique Fondamentale de la diminution de la morbidité et de la mortalité liée aux traitements : Exemple de l'étude de la Cytidine Désaminase

I-Introduction : Leucémies Aigües Myéloïdes, Cytidine Deaminase et Cytarabine

La Cytarabine (Ara-C) est un antimétabolite de la famille des analogues nucléosidiques, qui est principalement indiqué dans le traitement de la Leucémie Aigue Myéloïde (LAM). Afin d'optimiser la balance efficacité/toxicité, différentes modalités d'administration de cette drogue ont été proposées, sans qu'aucune d'entre elles ne fassent consensus (Momparker, 2013) (Schiffer, 2014). L'utilisation de l'Ara-C dans la prise en charge des LAM repose sur une phase d'induction (100 à 200mg/m²/jours pendant 7 jours) suivie d'une phase de consolidation (1 à 3 g/m² toutes les 12 heures pendant 4 jours). Les doses sont usuellement réduites chez le patient âgé de plus de 65 ans. A l'heure actuelle, des essais cliniques sont toujours en cours pour identifier des schémas alternatifs (comme l'essai BIG-1 par exemple) afin d'obtenir une meilleur tolérance au traitement tout en conservant une efficacité maximale. Ceci démontre une nouvelle fois que les questions sur les modalités d'administration de l'Ara-C ne sont toujours par réglées.

Comme tous les antimétabolites, l'Ara-C présente un index thérapeutique étroit et sa pharmacocinétique est affectée par les polymorphismes génétiques importants touchant le

gène codant pour la Cytidine Déaminase (CDA), l'enzyme responsable de sa détoxification hépatique (Serdjebi *et al*, 2015). Plusieurs publications sur d'autres analogues nucléosidiques (gemcitabine, capécitabine) ont déjà démontré comment le statut CDA pouvait impacter la tolérance et l'efficacité de ces chimiothérapies (Serdjebi *et al*, 2015). Par ailleurs plusieurs case-report d'oncologie pédiatrique ont souligné comment un déficit en CDA prédisposait aux surtoxicités chimio-induites chez les enfants (Serdjebi *et al*, 2014). Des études plus poussées et de plus larges cohortes seront néanmoins nécessaires afin de pouvoir effectivement considérer le déficit en CDA comme un biomarqueur robuste du risque de toxicités majeures induites par les analogues nucléosidiques.

II- Leucémies Aigües Myéloïdes, Cytidine Deaminase et Azacytidine

Ce chapitre II propose un résumé de l'article «Yin and yang of cytidine deaminase roles in clinical response to azacitidine in the elderly: a pharmacogenetics tale ». Cet article est disponible dans son entièreté (Introduction, Matériels et Méthodes, Résultats et Discussion) dans la rubrique publication de référence de la partie 3.

Résumé de l'article “Yin and yang of cytidine deaminase roles in clinical response to azacitidine in the elderly: a pharmacogenetics tale”

L'azacytidine est un analogue nucléosidique utilisé classiquement comme agent déméthylant dans le traitement des patients atteints d'un syndrome myélodysplasique (SMD) non éligible à la greffe allogénique de cellules souches hématopoïétiques. Par ailleurs, l'azacytidine est

utilisée depuis quelques années pour traiter les patients âgés ou considérés comme « fragiles » atteints d'une Leucémie Aigüe Myéloïde (LAM). L'azacytidine est métabolisée, comme tous les analogues nucléosidiques, par la cytidine déaminase (CDA), enzyme codée par un gène présentant de nombreux polymorphismes. Nous présentons ici les cas cliniques de deux patients avec une évolution clinique complètement opposée après un traitement par azacytidine. Le premier patient, traité pour une LAM, a présenté suite à son traitement des toxicités hématologiques et digestives de grade IV mettant en jeu son pronostic vital, avec notamment une agranulocytose de plus de 30 jours réfractaire aux G-CSF. Néanmoins, après seulement un cycle d'azacytidine le patient a été mis en rémission complète de sa LAM. Des investigations génétiques plus poussées ont mis en évidence que ce patient était homozygote pour le polymorphisme 79A>C (rs2072671) du gène de la CDA. Ce génotype étant associé à un phénotype déficient en CDA, confirmé chez ce patient par analyse spectrophotométrique. Le deuxième patient, traité pour un SMD, n'a jamais présenté de réponse thérapeutique satisfaisante bien que ce dernier ait complété ses six cycles d'azacytidine. En revanche, ce patient a présenté un profil de tolérance excellent tout au long de son traitement. Ce patient présentait une activité CDA 194% au-dessus de la valeur moyenne habituellement retenue. L'analyse génétique a permis de mettre en évidence chez ce patient le polymorphisme -31delC (délétion) (rs3215400) associé à un phénotype d'hyperactivité CDA. Chez ces deux patients, traités par azacytidine, l'efficacité thérapeutique mais également le profil de tolérance clinique ont été diamétralement opposés. Ces constatations cliniques peuvent être corrélées au phénotype CDA de ces deux patients, et par extension aux polymorphismes qui en sont à l'origine. Tout comme pour la cytarabine, cette étude de cas, nous amène à considérer le statut CDA (phénotype/génotype) des patients, avant et pendant le traitement, comme un potentiel biomarqueur, prédictif du devenir clinique à court terme des patients traités par azacytidine.

III-Conclusion de la Partie 3

L'Ara-C est un traitement de référence des LAM. Comme tous les autres analogues nucléosidiques, elle est métabolisée par la cytidine déaminase (CDA) enzyme responsable de sa détoxification hépatique. Le gène de CDA présente de nombreux polymorphismes certains pouvant aboutir à des phénotypes déficitaires en CDA ou au contraire à une hyper activité de la CDA. Cette grande discordance peut expliquer la variabilité extrême des profils de réponse anti-tumorale et de tolérance à l'Ara-C rencontrée chez les patients atteints de LAM. A travers un double case report, nous avons également mis en évidence que cette dualité devrait probablement exister aussi chez des patients traités par azcitidine, un autre inhibiteur nucléosidique, utilisé comme agent déméthylant dans les syndromes myélodysplasiques (SMD) et les LAM du sujet âgé et/ou fragile. Cependant des études sur des cohortes plus larges sont en cours, aussi bien chez les patients LAM ou SMD afin de confirmer la significativité de ces tendances.

Publication de référence PARTIE 3

Conclusion générale

Conclusion générale

Cette thèse s'inscrit dans une démarche de recherche translationnelle, entre la médecine clinique et la recherche fondamentale en oncohématologie. Au cours de ces trente mois de thèse, mon travail s'est essentiellement concentré sur l'évaluation du Dimethyl Ampal Thiolester (DIMATE), un inhibiteur des aldéhydes déshydrogénases de type 1 et 3, comme traitement innovant dans leucémies aiguës myéloïdes (LAM). Ces travaux précliniques d'évaluation ont été menés en collaboration avec la société Advanced Biodesign qui a contribué au développement de cette molécule. La thérapeutique des LAM demeure au quotidien un problème clinique difficile. En effet, malgré un taux de rémission complète moyen d'environ 70% avec les traitements conventionnels, la survie moyenne des patients porteurs d'une LAM n'excède pas les 50% à 5 ans (tous groupes pronostiques confondus). De nouveaux traitements et de nouvelles approches thérapeutiques sont nécessaires, et à ce titre le DIMATE semble avoir un potentiel intéressant. Le DIMATE présente une efficacité majeure sur plusieurs lignées leucémiques humaines et sur des cellules souches leucémiques issues de patients, mais une innocuité quasi-totale sur les cellules souches hématopoïétiques saines. *In vivo*, chez la souris, le DIMATE permet d'éradiquer spécifiquement les cellules leucémiques humaines xéno greffées et présente, en monothérapie, une efficacité similaire à l'association cytarabine + daunorubicine, le standard thérapeutique actuel. Ces résultats encourageants vont servir de support conceptuel à la mise en place prochaine d'essais cliniques.

Nous avons par ailleurs poursuivi un travail de recherche sur les cellules NK chez les patients atteints de LAM, qui a permis de mettre en évidence une signature transcriptomique spécifique des cellules NK chez les patients atteints de LAM. Cette signature pouvant être « effacée » après expansion *in vitro*. Cela ouvre d'intéressantes perspectives en termes de

thérapies cellulaires. Par ailleurs nous avons identifié le facteur de transcription ETS-1 comme un candidat sérieux pour expliquer la fine co-régulation des récepteurs activateurs des cellules NK, les NCRs ((Natural Cytotoxicity Receptor) à savoir NKp46/NCR1, NKp44/NCR 2 et NKp30/NCR3), dont les gènes sont situés sur des loci et des chromosomes différents. Au titre d'une meilleure compréhension de la résistance des LAM au traitement, la corrélation de certains polymorphismes du gène de la cytidine deaminase (CDA) et la tolérance aux analogues nucléosidiques vient compléter les données précédentes.

Notre travail propose in fine une étude des différentes voies de réflexion permettant d'améliorer le pronostic des LAM, soit en éradiquant plus efficacement les cellules souches leucémiques résiduelles (projet DIMATE), soit en améliorant la réponse innée anti-leucémique (projet NK) ou encore en améliorant l'efficacité et la sécurité des drogues anti-leucémiques (projet CDA), ces différentes pistes étant bien entendu complémentaires.

Listes des publications générales

Listes des publications générales

Acceptées et publiées

Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors. *Venton G, Pérez-Alea M., Baier C., Fournet G., Quash G., Labiad Y., Martin G., Sanderson F., Poullin P., Suchon P., Farnault L., Nguyen C, Brunet C., Ceylan I. and Costello R.*

Natural killer cells in Acute Myeloid Leukemia Patients: From Phenotype Till Transcriptomic Analysis. *Venton.G, Labiad.Y, Colle.J, Fino.A, Afridi.S,Torres.M, Monteuil.S, Loriol.B, Fernandez-Nunez.N, Farnault.L, Suchon.P, Rihet.P, Bergon.A, Nguyen.C, Baier.C and Costello.R*

Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (EMC)

R. Costello, G. Venton, J. Colle, Y. Labiad, P. Poullin

Micafungin as primary antifungal prophylaxis in patients presenting with acute myeloid leukemia. *Venton G, Adam H, Colle J, Labiad Y, Mercier C, Ivanov V, Suchon P, Fanciullino R, Farnault L, Costello R. Med Mal Infect. 2016 Jun;46(4):226-9. doi: 10.1016/j.medmal.2016.03.008. Epub 2016 Apr 25. PMID:27126350*

Yin and yang of cytidine deaminase roles in clinical response to azacitidine in the elderly: a pharmacogenetics tale. *Fanciullino R, Mercier C, Serdjabi C, Venton G, Colle J, Fina F, Ouafik L, Lacarelle B, Ciccolini J, Costello R. Pharmacogenomics. 2015 Nov;16(17):1907-12. doi: 10.2217/pgs.15.135. Epub 2015 Nov 10. PMID: 26556583*

Natural killer cells in patients with polycythemia vera. *Sanchez C, Baier C, Colle JG, Chelbi R, Rihet P, Le Treut T, Imbert J, Sébahoun G, Venton G, Costello RT.*

En cours de préparation

Aldehyde dehydrogenases inhibition as unconventional therapeutic approach in acute myeloid leukemia: from the biological rational to the transcriptomic analysis *Venton G, Labiad Y, Martin G, Pérez-Alea M, Quash G, Fournet G, Torres M, Bergon A, Baier C, Ceylan I and Costello R*

SIRS and SEPSIS following autologous hematopoietic stem cell transplantation: a predictive transcriptomic signature Labiad.Y, [Venton.G](#), Baier.C, Colle.J, Farnault.L, Brunet.C, Loriol.B, Fernandez-Nunez.N, Suchon.P, Rihet.P, Nguyen.C and Costello.R

Transcriptomic Signature supports Siltuximab rational in Multiple Myeloma Labiad.Y, [Venton.G](#), Farnault.L, Baier.C, Loriol.B, Fernandez-Nunez.N, Suchon.P, Rihet.P, Nguyen.C and Costello.R

Publications Annexes

Références

Références

- Asai, O., Longo, D.L., Tian, Z.G., Hornung, R.L., Taub, D.D., Ruscetti, F.W. & Murphy, W.J. (1998) Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *The Journal of Clinical Investigation*, **101**, 1835–1842.
- Baier, C., Fino, A., Sanchez, C., Farnault, L., Rihet, P., Kahn-Perlès, B. & Costello, R.T. (2013) Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Frontiers in Immunology*, **4**, 459.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *British Journal of Haematology*, **33**, 451–458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1985) Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Annals of Internal Medicine*, **103**, 620–625.
- Blaise, D., Olive, D., Michallet, M., Marit, G., Leblond, V. & Maraninchi, D. (1995) Impairment of leukaemia-free survival by addition of interleukin-2-receptor antibody to standard graft-versus-host prophylaxis. *Lancet (London, England)*, **345**, 1144–1146.
- Bonnet, D. & Dick, J.E. (1997) Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, **3**, 730–737.
- Brunet, S., Labopin, M., Esteve, J., Cornelissen, J., Socié, G., Iori, A.P., Verdonck, L.F., Volin, L., Gratwohl, A., Sierra, J., Mohty, M. & Rocha, V. (2012) Impact of FLT3 internal tandem duplication on the outcome of related and unrelated hematopoietic transplantation for adult acute myeloid leukemia in first remission: a retrospective analysis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **30**, 735–741.
- Burnett, A.K., Russell, N.H., Hills, R.K., Bowen, D., Kell, J., Knapper, S., Morgan, Y.G., Lok, J., Grech, A., Jones, G., Khwaja, A., Friis, L., McMullin, M.F., Hunter, A., Clark, R.E., Grimwade, D. & UK National Cancer Research Institute Acute Myeloid Leukaemia Working Group (2015) Arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia in all risk groups (AML17): results of a randomised, controlled, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*, **16**, 1295–1305.
- Campbell, K.S. & Hasegawa, J. (2013) Natural killer cell biology: an update and future directions. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, **132**, 536–544.
- Canino, C., Luo, Y., Marcato, P., Blandino, G., Pass, H.I. & Ciocce, M. (2015) A STAT3-NFκB/DDIT3/CEBPβ axis modulates ALDH1A3 expression in chemoresistant cell subpopulations. *Oncotarget*, **6**, 12637–12653.
- Cazzola, M. (2016) Introduction to a review series: the 2016 revision of the WHO classification of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. *Blood*, **127**, 2361–2364.
- Cerami, E., Gao, J., Dogrusoz, U., Gross, B.E., Sumer, S.O., Aksoy, B.A., Jacobsen, A., Byrne, C.J., Heuer, M.L., Larsson, E., Antipin, Y., Reva, B., Goldberg, A.P., Sander, C. & Schultz, N. (2012)

- The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discovery*, **2**, 401–404.
- Chen, J., Odenike, O. & Rowley, J.D. (2010) Leukaemogenesis: more than mutant genes. *Nature Reviews. Cancer*, **10**, 23–36.
- Cheson, B.D., Bennett, J.M., Kopecky, K.J., Büchner, T., Willman, C.L., Estey, E.H., Schiffer, C.A., Doehner, H., Tallman, M.S., Lister, T.A., Lo-Coco, F., Willemze, R., Biondi, A., Hiddemann, W., Larson, R.A., Löwenberg, B., Sanz, M.A., Head, D.R., Ohno, R., Bloomfield, C.D., et al (2003) Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **21**, 4642–4649.
- Chute, J.P., Muramoto, G.G., Whitesides, J., Colvin, M., Safi, R., Chao, N.J. & McDonnell, D.P. (2006) Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 11707–11712.
- Ciurea, S.O., Zhang, M.-J., Bacigalupo, A.A., Bashey, A., Appelbaum, F.R., Aljitawi, O.S., Armand, P., Antin, J.H., Chen, J., Devine, S.M., Fowler, D.H., Luznik, L., Nakamura, R., O'Donnell, P.V., Perales, M.-A., Pingali, S.R., Porter, D.L., Riches, M.R., Ringdén, O.T.H., Rocha, V., et al (2015) Haploidentical transplant with posttransplant cyclophosphamide vs matched unrelated donor transplant for acute myeloid leukemia. *Blood*, **126**, 1033–1040.
- Costello, R., Mallet, F., Chambost, H., Sainy, D., Arnoulet, C., Gastaut, J.A. & Olive, D. (1999a) The immunophenotype of minimally differentiated acute myeloid leukemia (AML-M0): reduced immunogenicity and high frequency of CD34+/CD38- leukemic progenitors. *Leukemia*, **13**, 1513–1518.
- Costello, R.T., Fauriat, C., Sivori, S., Marcenaro, E. & Olive, D. (2004) NK cells: innate immunity against hematological malignancies? *Trends in Immunology*, **25**, 328–333.
- Costello, R.T., Gastaut, J.A. & Olive, D. (1999b) Tumor escape from immune surveillance. *Archivum Immunologiae Et Therapiae Experimentalis*, **47**, 83–88.
- Costello, R.T., Mallet, F., Gaugler, B., Sainy, D., Arnoulet, C., Gastaut, J.-A. & Olive, D. (2000) Human Acute Myeloid Leukemia CD34+/CD38- Progenitor Cells Have Decreased Sensitivity to Chemotherapy and Fas-induced Apoptosis, Reduced Immunogenicity, and Impaired Dendritic Cell Transformation Capacities. *Cancer Research*, **60**, 4403–4411.
- Costello, R.T., Sivori, S., Marcenaro, E., Lafage-Pochitaloff, M., Mozziconacci, M.-J., Reviron, D., Gastaut, J.-A., Pende, D., Olive, D. & Moretta, A. (2002) Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **99**, 3661–3667.
- Crawford, R.R., Prescott, E.T., Sylvester, C.F., Higdon, A.N., Shan, J., Kilberg, M.S. & Mungrue, I.N. (2015) Human CHAC1 Protein Degrades Glutathione, and mRNA Induction Is Regulated by the Transcription Factors ATF4 and ATF3 and a Bipartite ATF/CRE Regulatory Element. *The Journal of Biological Chemistry*, **290**, 15878–15891.
- D'Angelo, R.C. & Wicha, M.S. (2010) Stem cells in normal development and cancer. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, **95**, 113–158.

- Deschler, B. & Lübbert, M. (2006) Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*, **107**, 2099–2107.
- Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Büchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., Lo-Coco, F., Naoe, T., Niederwieser, D., Ossenkoppele, G.J., Sanz, M.A., Sierra, J., Tallman, M.S., Löwenberg, B., Bloomfield, C.D. & European LeukemiaNet (2010) Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*, **115**, 453–474.
- Etchin, J., Montero, J., Berezovskaya, A., Le, B.T., Kentsis, A., Christie, A.L., Conway, A.S., Chen, W.C., Reed, C., Mansour, M.R., Ng, C.E.L., Adamia, S., Rodig, S.J., Galinsky, I.A., Stone, R.M., Klebanov, B., Landesman, Y., Kauffman, M., Shacham, S., Kung, A.L., et al (2016) Activity of a selective inhibitor of nuclear export, selinexor (KPT-330), against AML-initiating cells engrafted into immunosuppressed NSG mice. *Leukemia*, **30**, 0.
- Fournet, G., Martin, G. & Quash, G. (2013) α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Current Medicinal Chemistry*, **20**, 527–533.
- Fröhling, S., Schlenk, R.F., Stolze, I., Bihlmayr, J., Benner, A., Kreitmeier, S., Tobis, K., Döhner, H. & Döhner, K. (2004) CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **22**, 624–633.
- Gal, H., Amariglio, N., Trakhtenbrot, L., Jacob-Hirsh, J., Margalit, O., Avigdor, A., Nagler, A., Tavor, S., Ein-Dor, L., Lapidot, T., Domany, E., Rechavi, G. & Givol, D. (2006) Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia*, **20**, 2147–2154.
- Gale, R.E., Green, C., Allen, C., Mead, A.J., Burnett, A.K., Hills, R.K., Linch, D.C. & Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party (2008) The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*, **111**, 2776–2784.
- Gale, R.P., Horowitz, M.M., Ash, R.C., Champlin, R.E., Goldman, J.M., Rimm, A.A., Ringdén, O., Stone, J.A. & Bortin, M.M. (1994) Identical-twin bone marrow transplants for leukemia. *Annals of Internal Medicine*, **120**, 646–652.
- Gao, J., Aksoy, B.A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S.O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C. & Schultz, N. (2013) Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, **6**, pl1.
- Garrido, F., Cabrera, T., Lopez-Nevot, M.A. & Ruiz-Cabello, F. (1995) HLA class I antigens in human tumors. *Advances in Cancer Research*, **67**, 155–195.
- Gerber, J.M., Smith, B.D., Ngwang, B., Zhang, H., Vala, M.S., Morsberger, L., Galkin, S., Collector, M.I., Perkins, B., Levis, M.J., Griffin, C.A., Sharkis, S.J., Borowitz, M.J., Karp, J.E. & Jones, R.J. (2012) A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38- cells in acute myeloid leukemia. *Blood*, **119**, 3571–3577.
- Grimwade, D., Hills, R.K., Moorman, A.V., Walker, H., Chatters, S., Goldstone, A.H., Wheatley, K., Harrison, C.J., Burnett, A.K. & National Cancer Research Institute Adult Leukaemia Working Group (2010) Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia:

- determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*, **116**, 354–365.
- Gyurkocza, B., Storb, R., Storer, B.E., Chauncey, T.R., Lange, T., Shizuru, J.A., Langston, A.A., Pulsipher, M.A., Bredeson, C.N., Maziarz, R.T., Bruno, B., Petersen, F.B., Maris, M.B., Agura, E., Yeager, A., Bethge, W., Sahebi, F., Appelbaum, F.R., Maloney, D.G. & Sandmaier, B.M. (2010) Nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with acute myeloid leukemia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **28**, 2859–2867.
- Hess, D.A., Meyerrose, T.E., Wirthlin, L., Craft, T.P., Herrbrich, P.E., Creer, M.H. & Nolte, J.A. (2004) Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood*, **104**, 1648–1655.
- Jemal, A., Clegg, L.X., Ward, E., Ries, L.A.G., Wu, X., Jamison, P.M., Wingo, P.A., Howe, H.L., Anderson, R.N. & Edwards, B.K. (2004) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*, **101**, 3–27.
- Jemal, A., Siegel, R., Xu, J. & Ward, E. (2010) Cancer statistics, 2010. *CA: a cancer journal for clinicians*, **60**, 277–300.
- Jiang, Y.Z., Barrett, A.J., Goldman, J.M. & Mavroudis, D.A. (1997) Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Annals of Hematology*, **74**, 1–6.
- Kelly, P.N., Dakic, A., Adams, J.M., Nutt, S.L. & Strasser, A. (2007) Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, **317**, 337.
- Kern, S.E. & Shibata, D. (2007) The fuzzy math of solid tumor stem cells: a perspective. *Cancer Research*, **67**, 8985–8988.
- Khoury, I.F., Keating, M., Körbling, M., Przepiorka, D., Anderlini, P., O'Brien, S., Giral, S., Ippoliti, C., von Wolff, B., Gajewski, J., Donato, M., Claxton, D., Ueno, N., Andersson, B., Gee, A. & Champlin, R. (1998) Transplant-lite: induction of graft-versus-malignancy using fludarabine-based nonablative chemotherapy and allogeneic blood progenitor-cell transplantation as treatment for lymphoid malignancies. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **16**, 2817–2824.
- Kode, A., Manavalan, J.S., Mosialou, I., Bhagat, G., Rathinam, C.V., Luo, N., Khiabani, H., Lee, A., Murty, V.V., Friedman, R., Brum, A., Park, D., Galili, N., Mukherjee, S., Teruya-Feldstein, J., Raza, A., Rabadan, R., Berman, E. & Kousteni, S. (2014) Leukaemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature*, **506**, 240–244.
- Lavigne, P. & Acres, S. (1989) Advisory Committee on Epidemiology. Resolutions. *Canada Diseases Weekly Report = Rapport Hebdomadaire Des Maladies Au Canada*, **15**, 127–129.
- Lechman, E.R., Gentner, B., Ng, S.W.K., Schoof, E.M., van Galen, P., Kennedy, J.A., Nucera, S., Ciceri, F., Kaufmann, K.B., Takayama, N., Dobson, S.M., Trotman-Grant, A., Krivdova, G., Elzinga, J., Mitchell, A., Nilsson, B., Hermans, K.G., Eppert, K., Marke, R., Isserlin, R., et al (2016) miR-126 Regulates Distinct Self-Renewal Outcomes in Normal and Malignant Hematopoietic Stem Cells. *Cancer Cell*.

- Ljunggren, H.G. & Kärre, K. (1990) In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology Today*, **11**, 237–244.
- Ma, I. & Allan, A.L. (2011) The role of human aldehyde dehydrogenase in normal and cancer stem cells. *Stem Cell Reviews*, **7**, 292–306.
- Maraninchi, D., Gluckman, E., Blaise, D., Guyotat, D., Rio, B., Pico, J.L., Leblond, V., Michallet, M., Dreyfus, F. & Ifrah, N. (1987) Impact of T-cell depletion on outcome of allogeneic bone-marrow transplantation for standard-risk leukaemias. *Lancet (London, England)*, **2**, 175–178.
- Momparler, R.L. (2013) Optimization of cytarabine (ARA-C) therapy for acute myeloid leukemia. *Experimental Hematology & Oncology*, **2**, 20.
- Moreb, J.S. (2008) Aldehyde dehydrogenase as a marker for stem cells. *Current Stem Cell Research & Therapy*, **3**, 237–246.
- Moretta, A., Biassoni, R., Bottino, C., Mingari, M.C. & Moretta, L. (2000) Natural cytotoxicity receptors that trigger human NK-cell-mediated cytotoxicity. *Immunology Today*, **21**, 228–234.
- Orozco, J.J. & Appelbaum, F.R. (2012) Unfavorable, complex, and monosomal karyotypes: the most challenging forms of acute myeloid leukemia. *Oncology (Williston Park, N.Y.)*, **26**, 706–712.
- Passegué, E., Jamieson, C.H.M., Ailles, L.E. & Weissman, I.L. (2003) Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100 Suppl 1**, 11842–11849.
- Pedersen-Bjergaard, J., Andersen, M.K., Andersen, M.T. & Christiansen, D.H. (2008) Genetics of therapy-related myelodysplasia and acute myeloid leukemia. *Leukemia*, **22**, 240–248.
- Prost, S., Relouzat, F., Spentchian, M., Ouzegdouh, Y., Saliba, J., Massonnet, G., Beressi, J.-P., Verhoeyen, E., Raggiueneau, V., Maneglier, B., Castaigne, S., Chomienne, C., Chrétien, S., Rousset, P. & Leboulch, P. (2015) Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature*, **525**, 380–383.
- Quash, G., Fournet, G., Courvoisier, C., Martinez, R.M., Chantepie, J., Paret, M.J., Pharaboz, J., Joly-Pharaboz, M.O., Goré, J., André, J. & Reichert, U. (2008) Aldehyde dehydrogenase inhibitors: alpha,beta-acetylenic N-substituted aminothiolesters are reversible growth inhibitors of normal epithelial but irreversible apoptogens for cancer epithelial cells from human prostate in culture. *European Journal of Medicinal Chemistry*, **43**, 906–916.
- Raaijmakers, M.H.G.P., Mukherjee, S., Guo, S., Zhang, S., Kobayashi, T., Schoonmaker, J.A., Ebert, B.L., Al-Shahrour, F., Hasserjian, R.P., Scadden, E.O., Aung, Z., Matza, M., Merckenschlager, M., Lin, C., Rommens, J.M. & Scadden, D.T. (2010) Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature*, **464**, 852–857.
- Rey, J., Veuillen, C., Vey, N., Bouabdallah, R. & Olive, D. (2009) Natural killer and gammadelta T cells in haematological malignancies: enhancing the immune effectors. *Trends in Molecular Medicine*, **15**, 275–284.
- Roch, A.M., Quash, G., Michal, Y., Chantepie, J., Chantegrel, B., Deshayes, C., Doutheau, A. & Marvel, J. (1996) Altered methional homeostasis is associated with decreased apoptosis in BAF3 bcl2 murine lymphoid cells. *The Biochemical Journal*, **313 (Pt 3)**, 973–981.

- Ruggeri, L., Mancusi, A., Burchielli, E., Capanni, M., Carotti, A., Aloisi, T., Aversa, F., Martelli, M.F. & Velardi, A. (2008) NK cell alloreactivity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood Cells, Molecules & Diseases*, **40**, 84–90.
- Sabattini, E., Bacci, F., Sagrasso, C. & Pileri, S.A. (2010) WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues in 2008: an overview. *Pathologica*, **102**, 83–87.
- Sanchez, C.J., Le Treut, T., Boehrer, A., Knoblauch, B., Imbert, J., Olive, D. & Costello, R.T. (2011) Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer immunology, immunotherapy: CII*, **60**, 1–13.
- Schiffer, C.A. (2014) Optimal dose and schedule of consolidation in AML: is there a standard? *Best Practice & Research. Clinical Haematology*, **27**, 259–264.
- Schinke, C., Giricz, O., Li, W., Shastri, A., Gordon, S., Barreyro, L., Barreryo, L., Bhagat, T., Bhattacharyya, S., Ramachandra, N., Bartenstein, M., Pellagatti, A., Boulwood, J., Wickrema, A., Yu, Y., Will, B., Wei, S., Steidl, U. & Verma, A. (2015) IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. *Blood*, **125**, 3144–3152.
- Serdjebi, C., Ciccolini, J., Fina, F., Delarue, A., Verschuur, A., Lacarelle, B., Ouafik, L. & André, N. (2014) Recipient/donor contradictory genotypes with impact on drug pharmacogenetics after liver transplant: a deadly gift? *Pharmacogenetics and Genomics*, **24**, 527–529.
- Serdjebi, C., Milano, G. & Ciccolini, J. (2015) Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, **11**, 665–672.
- So, C.W., Karsunky, H., Passegué, E., Cozzio, A., Weissman, I.L. & Cleary, M.L. (2003) MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell*, **3**, 161–171.
- Spitzer, T.R., McAfee, S., Sackstein, R., Colby, C., Toh, H.C., Multani, P., Saidman, S., Weyouth, D.W., Preffer, F., Poliquin, C., Foley, A., Cox, B., Andrews, D., Sachs, D.H. & Sykes, M. (2000) Intentional induction of mixed chimerism and achievement of antitumor responses after nonmyeloablative conditioning therapy and HLA-matched donor bone marrow transplantation for refractory hematologic malignancies. *Biology of Blood and Marrow Transplantation: Journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, **6**, 309–320.
- Storms, R.W., Trujillo, A.P., Springer, J.B., Shah, L., Colvin, O.M., Ludeman, S.M. & Smith, C. (1999) Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 9118–9123.
- Sullivan, K.M., Shulman, H.M., Storb, R., Weiden, P.L., Witherspoon, R.P., McDonald, G.B., Schubert, M.M., Atkinson, K. & Thomas, E.D. (1981) Chronic graft-versus-host disease in 52 patients: adverse natural course and successful treatment with combination immunosuppression. *Blood*, **57**, 267–276.
- Tauro, S., Craddock, C., Peggs, K., Begum, G., Mahendra, P., Cook, G., Marsh, J., Milligan, D., Goldstone, A., Hunter, A., Khwaja, A., Chopra, R., Littlewood, T., Peniket, A., Parker, A., Jackson, G., Hale, G., Cook, M., Russell, N. & Mackinnon, S. (2005) Allogeneic stem-cell transplantation using a reduced-intensity conditioning regimen has the capacity to produce durable remissions and long-term disease-free survival in patients with high-risk acute











- myeloid leukemia and myelodysplasia. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, **23**, 9387–9393.
- Thiede, C., Steudel, C., Mohr, B., Schaich, M., Schäkel, U., Platzbecker, U., Wermke, M., Bornhäuser, M., Ritter, M., Neubauer, A., Ehninger, G. & Illmer, T. (2002) Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*, **99**, 4326–4335.
- Vardiman, J.W. (2010) The World Health Organization (WHO) classification of tumors of the hematopoietic and lymphoid tissues: an overview with emphasis on the myeloid neoplasms. *Chemico-Biological Interactions*, **184**, 16–20.
- Vivier, E., Raulet, D.H., Moretta, A., Caligiuri, M.A., Zitvogel, L., Lanier, L.L., Yokoyama, W.M. & Ugolini, S. (2011) Innate or adaptive immunity? The example of natural killer cells. *Science (New York, N.Y.)*, **331**, 44–49.
- Vivier, E., Tomasello, E., Baratin, M., Walzer, T. & Ugolini, S. (2008) Functions of natural killer cells. *Nature Immunology*, **9**, 503–510.
- Wang, J., Ouyang, J., Zhou, R., Chen, B. & Yang, Y. (2010) Autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a meta-analysis of randomized trials. *Acta Haematologica*, **124**, 61–71.
- Wang, L., Zhang, H., Rodriguez, S., Cao, L., Parish, J., Mumaw, C., Zollman, A., Kamoka, M.M., Mu, J., Chen, D.Z., Srour, E.F., Chitteti, B.R., HogenEsch, H., Tu, X., Bellido, T.M., Boswell, H.S., Manshour, T., Verstovsek, S., Yoder, M.C., Kapur, R., et al (2014) Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF-κB-dependent manner. *Cell Stem Cell*, **15**, 51–65.
- Wong, D.S. & Jay, D.G. (2016) Emerging Roles of Extracellular Hsp90 in Cancer. *Advances in Cancer Research*, **129**, 141–163.
- Xiong, Y., Fan, C., Kong, L., Dong, L., Zhu, N., Zhang, J., Wang, L., Qin, T., Shen, Y. & Chen, M. (2013) Annexin II receptor induces apoptosis independent of Annexin II. *Apoptosis: An International Journal on Programmed Cell Death*, **18**, 925–939.
- Yilmaz, O.H., Valdez, R., Theisen, B.K., Guo, W., Ferguson, D.O., Wu, H. & Morrison, S.J. (2006) Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature*, **441**, 475–482.

QUERY FORM

BCJ	
Manuscript ID	16-BCJ-0226T [Art. Id: bcj201678]
Author	
Editor	
Publisher	

Journal: BCJ

Author :- The following queries have arisen during the editing of your manuscript. Please answer queries by making the requisite corrections at the appropriate positions in the text.

Query No.	Description	Author's Response
Q1	Please note that affiliations have been reordered.	
Q2	Please confirm whether the edits made to affiliations are okay.	
Q3	Please provide institutional details in all affiliations except 2 and 6, if applicable.	
Q4	Please confirm that the correspondence address is okay.	
Q5	Please confirm whether the edits made to the sentence 'Moreover, DIMATE is highly active.....' is okay.	
Q6	Please confirm whether the edits made to the sentence 'We used the following leukemic.....' is okay.	
Q7	Please provide the location details (city, state (if USA, Australia or Canada) and country) for 'GE Healthcare'.	
Q8	Please confirm whether the edits made to the sentence 'In contrast, in 14 and 28 mg/kg....' is okay.	
Q9	Please confirm that the edits made to the sentence 'In sharp contrast, we demonstrated.....' is okay..	
Q10	Please provide the citation for 'Figure 3a' in the text.	

ORIGINAL ARTICLE

Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors

G Venton^{1,2,3}, M Pérez-Alea⁴, C Baier^{1,3}, G Fournet⁵, G Quash³, Y Labiad¹, G Martin³, F Sanderson⁶, P Poullin⁶, P Suchon^{7,8}, L Farnault², C Nguyen¹, C Brunet⁹, I Ceylan³ and RT Costello^{1,2}

The vast majority of patients with acute myeloid leukemia (AML) achieve complete remission (CR) after standard induction chemotherapy. However, the majority subsequently relapse and die of the disease. A leukemia stem cell (LSC) paradigm has been invoked to explain this failure of CR to reliably translate into cure. Indeed, LSCs are highly enriched in CD34+CD38⁻ leukemic cells that exhibit positive aldehyde dehydrogenase activity (ALDH+) on flow cytometry, these LSCs are resistant to currently existing treatments in AML such as cytarabine and anthracycline that, at the cost of great toxicity on normal cells, are highly active against the leukemic bulk, but spare the LSCs responsible for relapse. To try to combat the LSC population selectively, a well-characterized ALDH inhibitor by the trivial name of dimethyl ampal thiolester (DIMATE) was assessed on sorted CD34+CD38⁻ subpopulations from AML patients and healthy patients. ALDH activity and cell viability were monitored by flow cytometry. From enzyme kinetic studies DIMATE is an active enzyme-dependent, competitive, irreversible inhibitor of ALDH1. On cells in culture, DIMATE is a powerful inhibitor of ALDHs 1 and 3, has a major cytotoxic activity on human AML cell lines. Moreover, DIMATE is highly active against leukemic populations enriched in LSCs, but, unlike conventional chemotherapy, DIMATE is not toxic for healthy hematopoietic stem cells which retained, after treatment, their self-renewing and multi-lineage differentiation capacity in immunodeficient mice, xenografted with human leukemic cells. DIMATE eradicates specifically human AML cells and spares healthy mouse hematologic cells.

Blood Cancer Journal (2016) 6, eXX; doi:10.1038/bcj.2016.78; published online xx xxx 2016

INTRODUCTION

Acute myeloid leukemia (AML) is the most common acute leukemia in adults, with a median age of 69 years.¹ The vast majority of patients with AML achieve complete remission after standard induction chemotherapy. However, the majority subsequently relapse and die of the disease.^{2–4} A leukemia stem cell (LSC) paradigm may explain this failure of complete remission to reliably translate into cure. LSCs, like normal hematopoietic stem cells (HSCs), have self-renewal capacity and give rise to partially differentiated progeny that composes the bulk of the leukemia, but possesses only limited proliferative potential.⁵ The currently existing treatments in AML, such as cytarabine (ara-C) and anthracycline (for example, daunorubicin), at the cost of a great toxicity, are highly active against the leukemic bulk, but spare the LSCs responsible for relapse.^{6,7} Therefore, AML remains a clinical challenge and new therapies are urgently needed.^{8–10}

Only a rare population of AML cells enriched for LSCs, characterized by a CD34+CD38⁻ phenotype is capable of generating leukemia in immunodeficient mice.¹¹ More recently, evidence has been presented for a clinically relevant population of leukemic cells CD34+CD38⁻ in AML. This leukemic subpopulation, with a positive aldehyde dehydrogenase activity (ALDH+) in flow cytometry has been shown to be highly enriched in LSCs.^{12–14} Interest in ALDH is due to its activity as a marker for identification

of stem cell in different tissues.^{15,16} The different isoforms of ALDHs (ALDH1, 2 and 3) control the levels of three endogenous apoptogenic aldehydes: methional, malondialdehyde (MDA) and 4-hydroxynonenal (HNE). Cancer cells protect themselves from the apoptogenic effect of these aldehydes by the ALDHs that oxidize them to their non-apoptogenic carboxylic acids.¹⁷

Among the family of acetylenic ALDH inhibitors, we identified the dimethyl ampal thiolester (DIMATE), an α,β , acetylenic N-substituted aminothioliol ester, as an interesting candidate for cancer treatment. DIMATE is an active enzyme-dependent, competitive, irreversible inhibitor of ALDHs 1 and 3.^{18,19} It induces apoptosis in the chemoresistant mouse lymphoid cells BAF3bcl2 that are also resistant to disulfiram, a well-characterized inhibitor of ALDH2.²⁰ Moreover, although DIMATE was apoptogenic on cultures of human prostate cancer cells DU145, it was reversibly cytostatic on normal human prostate epithelial cells.¹⁹

On the basis of these preliminary data on ALDH activity in LSC and differential effects between normal and cancer cells, we hypothesized that DIMATE could be a candidate for targeted therapy on LSC while sparing normal hematopoietic progenitors, thus providing an efficient and safe approach for chemotherapy of acute leukemia aiming at the eradication of minimal residual disease.

¹Aix-Marseille Université, INSERM, UMR1090, TAGC Campus, Marseille, France; ²Department of Hematology and Cellular therapy, AP-HM, Conception Hospital, Marseille, France; ³Advanced BioDesign, Lyon, France; ⁴Lab Animal Models and Cancer Laboratory Anatomy Pathology Program, Institut de Recerca Vall d' Hebron, Barcelona, Spain; ⁵Univ Lyon, Université Claude Bernard Lyon 1, ICBMS UMR5246, Villeurbanne, France; ⁶Department of Apheresis and Autotransfusion, APHM, Conception Hospital, Marseille, France; ⁷Hematology laboratory, APHM, Hôpital de la Timone, Marseille, France; ⁸UMR 1062 NORT, INSERM, Marseille, France and ⁹Hematology laboratory, APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France. Correspondence: Professor RT Costello, Service d'Hématologie, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, 147 Boulevard Baïlle, 13005 Marseille, France.

E-mail: regiscostello@tagc@gmail.com

Received 29 July 2016; accepted 4 August 2016

MATERIALS AND METHODS

Patient samples

Peripheral blood samples from 10 patients with AML (Table 1) were collected before leukemia chemotherapy and after informed consent, and were part of the diagnostic procedures. The study was approved by the institutional review board from the Mediterranean V (Ref. 15.013) and Agence Nationale de la Sécurité du Médicament (Ref. 150054B-11). Control non-leukemic HSCs were collected by apheresis from patients ($n=55$) requiring autologous stem cell transplantation for non-myeloid malignancies.

Cell sorting

Peripheral blood mononuclear cells from control donors and leukemic patients were isolated by Ficoll-Hystopaque density gradient centrifugation (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin, France). CD34+ cell sorting was first performed with CD34 MicroBead Kit UltraPure (MACS; Miltenyi Biotec, Paris, France). Then leukemic and healthy CD34+CD38- or CD34+CD38+ subpopulations were obtained by flow cytometry cell sorting using double staining with anti-CD34 (APC MACS; Miltenyi Biotec) and anti-CD38 (FITC, MACS; Miltenyi Biotec) mAbs, with an exclusion of at least 20 channels between the CD38+ and CD38- subpopulations (data not shown). The purity of the preparation ($\geq 99\%$ of CD34+CD38- leukemic or healthy cells) was assessed by flow cytometry reanalysis of sorted cells. CD34+CD38- enriched cells were plated during 48 h at 6.10^4 cells/ml in CellGro GMP SCGM medium supplemented with rh SCF (100 ng/ml), rh TPO (20 ng/ml) and rh Flt3 (50 ng/ml) (all from CellGenix GmbH, Freiburg, Germany).

Cell culture

We used the following leukemic cell lines: HL-60 (derived from a 36-year-old female with AML M2), THP-1 (derived from a 1-year-old male with AML M5), Kasumi-1 (derived from a 7-year-old male with AML M2), Kasumi-3 (derived from a 57-year-old male with AML M0), MOLM-14 (derived from a 20-year-old male with AML M5) and KG-1 (derived from a 59-year-old male with AML M6). All AML cells lines were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC), the European Collection of Cell Cultures (ECACC) and were cultured in RPMI-1640 Glutamax supplemented with 10–20% fetal bovine serum (GE Healthcare, Europe, GmbH, Pasching, Austria) at 37 °C in a humidified atmosphere of 5% CO₂–95% air.

Cell viability

Cells were seeded into 96-well cell culture plates at a concentration of 50 000 cells/well. Cell viability was monitored by AlamarBlue Cell viability protocol (Thermo Fisher Scientific, Illkirch, France) on a TriStar LB 941 Multimode Microplate Reader (Berthold Technologies, Thoiry, France).

The sensitivity toward different drugs DIMATE (Advanced BioDesign, Lyon, France), cytarabine, daunorubicine and azacitidin (Sigma-Aldrich) was determined using different concentrations of the drugs. After 48 h, the growth inhibitory effect of the drug was analyzed using Resasurin (Sigma-Aldrich) according to manufacturer's instruction. The drug response was quantified by the half maximal inhibitory concentration (IC50) for each particular cell line, and determined by non-linear regression analysis of log-dose/response curves.

ALDH activity (ALDEFLUOR kit, StemCell Technologies, Grenoble, France) and cell viability (with 7-AAD, Immunotech, Marseille, France), of the healthy and leukemic CD34+CD38-, were concomitantly performed by flow cytometry, to monitor specifically the CD34+CD38-ALDH+ and CD34+CD38-ALDH- subpopulations viability.

ALDEFLUOR assay

Enzyme activity of ALDH was detected with ALDEFLUOR kit (StemCell Technologies). Control and leukemic CD34+CD38- cells and leukemic cell lines (1.10^6 cells/ml) were incubated under control condition or treated with 1,3,5 10 μmol/l of DIMATE overnight. Then, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) 1 × and were suspended in ALDEFLUOR assay buffer. For each condition (250 000 cells/500 μl), diethyl aminobenzaldehyde (DEAB), a broad inhibitor of ALDH, was used as control of the background fluorescence. ALDEFLUOR DEAB reagent ('control' condition) or ALDEFLUOR activated reagent ('test' condition) were added to cell suspension and were incubated 30 min at 37 °C.

Quantitative determination of HNE protein and MDA/protein adducts by ELISA

The formation of 4-HNE protein and MDA protein adducts was quantified with the Oxiselect HNE Adduct Elisa kit (Cell Biolabs, San Diego, CA, USA) and the Oxiselect MDA Adduct ELISA Kit (Cell Biolabs), respectively. Briefly, cell lysates were prepared by sonication in reducing SDS Sample Buffer. Homogenates were diluted to 10 μg protein/ml and adsorbed in 96-well protein binding plates by incubation at 37 °C for at least 2 h. Wells were washed twice with PBS and incubated for an additional 2 h at room temperature on an orbital shaker. Following three washes in PBS, 100 μl of anti-HNE antibody or anti-MDA were added to the wells and incubated for 1 h at room temperature. Subsequently, goat anti-rabbit secondary antibody-HRP conjugate (diluted 1/1000 with the assay diluent) was added and incubation continued for 1 h. Wells were washed five times in PBS and HRP substrate was added. Reaction was stopped with an acidic solution, and absorbance read on a microplate reader at 450 nm. The amount of HNE protein adducts was determined by comparison with a standard curve prepared from HNE-BSA and MDA-BSA standards supplied by the manufacturer.

Table 1. AML patients and their clinical characteristics

AML	Age	Sex	Type	Circulating blasts	De novo or secondary AML	Previous treatments	Cytogenetic
UPN1	74	F	AML1	60%	Secondary to myelodysplastic syndrome	5 cycles of azacitidine	45,XX,+del (7q)
UPN2	79	F	AML1	81%	De novo	Induction+consolidation elderly patients (cytarabine-idarubicin)	Complex karyotype +del(5q)
UPN3	77	M	AML1	83%	De novo	Standard induction (daunorubicin-cytarabine)	Normal karyotype
UPN4	64	F	AML0	25%	Secondary to primary myelofibrosis	Double induction (daunorubicin-cytarabine followed by cytarabine-idarubicin)	Complex karyotype
UPN5	75	M	AML0	40%	Secondary to myelodysplastic syndrome	Untreated	Complex karyotype +del (5q)+del (7q)
UPN6	73	F	AML5	22%	De novo	Induction+consolidation elderly patients (cytarabine-idarubicin)	t (6;11) MLL-AF6
UPN7	71	M	AML5	34%	Secondary to myelodysplastic syndrome	Induction+consolidation elderly patients (cytarabine-idarubicin)	Del (5q), del(7q), del (17p)
UPN8	91	F	AML0	59%	De novo	Untreated	Unknown
UPN9	48	M	AML7	27%	Secondary to chronic myelomonocytic leukemia	2 cycles of azacitidine+2 cycles of decitabine	Normal karyotype
UPN10	78	M	AML5	80%	De novo	Untreated	Normal karyotype

Abbreviations: AML, acute myeloid leukemia; UPN, unique patient number.

Caspase activity assay

The caspase activity assay on DIMATE-treated HL-60 cells was evaluated using the Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega, Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions. HL-60 cells were seeded at a concentration of 5×10^4 cells/well in 100 μ l of complemented medium into 96-well flat-bottom white microplates. Cells were grown in presence of DIMATE 5 μ mol/l or vehicle in triplicate. After 1, 3, 6 and 24 h of incubation, 100 μ l of Caspase-Glo Reagent was added and the mixture was incubated for 1 h at 37 °C. The amount of luminescent corresponding to the activity of caspase 3 and 7 was quantified using a luminometer.

Colony-forming units

Human HSCs were cultured under control conditions or with 1, 3, 5, 7, 5, 10 and 15 μ mol/l of DIMATE. To observe the self-renewing hematopoietic system, cells were washed with PBS 1 \times and then counted in CellGenix medium (CellGenix GmbH) supplemented with cytokines. About 1000 to 1500 cells were plated in dishes in StemMACS HSC-CGU Media (MACS; Miltenyi Biotec) in a 37 °C humidified atmosphere containing 5% CO₂. The clonogenic assays were performed in triplicate. Fifteen days later, colonies coming from differentiation of progenitors cells were counted and evaluated accordingly to manufacturer's instructions. Colony-forming unit-granulocyte macrophage, erythroid and burst-forming unit-erythroid and megakaryocyte progenitors were identified.

In vivo experimentation

To determine the antileukemic activity of DIMATE in a clinically relevant setting, we established patient-derived xenografts, or PDX models, in which 3×10^6 immunopurified CD34+ leukemic peripheral blood mononuclear cells from AML patient were transplanted intravenously into NOD/SCID/IL2Ry^{null} immunodeficient mouse strain (NOG) for expansion ($n=25$). For human AML xenograft, a patient with refractory AML after induction

(complex karyotype+del(5q), bad prognosis, see UPN2, Table 1) was selected. After injection of primary AML cells, NOG mice were monitored for leukemia development by flow cytometric analysis of peripheral blood for human CD45-positive (hCD45+) cells. Four weeks were required for the development of the models monitored by the h-rate corresponding to the amount of hCD45+cells/mouse CD45-positive cells (mCD45+). Mice were next randomized and treatment with DIMATE (14, 28 mg/kg) or drug vehicle started for 4 weeks. Weekly monitoring of hCD45+ and mCD45+ circulating cells was performed during all treatment period. After treatment, mice were killed and bone marrow and spleen were harvested. hCD45+ and mCD45+ sorting and monitoring, in spleen and bone marrow, and spleen weighing was performed. All *in vivo* animal studies had been reviewed and approved by the local ethics committee (01_TransCurebio-Services-AB-01).

Statistical analysis

Values are expressed as mean \pm s.e.m. or frequencies and proportions. Differences between the groups were determined by unpaired *t*-test, χ^2 -, Fisher's exact test or analysis of variance, where appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant. Analysis was performed using GraphPad prism version 5.0 (GraphPad software, San Diego, CA, USA).

RESULTS

Inhibition of ALDH by DIMATE is cytotoxic on human AML cell lines by promoting apoptogenic aldehyde accumulation inducing apoptosis

DIMATE's IC₅₀ was determined in AML cell lines showing a cytotoxic effect of DIMATE with IC₅₀ ranged between 1 and 15 μ M. On HL-60, Kasumi-1, Kasumi-3, MOLM-14 and KG-1 cell lines, the IC₅₀ of DIMATE was of 5.094 μ mol/l (s.e.m. \pm 0.1007);

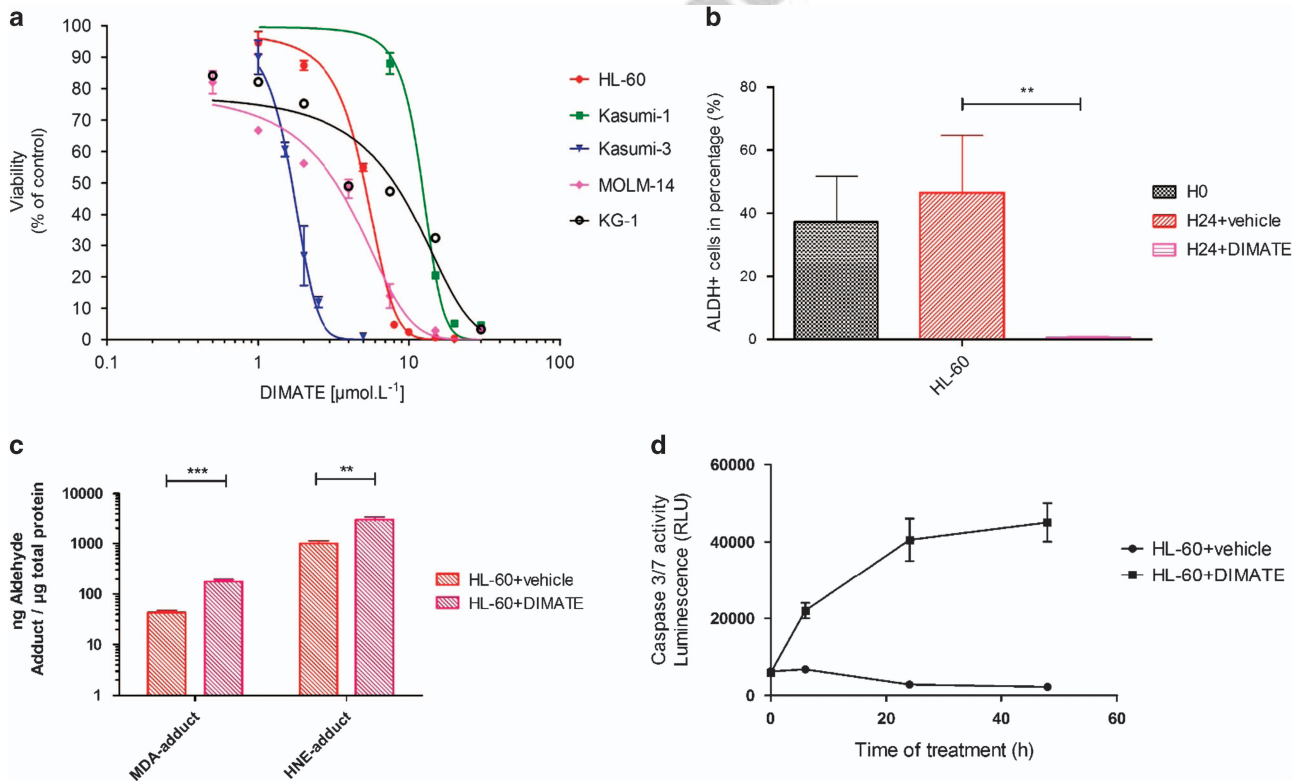


Figure 1. Inhibition of ALDH by DIMATE is cytotoxic on human AML cell lines by promoting apoptogenic aldehyde accumulation inducing apoptosis. **(a)** Viability assay of AML cells to increasing concentration of DIMATE. All experiments were performed in triplicates ($n=3$). Values for all cell lines are showed in Supplementary Table 2. **(b)** Monitoring of aldehyde dehydrogenase activity in flow cytometry in HL-60. Graphic representations of average percentages of ALDH+ cells at H0, and after 24 h of cell culture, without and with DIMATE 5 μ mol/l. ($n=3$). **(c)** Quantification of MDA and HNE adduct in HL-60 cells treated with DIMATE 5 μ mol/l during 24 h. Adduct formation is higher in cells treated than with the vehicle. **(d)** Monitoring of caspase 3/7 activity of HL-60 cells treated with DIMATE 5 μ mol/l. After 6 h of treatment, activation of caspase activity is observed.

4
12.2 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.4711); 1.67 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.04758); 3.287 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.2039) and 8.028 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 1.386), respectively (Figure 1a and Supplementary Table 1).

Cytotoxic effect of DIMATE is due to the inhibition of ALDH activity that leads to accumulation of apoptogenic aldehydes such as MDA and HNE. Treatment of AML cell, HL-60 with DIMATE for 24 h shows an inhibition of ALDH activity (Figure 1b) and accumulation of HNE and MDA adducts bound to proteins (Figure 1c). This accumulation caused apoptosis in a time-dependant manner by activating caspases 3 and 7 (Figure 1d).

DIMATE is selectively cytotoxic in leukemic population enriched in LSCs but unlike conventional chemotherapy, DIMATE is not toxic for healthy hematopoietic stem cells

The cytotoxicity of DIMATE was assessed on CD34+ CD38- ALDH+ leukemic peripheral blood mononuclear cells. For this population, enriched for LSCs, IC50 values of DIMATE was 2.8 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.03). For this same leukemic population, IC50 values of daunorubicin, ara-C and azacytidine were respectively 0.132 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.009), 1.5 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.17) and 4.41 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.4) (Figure 2a and Supplementary Table 2).

Healthy HSCs were treated for 48 h with the IC50 values of DIMATE, daunorubicin, ara-C and azacytidine determined on the LSCs. After 48 h of HSCs culture, mean proliferation between H0 and H48 was 300% (s.e.m. ± 4.398) in the untreated group and 250% (s.e.m. ± 3.665) in the DIMATE group ($P < 0.01$). In the daunorubicin and ara-C groups there was no HSCs proliferation but a cellular death respectively of 20% (s.e.m. ± 4.691) ($P < 0.01$) and 40% (s.e.m. ± 3.417) ($P < 0.01$). After 48 h of treatment, azacytidine had almost a cytostatic effect on HSCs ($P < 0.001$) (Figure 2b). Figure 2c shows cell survival for the LSCs and HSCs according to the different concentrations of DIMATE. The IC50 concentration was 2.79 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 0.04) for the LSCs and 24.39 $\mu\text{mol/l}$ (s.e.m. ± 1.58) for HSCs ($P < 0.01$). A therapeutic zone could be established. Indeed, between 5 and 9 $\mu\text{mol/l}$, DIMATE eradicated all LSCs (100% of lethality) and showed low toxicity (under 3% of lethality) on healthy HSCs.

Moreover, after 48 h of cell culture with DIMATE until 10 $\mu\text{mol/l}$, normal HSCs retained their self-renewing and multi-lineage differentiation capacity as shown by the enumeration and evaluation of stem and progenitor cells as colony-forming units in the Supplementary Figure 1. Above 10 $\mu\text{mol/l}$, HSCs self-

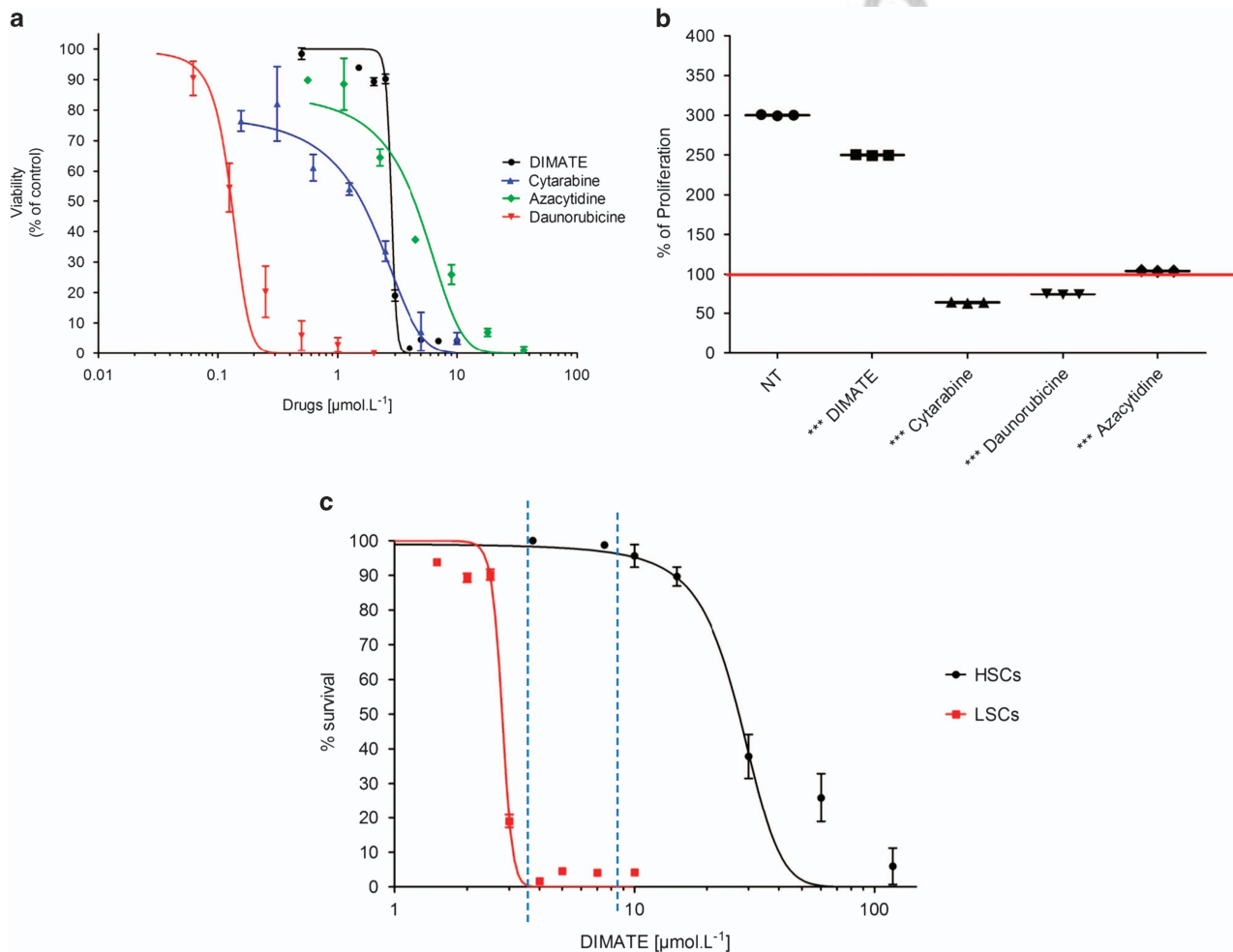


Figure 2. Cytotoxicity profile of DIMATE, daunorubicin, cytarabine and azacytidine on CD34+CD38-ALDH+ leukemic cells and CD34+CD38- healthy hematopoietic stem cell. (a) Cytotoxicity profiles of DIMATE, daunorubicin, cytarabine and azacytidine after 48 h of treatment for the CD34+CD38-ALDH+ leukemic cells population enriched in LSCs. (*n* = 10) (b) Healthy HSCs proliferation, in percentage, after 48 h of treatment with DIMATE, daunorubicin, cytarabine and azacytidine. Drugs were used at a concentration equal to the IC50 values determined for the different drugs in LSCs (*n* = 51). (c) LSCs and healthy HSCs survival according to the different concentration of DIMATE (*n* = 10). Dotted lines (5–9 $\mu\text{mol/l}$) determine a therapeutic window within DIMATE eradicated all LSCs (100% of lethality) and showed low toxicity (under 3% of lethality) on normal HSCs.

renewing and multi-lineage differentiation capacity significantly and drastically decreased ($P < 0.01$). No colony-forming units were observed above $15 \mu\text{mol/l}$ (data not shown).

In immunodeficient mice, xenografted with human leukemic cells, DIMATE eradicates specifically human AML cells and spares healthy mouse hematologic cells

NOG immunodeficient mice were engrafted with primary human AML cells. Four weeks post engraftment, hCD45+ cells represented $17 \pm 14\%$ of circulating cells (data not shown). Mice were next randomized and treatment with DIMATE (14, 28 mg/kg) and vehicle started for 4 weeks. In untreated control mice (vehicle), after 4 weeks, hCD45+ AML circulating cells increased from 3×10^5 (s.e.m. $\pm 1.3 \times 10^5$) to 3.7×10^5 (s.e.m. $\pm 3.3 \times 10^5$) (not significant). In contrast, in 14 and 28 mg/kg DIMATE-treated mice, there was a drastic and significant decrease in human AML (hCD45+) cells compared with those in the untreated mice from 3×10^5 (s.e.m. $\pm 1.3 \times 10^5$) to 3.7×10^4 (s.e.m. $\pm 1.7 \times 10^4$) in the DIMATE

14 mg/kg group ($P < 0.01$) and from 3×10^5 (s.e.m. $\pm 1.3 \times 10^5$) to 7.3×10^3 (s.e.m. $\pm 3 \times 10^3$) in the DIMATE 28 mg/kg group ($P < 0.01$) (Figures 3b and d). Furthermore, during all of the treatment period, no toxicity or decrease in healthy circulating mouse cells (mCD45+) was observed in all the groups, including the DIMATE 14 and 28 mg/kg groups (Figure 3c). After 4 weeks of treatment, mice were killed and bone marrow and spleen were harvested. CD45+ sorting and monitoring, in spleen and bone marrow, but also spleen weighing was performed. Compared with untreated control mice, in the DIMATE 14 and 28 mg/kg treatment groups, spleen infiltration by human AML cells drastically decreased from 1.7×10^7 (s.e.m. $\pm 9.9 \times 10^6$) to 1.4×10^6 (s.e.m. $\pm 8.2 \times 10^5$) in the DIMATE 14 mg/kg group ($P < 0.01$) and to 1.3×10^5 (s.e.m. $\pm 7.2 \times 10^4$) in the DIMATE 28 mg/kg group ($P < 0.01$) (Figure 3e). At the same time, each mouse spleen was weighed. Compared with untreated mice, spleen weight decreased from 182 (s.e.m. ± 74.2 g) to 40.25 g (s.e.m. ± 19.4 g) in the DIMATE 14 mg/kg group (not significant) and to 37.7 g (s.e.m. ± 7.9 g) in the DIMATE 28 mg/kg group ($P < 0.05$) (Figure 3g). Regarding bone marrow, compared with untreated control mice,

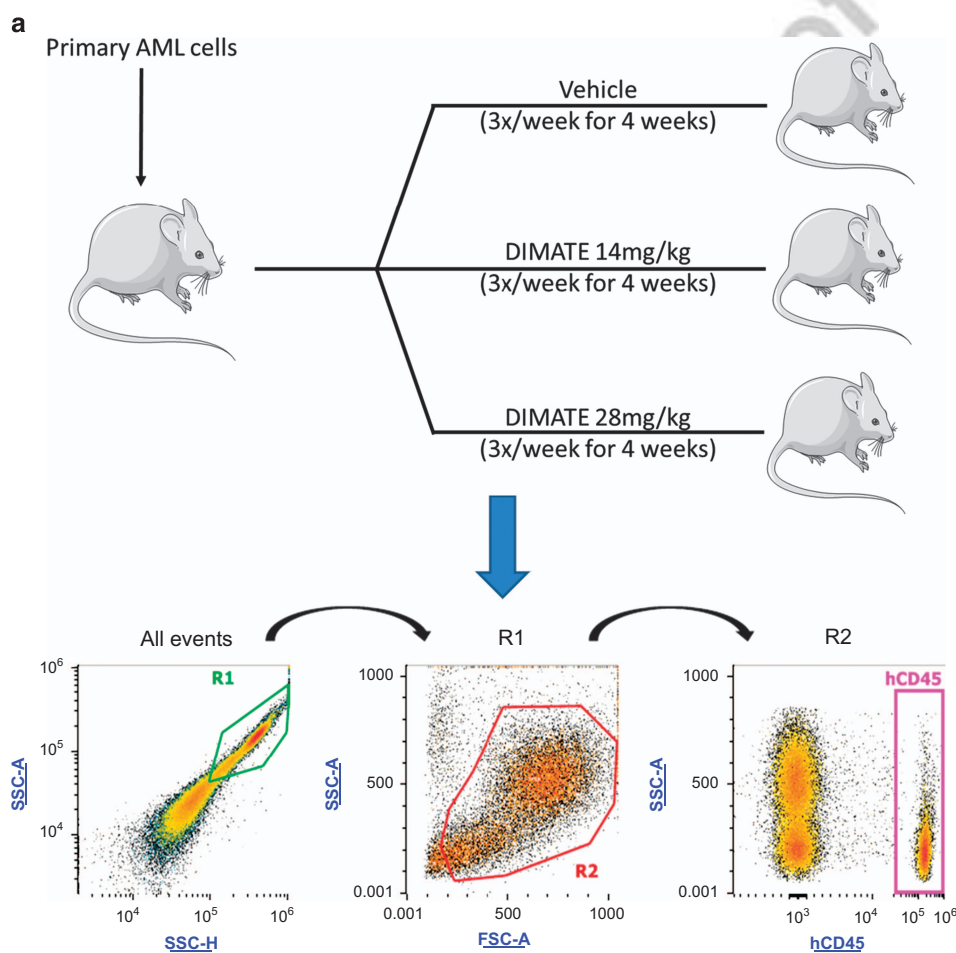


Figure 3. DIMATE shows potent activity against primary AML cells transplanted in NOG mice. (a) Experimental scheme and gating strategy in flow cytometry for hCD45+ and mCD45+ cells monitoring in blood, spleen and bone marrow for study of the antileukemic activity of DIMATE in immunodeficient mice engrafted with primary human AML cells. Mice were randomized and treatment with DIMATE (14, 28 mg/kg) and vehicle started for 4 weeks. Weekly monitoring of hCD45+ and mCD45+ circulating cells were performed during the treatment. After treatment, mice were killed and bone marrow and spleen were harvested. CD45+ have been sorted and monitored in spleen and bone marrow. Spleen weighing was performed. (b) Human CD45+ cells (hCD45+) count in peripheral blood during the treatment with vehicle or DIMATE. (c) Mouse CD45+ cells (mCD45+) count in peripheral blood during the treatment with vehicle or DIMATE. (d) Absolute human AML cells in the peripheral blood of NOG mice engrafted with AML cells before and after treatment with vehicle and different concentrations of DIMATE after mice euthanasia. (e) Counts of human CD45 cells in spleen in mice engrafted with AML cells after treatment with vehicle and different concentrations of DIMATE. (f) Counts of human CD45 cells in bone marrow in mice engrafted with AML cells after treatment with vehicle and different concentrations of DIMATE. (g) Spleen weight of mice transplanted with human AML cells treated with vehicle or DIMATE. In panels (d–f) each symbol denotes a single animal ($n = 3–6$ per group). ** Mean $P < 0.001$ and * mean $P < 0.05$.

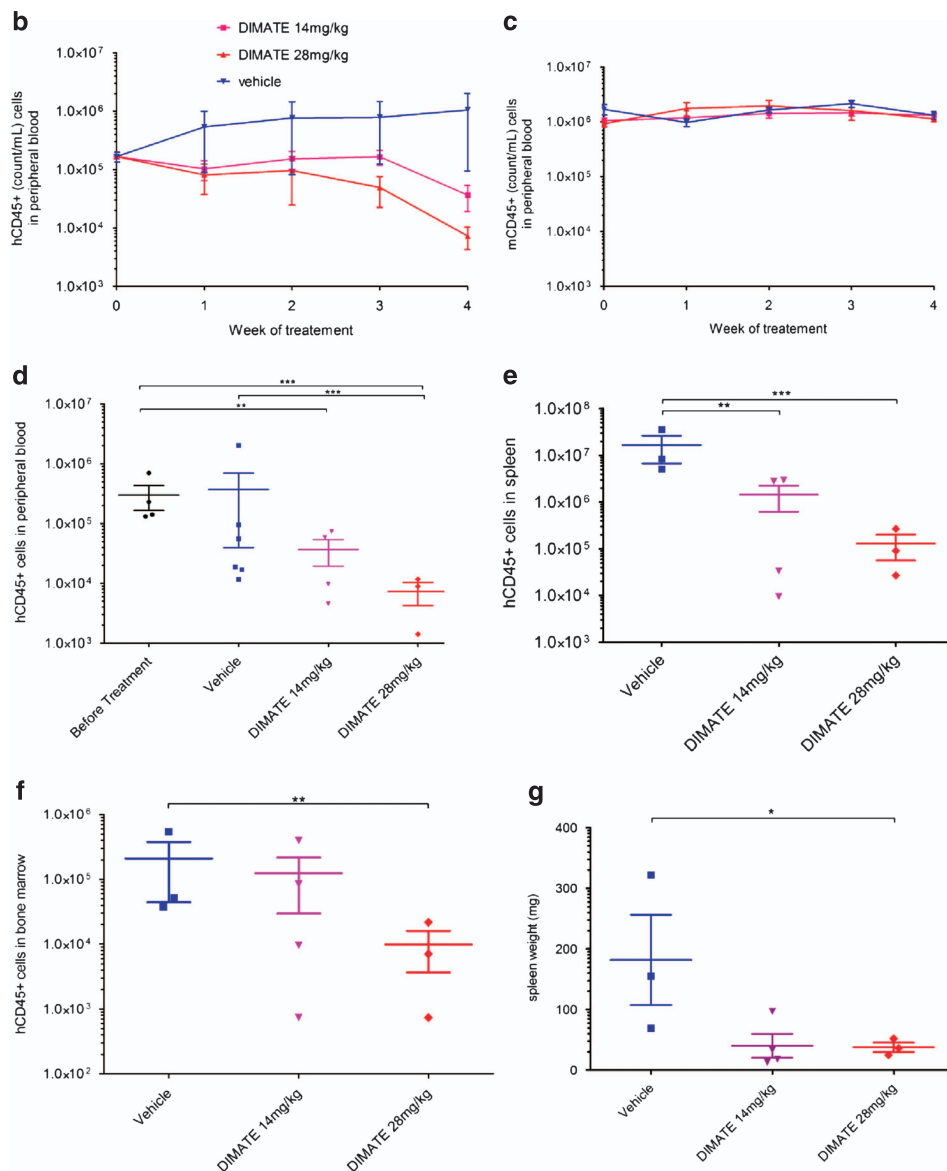


Figure 3. Continued

infiltration by AML cells decreased from 2.1×10^5 (s.e.m. $\pm 1.7 \times 10^5$) to 1.2×10^5 (s.e.m. $\pm 9.3 \times 10^4$) in the DIMATE 14 mg/kg group (not significant) and to 9.8×10^3 (s.e.m. $\pm 6.2 \times 10^3$) in the DIMATE 28 mg/kg group ($P < 0.05$) (Figure 3f).

DISCUSSION

Resistance to cytarabine and anthracycline-based chemotherapy is a major cause of treatment failure in AML.¹⁰ More precisely, CD34+CD38- leukemic cell population, enriched in LSCs, are highly resistant to these and other conventional chemotherapies.²¹ Therefore new therapies are urgently needed for this deadly disease. Furthermore, conventional chemotherapy have similar cytotoxic effects on normal or leukemic HSCs.²¹ In sharp contrast, we demonstrated that DIMATE, through ALDH inhibition, targeted and eradicated *in vitro* and *in vivo* several human myeloid leukemia cell lines and human leukemic cells population highly enriched in LSCs, but spared healthy HSCs. Most interestingly, we have determined a therapeutic zone, between 5 and 9 $\mu\text{mol/l}$, where DIMATE eradicated all LSCs (100% of lethality) and showed

low toxicity (under 3% of lethality) on healthy HSCs. Moreover, with such treatment concentrations, healthy HSCs retained their self-renewing and multi-lineage differentiation capacity.

ALDH detoxifying enzymes has been extensively associated with a number of malignancies and drug-resistant phenotypes. In the particular case of AML, the ALDH gene family is found upregulated or amplified in 42% of cases, impacting also life expectancy, negatively (Supplementary Figures 2A and B).^{22,23} These data suggest that the altered ALDH activity in AML confers advantages for cell proliferation and survival and/or for the progression of the disease. DIMATE is described as an irreversible inhibitor of recombinant ALDH1 and ALDH3. Therefore, we evaluated the capacity of DIMATE to inhibit the ALDH activity in leukemic cells.^{18,19}

Selective cytotoxicity of DIMATE on cancer cells of human and murine origin has already been demonstrated *in vitro* on human epithelial cancer cells. Indeed, DIMATE induces an irreversible apoptosis in human prostate epithelial cancer cells DU145, but it is a reversible cytostatic agent on human prostate epithelial normal cells.^{18,19} In the specific AML framework, safety of ALDH inhibitor

on healthy HSCs has already been demonstrated, and even more remarkable is the inhibition of ALDH and retinoid signaling induces expansion of human HSCs.²⁴

These hypotheses are supported by our experiments in mice. In NOG mice, xenografted with human AML, enriched in LSCs, DIMATE eradicated *in vivo*, specifically, human AML cells (hCD45+) in blood, spleen and bone marrow. In contrast, DIMATE spared healthy circulating mouse cells (mCD45+). Moreover, with a humanization rate of 17%, our mouse model could be optimized, to try to obtain more significant results, in spleen and bone marrow, in particular, in the DIMATE 14 mg/kg treatment group.

With very unusual anti-cancer properties, DIMATE seems to be a very promising molecule for the treatment of AML and cancer more generally. Results from our work open new therapeutic perspectives in AML and provide a conceptual support for initiation of a phase I-II clinical trials.

We conclude that DIMATE is a very promising drug that opens new therapeutic perspectives in myeloid malignancies with putative interest in lymphoid malignancies as this drug is also able to inhibit the anti-apoptotic effect of bcl-2.¹⁸ A limitation of our work concerns the LSC definition. Indeed, in our work, to define LSCs we used the CD34+CD38-ALDH+ phenotype. However, several pathways, specific genes or microRNA, cytometric or transcriptomic signatures have also been proposed to distinguish LSCs from HSCs.²⁵⁻²⁸ There is no consensus on an absolute definition for LSCs and it is more correct to speak of 'leukemic cells population enriched in LSCs'. Furthermore, according to some robust experimental works, LSCs could not be a stem cell disorder but rather a reacquisition of stem cell characteristics by classic leukemic cells.²⁹ Finally, we should not underestimate the role of the bone marrow environment in the leukemogenesis. Indeed, a pathologic bone marrow 'niche' could lead to permanent generation of LSCs.³⁰⁻³² Nevertheless, LSCs remain an interesting target for other innovative therapeutic strategies.³³⁻³⁵ Analysis of DIMATE effect on normal and leukemic bone marrow 'niche' is the next step in our study aiming at a better understanding of the mechanisms of action of this innovative drug.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

ACKNOWLEDGEMENTS

We would like to thank INSERM, Aix-Marseille University and the patients who gave their informed consent to the use of their samples for research. We thank Laurence Borge for assistance and the use of the cell culture platform facilities (CRCM U1068, Marseille).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

GV, MP-A and GM have written the paper. GF has synthesized the DIMATE and conducted the QC and release of the compound. FS and PP have provided healthy hematopoietic stem cells. PS and CB have conducted flow cytometry analysis on human leukemic cells. GV, CB and LY have conducted the main experiments. GQ, CN and LF have read and commented on the paper. RTC and IC have designed the protocol study.

REFERENCES

- 1 Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin* 2010; **60**: 277-300.
- 2 Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LAG, Wu X, Jamison PM *et al*. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2001, with a special feature regarding survival. *Cancer* 2004; **101**: 3-27.
- 3 Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK *et al*. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 2010; **115**: 453-474.

- 4 Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH *et al*. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria, Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol* 2003; **21**: 4642-4649.
- 5 Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 1997; **3**: 730-737.
- 6 Jones RJ, Matsui WH, Smith BD. Cancer stem cells: are we missing the target? *J Natl Cancer Inst* 2004; **96**: 583-585.
- 7 Huff CA, Matsui W, Smith BD, Jones RJ. The paradox of response and survival in cancer therapeutics. *Blood* 2006; **107**: 431-434.
- 8 Zwaan CM, Kaspers GJL. Possibilities for tailored and targeted therapy in paediatric acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2004; **127**: 264-279.
- 9 Kaspers GJL, Zwaan CM. Pediatric acute myeloid leukemia: towards high-quality cure of all patients. *Haematologica* 2007; **92**: 1519-1532.
- 10 Burnett A, Wetzler M, Löwenberg B. Therapeutic advances in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol* 2011; **29**: 487-494.
- 11 Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J *et al*. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645-648.
- 12 Gerber JM, Smith BD, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Morsberger L *et al*. A clinically relevant population of leukemic CD34+CD38-cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 2012; **119**: 3571-3577.
- 13 Hoang VT, Hoffmann I, Borowski K, Zepeda-Moreno A, Ran D, Buss EC *et al*. Identification and separation of normal hematopoietic stem cells and leukemia stem cells from patients with acute myeloid leukemia. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2013; **1035**: 217-230.
- 14 Hoang VT, Buss EC, Wang W, Hoffmann I, Raffel S, Zepeda-Moreno A *et al*. The rarity of ALDH(+) cells is the key to separation of normal versus leukemia stem cells by ALDH activity in AML patients. *Int J Cancer* 2015; **137**: 525-536.
- 15 Storms RW, Trujillo AP, Springer JB, Shah L, Colvin OM, Ludeman SM *et al*. Isolation of primitive human hematopoietic progenitors on the basis of aldehyde dehydrogenase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**: 9118-9123.
- 16 Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, Craft TP, Herrbrich PE, Creer MH *et al*. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. *Blood* 2004; **104**: 1648-1655.
- 17 Fournet G, Martin G, Quash G. α,β -Acetylenic amino thiolester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* 2013; **20**: 527-533.
- 18 Canuto RA, Muzio G, Salvo RA, Maggiora M, Trombetta A, Chantepie J *et al*. The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. *Chem Biol Interact* 2001; **130-132**: 209-218.
- 19 Quash G, Fournet G, Courvoisier C, Martinez RM, Chantepie J, Paret MJ *et al*. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: alpha,beta-acetylenic N-substituted aminothiolesters are reversible growth inhibitors of normal epithelial but irreversible apoptogens for cancer epithelial cells from human prostate in culture. *Eur J Med Chem* 2008; **43**: 906-916.
- 20 Roch AM, Quash G, Michal Y, Chantepie J, Chantegrel B, Deshayes C *et al*. Altered methional homeostasis is associated with decreased apoptosis in BAF3 bcl2 murine lymphoid cells. *Biochem J* 1996; **313**(Pt 3): 973-981.
- 21 Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainty D, Arnoulet C, Gastaut J-A *et al*. Human acute myeloid leukemia CD34+/CD38- progenitor cells have decreased sensitivity to chemotherapy and Fas-induced apoptosis, reduced immunogenicity, and impaired dendritic cell transformation capacities. *Cancer Res* 2000; **60**: 4403-4411.
- 22 Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO *et al*. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013; **6**: pl1.
- 23 Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA *et al*. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012; **2**: 401-404.
- 24 Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, Colvin M, Safi R, Chao NJ *et al*. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; **103**: 11707-11712.
- 25 Yilmaz OH, Valdez R, Theisen BK, Guo W, Ferguson DO, Wu H *et al*. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. *Nature* 2006; **441**: 475-482.
- 26 So CW, Karsunky H, Passegué E, Cozzio A, Weissman IL, Cleary ML. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell* 2003; **3**: 161-171.
- 27 Gal H, Amariglio N, Trakhtenbrot L, Jacob-Hirsch J, Margalit O, Avigdor A *et al*. Gene expression profiles of AML derived stem cells; similarity to hematopoietic stem cells. *Leukemia* 2006; **20**: 2147-2154.

- 28 Lechman ER, Gentner B, Ng SWK, Schoof EM, van Galen P, Kennedy JA *et al*. miR-126 Regulates distinct self-renewal outcomes in normal and malignant hematopoietic stem cells. *Cancer Cell* 2016; **29**: 602–606.
- 29 Passequé E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**(Suppl 1): 11842–11849.
- 30 Raaijmakers MHGP, Mukherjee S, Guo S, Zhang S, Kobayashi T, Schoonmaker JA *et al*. Bone progenitor dysfunction induces myelodysplasia and secondary leukaemia. *Nature* 2010; **464**: 852–857.
- 31 Kode A, Manavalan JS, Mosialou I, Bhagat G, Rathinam CV, Luo N *et al*. Leukemogenesis induced by an activating β -catenin mutation in osteoblasts. *Nature* 2014; **506**: 240–244.
- 32 Wang L, Zhang H, Rodriguez S, Cao L, Parish J, Mumaw C *et al*. Notch-dependent repression of miR-155 in the bone marrow niche regulates hematopoiesis in an NF- κ B-dependent manner. *Cell Stem Cell* 2014; **15**: 51–65.
- 33 Etchin J, Montero J, Berezovskaya A, Le BT, Kentsis A, Christie AL *et al*. Activity of a selective inhibitor of nuclear export, selinexor (KPT-330), against AML-initiating cells engrafted into immunosuppressed NSG mice. *Leukemia* 2016; **30**: 190–199.
- 34 Schinke C, Giricz O, Li W, Shastri A, Gordon S, Barreyro L *et al*. IL8-CXCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. *Blood* 2015; **125**: 3144–3152.
- 35 Prost S, Relouzat F, Spentchian M, Ouzegdouh Y, Saliba J, Massonnet G *et al*. Erosion of the chronic myeloid leukaemia stem cell pool by PPAR γ agonists. *Nature* 2015; **525**: 380–383.



This work is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in the credit line; if the material is not included under the Creative Commons license, users will need to obtain permission from the license holder to reproduce the material. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

© The Author(s) 2016

Supplementary Information accompanies this paper on *Blood Cancer Journal* website (<http://www.nature.com/bcj>)

Uncorrected Proof

Natural killer cells in acute myeloid leukemia patients: from phenotype to transcriptomic analysis

G. Venton^{1,2} · Y. Labiad¹ · J. Colle^{1,2} · A. Fino¹ · S. Afridi¹ · M. Torres¹ · S. Monteuil¹ · B. Loriod¹ · N. Fernandez-Nunez¹ · L. Farnault² · P. Suchon^{3,4} · J. C. Mattei⁵ · P. Rihet¹ · A. Bergon¹ · C. Nguyen¹ · C. Baier¹ · R. Costello^{1,2}

© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Chemotherapies allow complete remission in more than 50 % of patients with acute myeloid leukemia (AML), however, with frequent relapse. This suggests that residual leukemic cells may escape to chemotherapy and immune system. Natural killer (NK) cells from AML patients (AML-NK) have a weaker natural cytotoxicity-activating receptors (NCRs) expression than NK cells from healthy donors (HD-NK). Coding genes for NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 and NCR3/NKp30 are located at different loci on two different chromosomes; however, their expression is tightly coordinated. Most NK cells express either high (NCR^{bright}) or low levels (NCR^{dull}) of all three NCRs. This suggests the existence of negative/positive regulation factor(s) common to the three receptors. In order

to find transcription factor(s) or pathway(s) involved in NCRs co-regulation, this study compared the transcriptomic signature of HD-NK and AML-NK cells, before and after in vitro NK cells culture. Microarrays analysis revealed a specific NK cells transcriptomic signature in patients with AML. However, in vitro NK cells expansion erased this signature and up-regulated expression of central molecules of NK functions, such as NCR, NKG2D and also ETS-1, regardless of their origin, i.e., AML-NK vs HD-NK. ETS-1 transcription factor was shown to bind to a specific and common region in the NCRs promoters, thus appearing as a good candidate to explain the coordinated regulation of three NCRs. Such results are encouraging regarding in vitro AML-NK cytotoxicity restoration and provide a new conceptual support for innovative cellular

G. Venton and Y. Labiad have contributed equally to this work.

✉ R. Costello
regiscostello.tagc@gmail.com

G. Venton
geoffroy.venton@ap-hm.fr

Y. Labiad
labiad.yasmine@gmail.com

J. Colle
julien.colle@ap-hm.fr

A. Fino
aurore.fino@gmail.com

S. Afridi
afridi@tagc.univ-mrs.fr

M. Torres
magali.torres@univ-amu.fr

S. Monteuil
soline.montreuil@laposte.net

B. Loriod
beatrice.loriod@inserm.fr

N. Fernandez-Nunez
nicolas.fernandez-nunez@inserm.fr

L. Farnault
laure.farnault@ap-hm.fr

P. Suchon
pierre.suchon@ap-hm.fr

J. C. Mattei
jeancamille.mattei@gmail.com

P. Rihet
pascal.rihet@univ-mrs.fr

A. Bergon
aurelie.bergon@inserm.fr

C. Nguyen
nguyen@tagc.univ-mrs.fr

C. Baier
celine_baier@yahoo.fr

therapy based on in vitro NK cells expansion before their reinfusion in AML patients.

Keywords Acute myeloid leukemia · Natural killer cells · Transcriptomic analysis · Natural activating receptor · Gene co-regulation

Abbreviations

CR	Complete remission
NK	Natural killer
AML	Acute myeloid leukemia
TF	Transcription factor
NCR	Natural cytotoxicity receptor
EBV	Epstein barr virus
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
p	<i>p</i> values
FC	Fold change
TFBS	Transcription factor binding sites

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is characterized by proliferation of immature and abnormal leukocytes, which impede normal hematopoiesis. Although complete remission (CR) is often achieved after chemotherapy, relapse frequently occurs [1–3]. This suggests an escape of residual leukemic cells to chemotherapy and to innate immunity, which plays a pivotal role in the anti-tumoral response [4–6].

Natural killer (NK) lymphocytes are central effectors of innate immunity. Under physiological conditions, normal cells are protected from NK cell-mediated lysis by adequate HLA-class-I-molecules expression. A deficient HLA expression is observed in leukemia cells, which become targets of NK cell-mediated lysis [1, 7, 8]. NK kill tumor cells by recruitment of various activating receptors such as

natural cytotoxicity receptors (NCRs): NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 and NCR3/NKp30. Defects of NK functions have been described in many hematological malignancies, including AML [9–14] and >80 % NK cells from healthy donors (HD-NK) express high levels of the three NCRs (NCR^{bright}), while >80 % NK cells from AML patients (AML-NK) express low NCR levels (NCR^{dull}). The anti-tumoral effect of NCRs expression is strengthened by the relatively good prognosis of NCR^{bright} patients compared to NCR^{dull} patients. Recently, two studies highlighted the correlation of NCR^{bright} expression with positive outcomes in AML [15, 16]. Moreover, treatment with IL-2+ Ceplene[®] (histamine dihydrochloride) in AML consolidation, which restores a normal expression (especially of NCR1/NKp46 expression), improves event-free survival in AML [9, 11, 17, 18]. NCR^{dull} phenotype is acquired during leukemia development since a complete (for NCR1/NKp46) or partial (for NCR3/NKp30) reversibility is observed in patients achieving CR after chemotherapy. Reversibility of the NCR^{dull} phenotype after CR, i.e., complete clearance of AML blasts, suggests that leukemia cells might be involved in the down-regulation of NCRs expression. Remarkably, NCRs are encoded by three different loci on two different chromosomes, raising the question of how a coordinated expression can be obtained both in healthy donors (NCR^{bright}) and AML patients (NCR^{dull}).

To solve these questions, analysis was performed in silico to identify putative transcription factor sites of fixation in NCRs promoters in order to find common factor able to explain the coordinated expression of NCRs. Based on recent works [19], this study laid the stress on the transcription factor ETS-1, a potential regulatory element of NCRs expression. In addition, in order to find transcription factors or pathways (which could be implicated in NCRs down-regulation in AML-NK), transcriptomic signature of AML-NK was compared to HD-NK. Transcriptomic data were also compared to the in silico analysis of the NCR promoters.

Patients, materiel and method

Patients and controls

Peripheral blood samples were obtained from 26 patients. Twelve from AML patients treated in our institution (University Hospital La Conception), and 14 from HD, taken in charge in another center (Etablissement Français du Sang Alpes-Méditerranée). The median age of AML patients was 75 years [48–85], and median age of HD was 54 years [19–82]. Patients were classified according to the WHO classification (Table 1). All HD had a NCR^{bright}

¹ INSERM, UMR1090, Aix-Marseille Université, TAGC Campus de Luminy, Marseille 13288, France

² Present Address: Service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, 147 boulevard Baille, Marseille 13005, France

³ Laboratoire d'Hématologie, Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire La Timone, Marseille, France

⁴ UMR 1062 NORT, INSERM, Marseille, France

⁵ Faculté de Médecine, UMR-911 INSERM Center for Research in Onco-biology and Onco-pharmacology, Marseille, France

Table 1 AML patients and their clinical characteristics

AML patients	Sex	AML subtypes (WHO)	Bone marrow blasts (%)	Blood blasts (%)	Blood lymphocytes (%)
UPN1	F	Undetermined	28	48	56
UPN2	F	M1	100	36	58
UPN3	F	Undetermined	80	80	51
UPN4	M	M4	20	8	25
UPN5	M	M0	40	19	28
UPN6	F	M5	77	90	9
UPN7	M	Undetermined	30	61	20
UPN8	M	Undetermined	21	3	69
UPN9	M	M6	74	2	12
UPN10	F	M2	57	3	12
UPN11	M	M5	80	47	18
UPN12	F	M4	60	24	28

phenotype except for donor number 940 (NCR^{dull} phenotype). AML patients all had a NCR^{dull} phenotype. In order to facilitate NK cell separation, patients presenting CD45⁺/CD56⁺ leukemic cells phenotype were excluded. The institutional review board of the Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM) approved the study, and written informed consent was obtained from each patient.

NK cells expansion

EBV cell line (UMR_S 1040, Montpellier) was used as feeder and was developed to select and specifically activate NK cells by NKG2D, via expression of its ligands: MHC class-I-chain-related protein A (MICA), B (MICB) and UL16-binding protein 1 and 2 (ULBP1 and ULBP2). NK cells had been expanded for 15 days (HD-NK) and for 31 days (AML-NK) from total PBMC cultured at $0.75 \cdot 10^6$ cells/ml with EBV cells feeder at 0.75×10^6 cells/ml in RPMI 1640 medium GlutaMAX (Lifetechnologies, France) with 10 % fetal calf serum (FCS) (from South America, Lifetechnologies, France) in the presence of recombinant human IL-2 (1000 UI/ml) (Sigma, France) at 37 °C in 5 % CO₂.

NK cells sorting

Fresh peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated from 6 AML patients and 6 HD, using lymphocyte separation medium density gradient centrifugation (Eurobio Technologies, France). PBMC were labeled with FITC-CD3 and PC5-CD56 (Beckman Coulter, France). CD56-NK cell sorting was achieved with the FACS Aria II (BD Biosciences, France) cell sorter. Purity of obtained NK cell fractions (CD3-/CD56⁺) was >97 %. Sorted cells were stored as dry pellets at -80 °C prior to transcription analysis.

Expanded NK cells were purified by EasySep Human NK Cell Enrichment kit (EasySep, StemCell, France) or by flow cytometry from expansion medium. Purity of NK cell fractions (CD16⁺/CD56⁺) varied from 87 to 98 %.

Immunophenotyping

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), were used to define the NK cells phenotype: CD3 (IgG1), CD56 (IgG1) with following activating receptors: NCR3/NKp30 (IgG1), NCR2/NKp44 (IgG1), NCR1/NKp46 (IgG1), NKG2D (IgG1). All antibodies were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France). PBMC, and NK cells were stained with antibodies for 15 min at 4 °C, washed with PBS and analyzed on a FACSCalibur (BD biosciences, Le Pont de Claix, France). Background levels were measured with isotopic controls.

RNA extraction and quantification

Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit (Qiagen, France) according to manufacturer instructions. ARN were quantified with NanoDrop spectrophotometer (Thermo scientific, France) and RNA integrity was assessed with Agilent 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies).

Transcriptome analysis

Sample amplification, labeling and hybridization followed the Low Input Quick Amp Labeling one-color protocol (version 6.5, May 2010) recommended by Agilent Technologies. Hundred nanograms of each total RNA sample was reverse transcribed into cDNA using oligo dT-T7 promoter primer. Hybridization was performed on whole human genome microarray slides (Agilent©SurePrint G3

V2 8 × 60 K, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) containing 24,000 probes with 8200 LincRNA (Long intergenic non-coding RNAs). Hybridized microarray slides were scanned using an Agilent DNA Microarray Scanner and recorded with Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies). Acquired quantification files were analyzed using the AgiND package (<http://tagc.univmrs.fr/AgiND>), which was also used for quality control and normalization. Quantile methods and background correction were used for data normalization.

Statistical analysis

For each comparison, measurement of differential gene expression was obtained with TIGR Multi-experiment viewer (TMeV) program. Significant Analysis of Microarray (SAM) and Student's *t* test were applied to determine fold changes (FC) and *p* values (P). Data were analyzed using a two-class unpaired response type, which compared control versus AML samples. For each sample comparison, *g*: profiler was used to perform statistical enrichment analysis. The most used source of the functional annotation is Gene Ontology terms [20]. All results were statistically significant with corrected *p* values <0.05 (Bonferroni correction).

Co-culture

After expansion, HD-NK cells were co-cultured with allogenic PBMC from HD or AML leukemic cells (NK/allogenic PBMC or AML blast ratio = 1/5) for five days in RPMI 1640 GlutaMax medium 10 % FCS and IL-2rh (1000U/ml). Malignant NK cell line NK-92 (ATCC, France) was co-cultured 48 h with three different cell lines (1/5 ratio): MOLM-14, KG-1 and Kasumi-1 (ATCC, France), corresponding to AML5, AML6 and AML2, respectively. NK-92 (ATCC) was cultured in α -MEM medium complemented with 2 mM L-glutamine, 1.5 g/l Sodium bicarbonate, 0.2 mM Inositol, 0.1 mM 2-mercaptoethanol, 0.02 mM folic acid, 200–400 U/ml recombinant human IL-2, 12.5 % horse serum and 12.5 % fetal bovine serum.

Reverse transcriptase quantitative PCR (RT-qPCR)

A mix containing optimized concentrations of dNTPs, random primers, oligo (dT) primer and qScript reverse transcriptase was used for cDNA synthesis. Transcripts were quantified by real-time quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) on an Stratagene Mx3005P sequence detector (Agilent Technologies) with Applied Biosystems predesigned TaqMan Gene Expression Assays and TaqMan Universal PCR Master Mix. The following probes were used (Applied

Biosystems): NCR1/NKp46 (Hs00183118_m1), NCR2/NKp44 (Hs00183113_m1), NCR3/NKp30 (Hs00394809_m1), NKG2D/KLRK1 (Hs00183683_m1), ETS1 (Hs00428293_m1). Housekeeping genes were GAPDH (Hs02758991_g1) and TBP (Hs00427620_m1). TBP showed less variation than GAPDH, that's why this gene was chosen to normalize the results. Results are expressed in relative mean expression \pm SD (standard deviation).

Research of common putative transcription factors binding sites to NCR genes

The MAPPER₂ database (<http://genome.ufl.edu/mapperdb>) is a web-based platform for the analysis of transcription factor binding sites (TFBS) in multiple genomes. The database contains predicted binding sites identified in the promoters of all human, mouse and *Drosophila* genes using 1017 probabilistic models representing over 600 different transcription factors. MAPPER₂ includes three large libraries of TFBS models: TRANSFAC, MAPPER and JASPAR (Riva, 2012). A multiple search was performed on the region –8 Kb upstream transcription starting-site (TSS) of the human NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 and NCR3/NKp30 genes. Those sequences were extracted using BioMart (PMID 19144180) in GRCh37/hg19 coordinates from v76 (<http://grch37.ensembl.org/>) annotations (PMID 19906699). The ETS1 motif was retrieved from JASPAR core vertebrates' database (version 5.0_alpha) and shortened to the core motif of 8 bp. The RSAT suite was then used to scan this modified ETS1 motif upstream of NCRs (NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 and NCR3/NKp30). This in silico search of ETS1 was performed with oligo-analysis [21] and matrixscan [22] from the RSAT (Regulatory Sequence Analysis Tools) [23] suite with default settings and *p* value <10^{–4} (<http://tagc.univ-mrs.fr/rsa-tools/>).

Chromatin Immunoprecipitation (ChIP)

Approximately 1 × 10⁷ NK-92 cells were suspended in ice-cold PBS. Proteins were cross-linked to the DNA using formaldehyde. After sonication, fragmentation of the DNA was performed to obtain DNA fragment around 200–500 nucleotides with a CovarisTMS2 sonicator. Magnetic Dynabeads protein A/G (Invitrogen) was added to the sample, and the suspension was transferred and divided into two fractions (IP and input). The ETS-1 antibody (C-4) used was a mouse monoclonal IgG₁ antibody (sc-55581) (Santa Cruz biotechnology). The fraction without antibody (input) served as a positive control while mouse non-specific antibodies served as a negative control. The immune complexes were washed, and all washing steps were carried out at 4 °C. Dynabeads protein A/G were

suspended in reverse cross-linking buffer (Invitrogen) and proteinase K and incubated. The DNA was isolated using PCR Purification Kit (Invitrogen) following the manufacturer's instructions. DNA was amplified by quantitative PCR (Syber green 1, Light Cycler[®] 2, Roche applied science) using NCR-specific primers pair. All q-PCR results were replicated and normalized with input. The primers used were:

	Forward	Reverse
NCR1/NKp46	5'-GGAGTTGTGAACGT TCTGATGA-3'	3'-TAGTGCTGAGC AGTGGGGACT-5'
NCR2/NKp44	5'-GGGAAGCAGTCC ATAACTCG-3'	3'-TCCCAGGCCT CTGTAGAAA-5'
NCR3/NKp30	5'-AGGGTCTCTAGG AGGCCAAG-3'	3'-GTGCAGTGA GGCCAGATTC-5'

Results

AML-NK has lower ability to proliferate and weaker NCR expression after in vitro stimulation than HD-NK

Mean NK percentage of NK in PBMC was $2.42\% \pm 2.19$ in AML patients versus $7.6\% \pm 3.18$ in HD ($p < 0.05$) (Data not shown). After 17 days of in vitro expansion, HD-NK cells proliferative index was 312 ± 93 and NK cells percentage in cell culture increased from $7.6\% \pm 3.18$ – $46.8\% \pm 23.4$ ($p < 0.01$). To reach almost the same enrichment values in AML patients ($33.45\% \pm 18.88$ of NK cells and a proliferative index of 79 ± 19), the culture was carried on 31 days. NK cell expansion induced an increase in NCRs and NKG2D expression in all AML-NK (Fig. 1). Comparison of HD-NK cells and AML-NK cells showed that MFI ratios were, respectively, 41 versus 58 % for NCR1/NKp46 ($p < 0.05$), 683 versus 262 % for NCR2/NKp44 ($p < 0.05$), 93 versus 54 % for NCR3/NKp30 ($p < 0.05$), and 240 versus 40 % for NKG2D ($p < 0.05$).

NCRs expression of HD-NK and NK-92 cells are down-regulated in presence of AML blasts

After 5 days of co-culture with AML blasts compared to control group (co-culture with HD-PBMC), MFI for NCR in HD-NK cells decreased of 28 % (12.78 ± 1.70 vs 9.22 ± 0.99 , $p < 0.05$) for NCR1/NKp46, 21 % (15.5 ± 4.65 vs 12.23 ± 3.01 , $p > 0.05$, [NS]) for NCR2/NKp44 and of 20 % (10.19 ± 2.15 vs 8.15 ± 1.76 , $p < 0.05$) for NCR3/NKp30. As control, no significant difference was observed in NKG2D expression (16 % decrease (16.12 ± 3.51 vs 13.53 ± 2.73 , $p > 0.05$, [NS])) (Fig. 2).

Analysis of the NCR messenger RNA level variation following AML blast co-culture by performing RT-qPCR found similar results. Mean expression for NCR1/NKp46 decreased of 42.2 % (57.8 ± 24.5 vs 100 %, $p < 0.05$), NCR2/NKp44 mean expression increased of 4 % (104.3 ± 44.8 , [NS]), NCR3/NKp30 decreased of 43 % (56.9 ± 48 , $p < 0.05$), and NKG2D decreased of 15.7 % (84.2 ± 28.1 , [NS]) (Fig. 3).

Furthermore, after 5 days of co-culture, NCR were also down-regulated in NK-92 co-culture with Molm-14 AML cell line. Compared to control group (NK-92 cultured without AML cell line), NCR MFI in NK-92 cells cultured with Molm-14 decreased of 40.8 % (4.13 ± 0.36 vs 2.44 ± 0.33 , $p < 0.01$) for NCR1/NKp46, of 22.5 % (2.16 ± 0.17 vs 1.67 ± 0.06 , $p < 0.01$) for NCR2/NKp44 and of 29 % (3.36 ± 0.46 vs 2.39 ± 0.20 , $p < 0.05$) for NCR3/NKp30 (Fig. 4).

In silico analysis revealed common putative binding site ETS-1 in NCR promoters

Binding sites of common transcription factors (TF) upstream of the three NCR genes [−8 Kb; TSS] were determined using Mapper2 database (Table 2). Focus was then put on ETS-1 TF, taking into account the involvement of ETS-1 TF in NK cell development and cytotoxicity in mice model. The region [−8 Kb; TSS] of NCR promoters was scanned with the ETS-1 matrix motif from JASPAR database (Fig. 5) using MatrixScan from the RSAT suite. This in silico approach identified several putative binding sites of ETS-1 upstream the three NCRs genes (Data not shown). Among these binding sites, three sites were chosen closest to the TSS and also found in conserved regions between seven different species (rhesus, chimp, mouse, chicken, dog, elephant and zebrafish) defined from GERP elements in 37-way multiple genome alignments (Cite PMID 19906699). These predicted ETS-1 binding sites coordinates were chr19: 54,906,112–54,906,119 (position −76; −69 from TSS with p value = $3.4e-05$) for NCR1/NKp46, chr6: 41,303,270–41,303,277 (position −345; −338 from TSS with p value = $9.1e-04$) for NCR2/NKp44 and chr6: 31,593,068–31,593,076 (position −7917; −7910 from TSS with p value = $9.5e-04$) for NCR3/NKp30 (data not shown).

In NK-92 cells, ETS-1 transcription factor binds in vivo to the in silico predicted region in NCRs promoters

To test the recruitment in vivo of ETS-1 in NK-92 cell line, a pair of primers was designed to perform site-specific chromatin immuno-precipitation (ChIP) assay. After cross-linking and sonication, the chromatin extract was immuno-

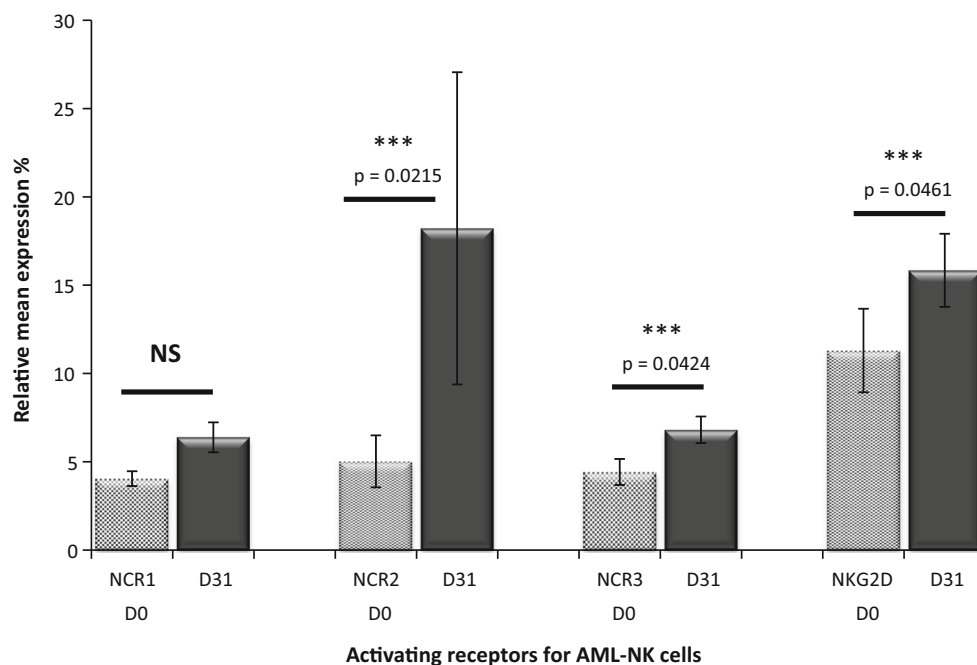


Fig. 1 NCR expression of AML-NK cells after in vitro expansion. Evolution of activating receptors (NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D) expression expressed in mean fluorescence intensity (MFI) compared

to isotypic control, before and after (black bars) NK cells expansion. ***Statistically significant difference ($p < 0.05$). NS no statistically significant difference

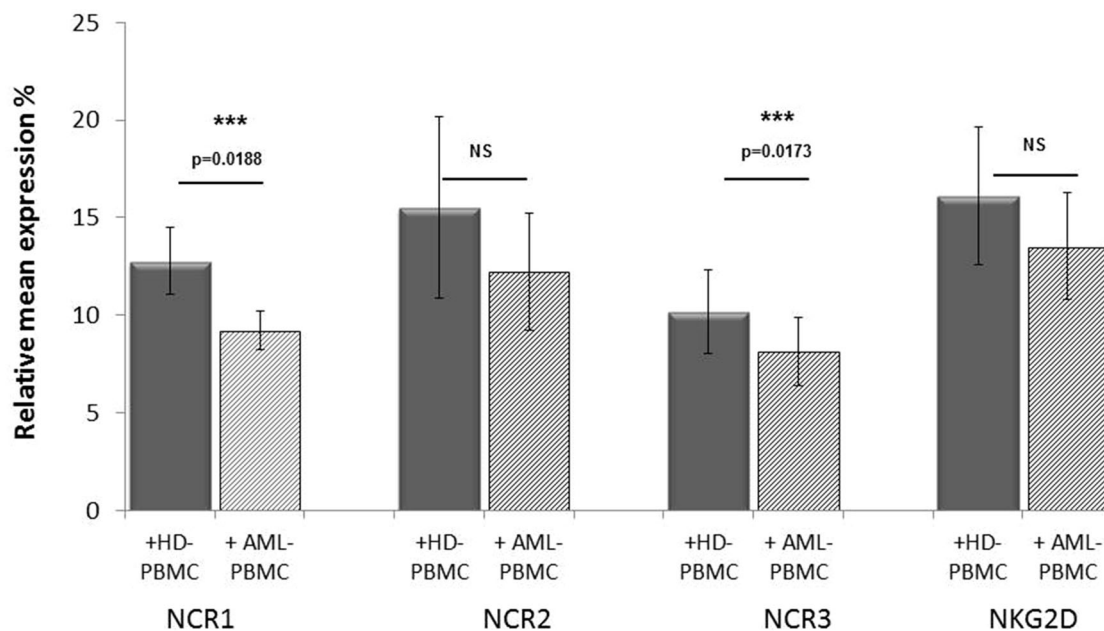


Fig. 2 HD-NK cell activating receptors expression in presence of AML-PBMC. Evolution of NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D expression in mean fluorescence intensity (MFI), background levels were measured using isotypic control, after co-culture of HD-NK

cells with AML-PBMC compared to the co-culture with HD-PBMC (black bars). ***Statistically significant difference ($p < 0.05$). NS no statistically significant difference

precipitated. The three regions of ETS-1 binding sites were amplified by PCR using specific primer pairs. Strong recruitment of ETS-1 on targeted regions upstream the three *NCRs* genes were observed (Fig. 6a, b). These results

are consistent with Electrophoretic Motility Shift Assay (EMSA) that showed a band shift after incubating NCR1, NCR2 and NCR3 sequences containing EST-1 motif with nuclear proteins from NK92 (data not shown).

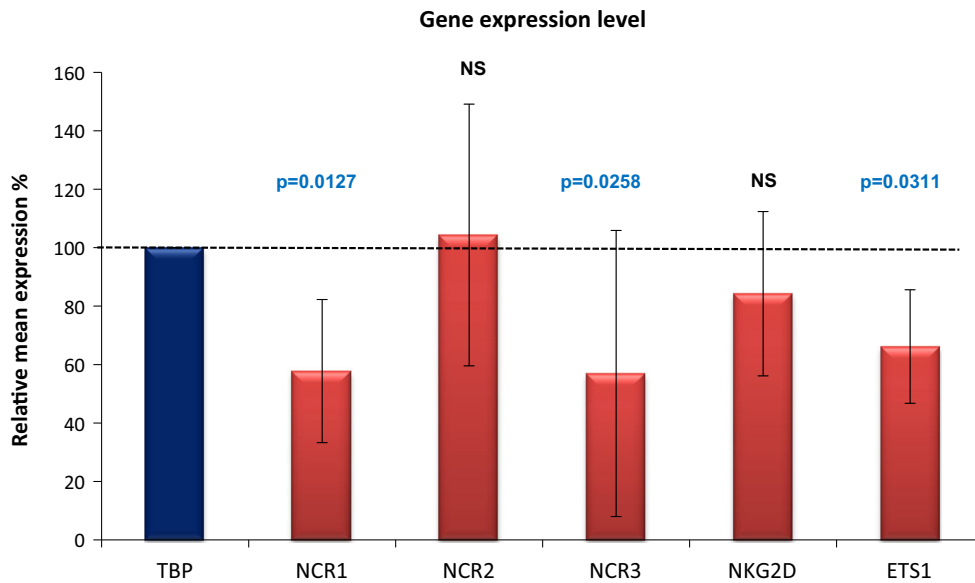


Fig. 3 Gene expression level of activating receptors after co-culture with AML-PBMC. Histograms represent the relative mean expression in percentage of NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D genes when HD-NK cells are co-cultured with PBMC from AML patients, compared

to the same HD-NK cells co-cultured with PBMC from donors (corresponding to 100 %). Results were normalized with TBP housekeeping gene

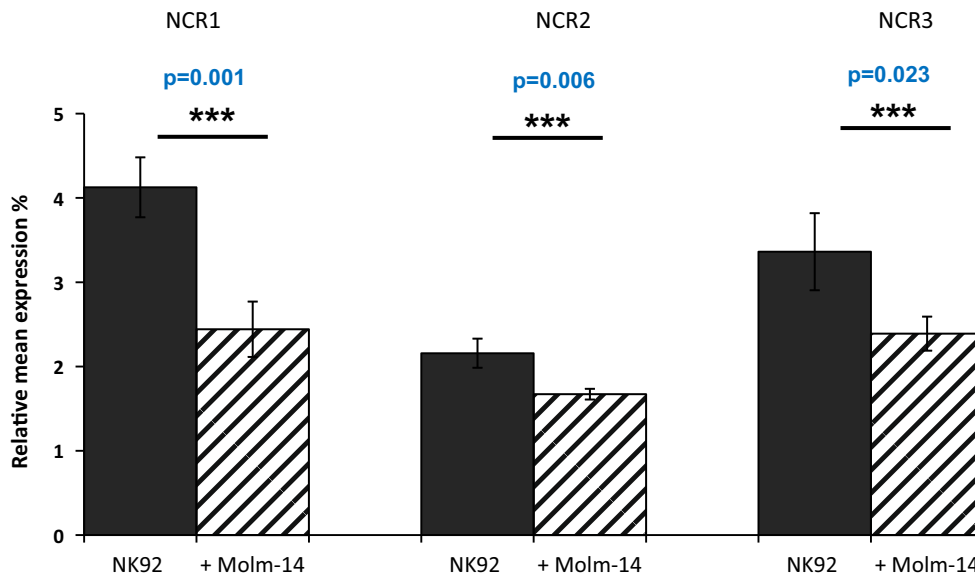


Fig. 4 Activating receptors expression in NK-92 co-cultured with leukemic blasts. Evolution of NCR1, NCR2 and NCR3 expressions, in MFI ratio, after NK-92 co-culture with Molm-14 AML cell line

compared to NK-92 with medium (black bars). ***Statistically significant difference ($p < 0.05$). NS no statistically significant difference

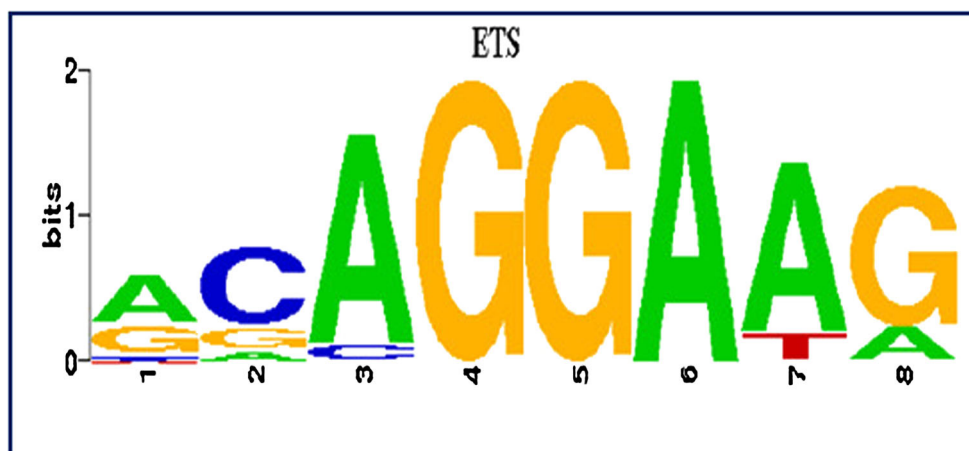
ETS-1 gene expression decreased in presence of AML blasts

In HD-NK cells co-cultured during 5 days with AML blast ETS-1 gene expression level decreased of 34 % (66.1 ± 19.4 vs 100 %; $p < 0.05$) compared to the control group (co-

culture with HD-PBMC, condition of calibration = 100 %) (Fig. 3). ETS-1 transcript level followed the same regulation than NCR1/NKp46 and NCR3/NKp30 mRNA, which, respectively, decreased of 42.2 % (57.8 ± 24.5 vs 100 %, $p < 0.05$) and 43 % (56.9 ± 48 , $p < 0.05$). No evolution (increase or decrease) of NCR2 has been observed.

Table 2 List of common putative binding site of transcription factors upstream NCR genes, in [-8 Kb, TSS] region

Transcription factor	NCR1	NCR2	NCR3
AML1	-171 to 166 -273 to 268	-84 to 79 -265 to 260	-90 to 95
br_Z1	-237 to 225	-26 to 14	-406 to 418
CP2	-179 to 169	-130 to 120	-134 to 144
dl_2	-307 to 298	-105 to 96	-91 to 100
Dof2	-76 to 71 -91 to 86	-334 to 329	-126 to 131
ETS1	-37 to 33 -360 to 356	-257 to 253	-231 to 235
Hand1_Tcfe2a	-243 to 235	-132 to 124	-232 to 240
HMG_1	-405 to 397	-407 to 399	-285 to 293
MZF1_5_13	-122 to 114	-61 to 53	-19 to 27
NFKB1	-307 to 297	-289 to 281 -106 to 96	-91 to 101
PacC	-19 to 14	-439 to 434	-160 to 165
RELA	-338 to 329	-105 to 96 -498 to 489	-91 to 100
RREB1	-71 to 52	-51 to 32 -134 to 115 -477 to 458	-16 to 35 -133 to 152 -212 to 231
Sp1	-16 to 7	-361 to 353	-22 to 30 -184 to 192
Su(H)	-282 to 268 -354 to 340	-93 to 79 -164 to 150	-89 to 103
TP53	-296 to 277 -302 to 283	-459 to 440	-130 to 149
zmf143	-125 to 106 -218 to 199	-224 to 205	-263 to 282

Fig. 5 ETS-1 motif. ETS1 motif was retrieved from JASPAR core vertebrates' database

Microarray analysis of NK after in vitro cell expansion shows a specific transcriptomic signature including ETS-1 up-regulation (Fig. 7)

After conducting a significant analysis of microarray (SAM) with a FDR = 0 % with the four groups (HD-NK \pm expansion, AML-NK \pm expansion), a major hierarchical clustering was obtained, distinguishing NK cells with and without expansion (Cluster I and II) regardless of the origin of NK (HD-NK vs AML-NK). A specific transcriptomic signature of very few genes allowed distinction of AML-NK from HD-NK cells (see below), although most frequent differences were linked to the presence or absence of NK cells culture. Hierarchical clustering and the two differential clusters (I and II) are showed in the heatmap (Fig. 7a): 5844 probe sets, coding for 3500 genes, were differentially expressed in expanded vs unexpanded NK.

Microarray analysis revealed AML-NK cells specific transcriptomic signature, erased by NK cells expansion. The transcriptomic analysis revealed a specific signature that differentiates AML-NK cells from HD-NK cells. However, cluster (b) separates AML from HD-NK cells only after sorting, not after in vitro expansion. Indeed, NK cells expansion erased the differential transcriptomic signature between NK cells from AML or HD patients. In this cluster, CD86, CLIC4 and CREG1 were related to lymphocytes differentiation and activation. However, remaining genes are not directly involved in AML or NK cells functions or biology according to scientific literature.

A sub-cluster of interest (c) was isolated with the heatmap (a). It was implicated in NK cell-mediated cytotoxicity, with up-regulated expression after culture of NCR1/NKp46, NCR3/NKP30, KLRF1, KLRC1, KLRC3, CD244, PRDM1, CD7, NKG2D and ETS-1, in HD-NK and AML-

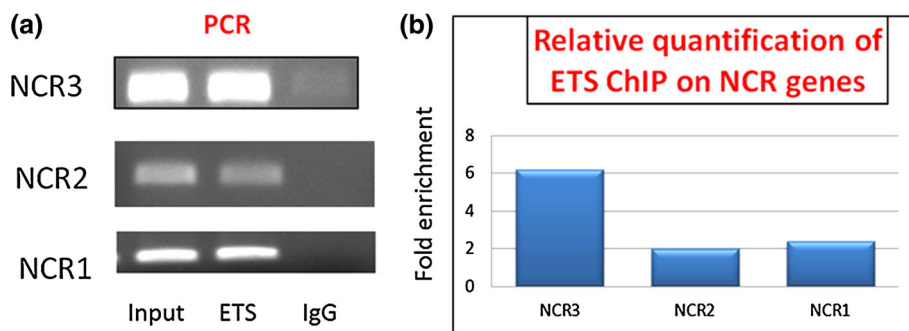


Fig. 6 In vivo recruitment of ETS-1 transcription factor on the human NCR genes promoter. **a** Semi-quantitative PCR results of electrophoresis on an agarose gel. **b** Results of the quantitative

chromatin immunoprecipitation assays performed using specific antibodies for ETS-1 as described in materials and methods

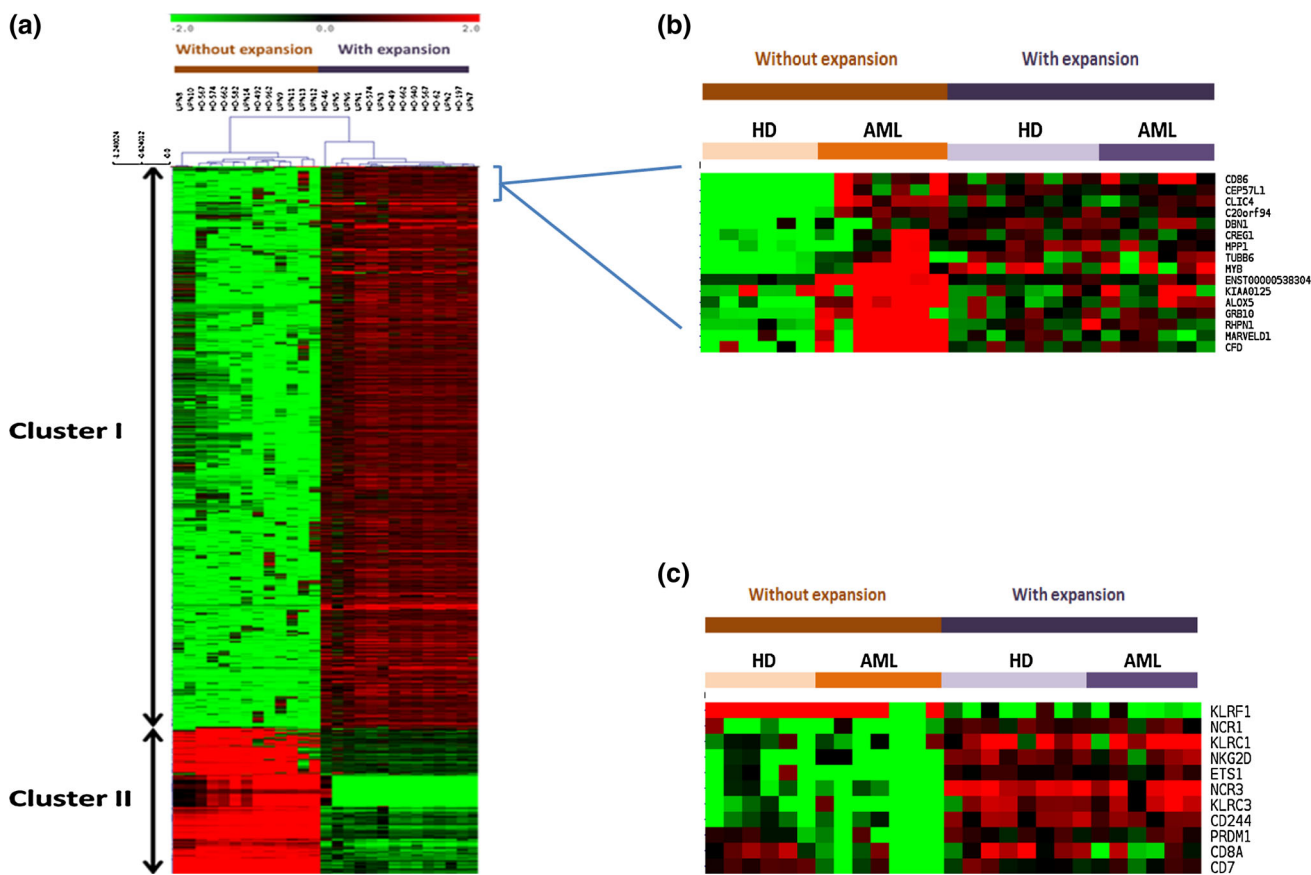


Fig. 7 Heatmap of gene expression changes in AML patients versus donors with and without NK cell expansion. **a** The hierarchical clustering represents overexpressed (red) and underexpressed (green) genes in sorted NK cells from 12 AML patients (UPN) and 14 HD. Normalized signal intensities were treated with the SAM analyze to highlight the differentially expressed genes with a FDR set at 0 %. Major hierarchical clustering distinguishes NK cells with and without expansion (Cluster I and II) regardless of the origin of NK (HD-NK vs AML-NK). **b** A specific transcriptomic signature including very few

genes distinguished AML-NK cells from HD-NK cells. AML-NK cells specific transcriptomic signature. Microarray analysis revealed AML-NK cells specific transcriptomic signature. NK cells expansion erased the differential transcriptomic signature between NK cells from AML patients or HD. **c** Sub-cluster of genes of interest after NK cell expansion. After NK cell expansion genes like NCR1/NKp46, NCR3/NKP30, NKG2D and ETS-1 were significantly up-regulated in AML patients and healthy donors (HD)

NK. Most of the other genes were related to lymphocytes differentiation and activation (CD8A, PRDM1 and FAM113B). Other genes with differential expression

between NK cells with or without expansion failed to give more clues, since their function is still unknown. Expression level of six differentially expressed genes was checked

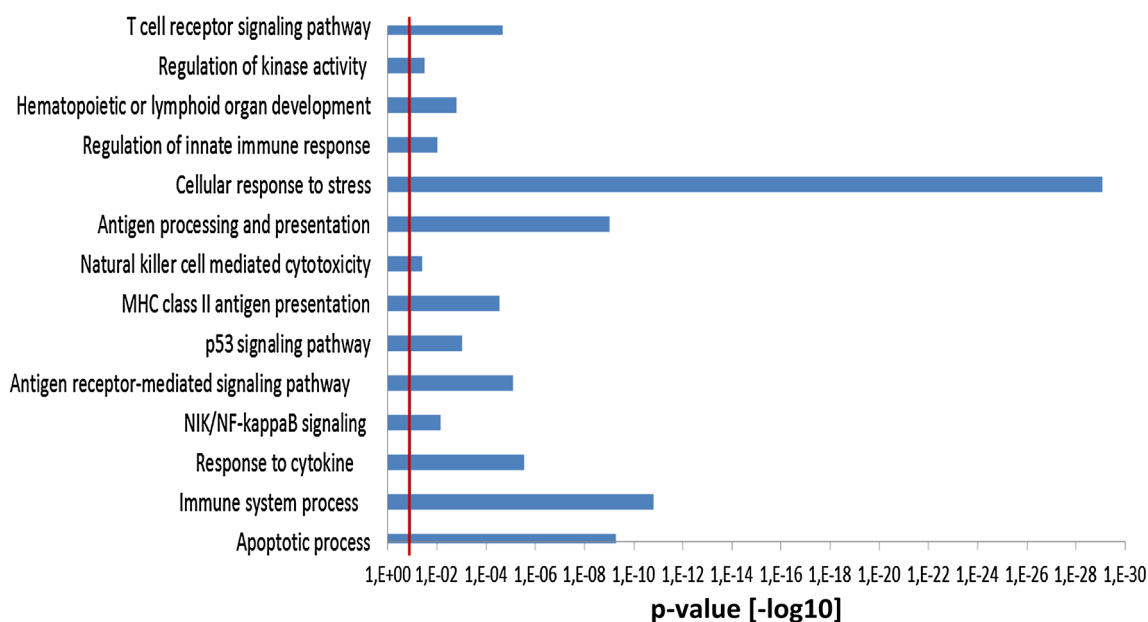


Fig. 8 Functional annotation. Summary of some functional enrichment terms (GO terms) found with g: profiler web server. In ordinate, corrected p values (Bonferroni correction) of each Go term and in abscissa, selected Go terms. All the Go terms are statistically

significant with corrected p values <0.05 . Functional annotations correspond to immune responses, cellular response to stress, and cytokine-related response were the most significant pathways linked to the NK expansion

with RT-qPCR for microarray analysis validation (data not shown).

The functional annotation was performed using g: profiler (Fig. 8). Annotations implied in triggering immune and cellular responses to stress or cytokines-related response were the most significant pathways linked to the NK expansion. All selected pathways were statistically significant with corrected <0.05 p values.

Discussion

Despite stimulation potential of EBV feeder cell line and high concentration of IL-2 used in vitro for NK cell expansion, AML-NK showed slow and low proliferation ability 4 times weaker than HD-NK, even after 30 days of culture. Moreover, only a partial restoration of NK activating receptors was observed in comparison with HD-NK cells. However, this expansion protocol could be suitable for cellular therapy with NK cells activation ex vivo since it enhances NCR1/NKp46 and NCR3/NKp30 expression.

Nonetheless, since the AML-NK results were less positive than with HD-NK, we aimed to better understand the mechanisms underlying this down-regulation by focusing on the regulation of transcription of the three NCRs. Their coordinated expressions led us to search for a common transcription factor and transcription factor ETS-1 seemed particularly interesting since NK cells from ETS-1-

deficient mice have decreased cytotoxicity. At the earliest stages of NK cell development in mice, the ETS-1 factor promotes expression of activating receptors such as NKp46 [19]. However, it is unclear whether these transcription factors play roles in NK cytotoxicity [1, 24–28]. A homologous motif of the ETS-binding site was identified in the mouse promoter that enhanced perforin transcription in cytotoxic cells. This study also identified two DNA-binding proteins that interact with this element, which are thought to be members of the ETS transcription factors family [28, 29]. We have demonstrated that in NK-92 cells, ETS-1 transcription factor (TF) binds in vivo the in silico predicted region in NCR promoters. Moreover, ETS-1 gene expression is decreased in presence of AML blasts and follows the same expression pattern than NCR. However, this experimentation did not allow concluding whether ETS-1 binds directly to the targeted region because many TF cooperate to induce gene transcription in genes regulation. Further studies, especially using RNA interference, should try to refine this hypothesis.

Khaznadar et al. [30] recently described that defective functions of AML-NK are associated with a leukemic blast transcriptional signatures of immune evasion, which questions NK cells defective functions origins, perhaps also linked to a particular specific signature of deficient cytotoxicity.

The transcriptomic comparison of HD-NK and AML-NK, with and without in vitro culture and expansion, allowed two main clusters identification (cluster I and II)

that differentiate primary unexpanded NK cells from expanded/activated NK cells, regardless of their origin (HD versus AML patients). A specific AML-NK signature (Fig. 7b) was detected in unexpanded NK cells and given the genes involved; we do not know to what extent this signature could be specific of defective cytotoxicity leading to innate immunity escape. But interestingly, this specific transcriptomic signature was reversible after NK cells expansion. Remarkably, we noted that, under our specific culture conditions, NK cells expansion up-regulated expression of central molecules of NK functions, i.e., NCR, NKG2D (cytotoxicity) and ETS-1 (a pivotal TF for lymphocytes) in both HD-NK and AML-NK, which was associated with the recovery of a cytotoxic phenotype. Moreover, besides NK cells mediated cytotoxicity, it's more an extensive restoration of the immune functions of NK cells which was observed. Indeed, many pathways implicated in triggering immune responses, cellular response to stress and relating to cytokines response were enhanced after NK cells expansion. Such results are encouraging regarding our ability to restore in vitro AML-NK cytotoxicity in all levels (from genes expression to phenotype) and provides a new conceptual support for innovative cellular therapy based on NK cells expansion in vitro before reinfusion in AML patients.

In conclusion, NK cells from AML patients showed slow and low proliferation ability that was 4 times weaker than HD-NK, even after 30 days of culture. Only a partial restoration of NK activating receptors was observed in comparison with HD-NK cells. Microarrays analysis revealed a NK cells specific transcriptomic signature in patients with acute myeloid leukemia. However, NK cells expansion erased this signature in vitro and up-regulated expression of central molecules of NK functions, such as NCR, NKG2D and ETS-1, suggesting ETS-1 transcription factor may play a major role in NCR co-regulation. ETS-1 binds in vivo to an in silico predicted region in NCR promoters and its expression decreased in presence of AML blasts, following the same expression as NCR.

Acknowledgments We would like to thank INSERM, AP-HM and Aix-Marseille University for grants. We would like to thank Martin VILLALBA who gave us graciously EBV cell line. We are grateful to the patients who gave their informed consent to the use of their samples for research. We are grateful to the IBISA Transcriptomics and Genomics Marseille-Luminy (TGML) platform were supported by the France Génomique National infrastructure. We thank Laurence Borge for assistance and the use of the cell culture platform facilities (CRCM U1068, Marseille) Plateforme de Culture Cellulaire de Marseille-Luminy, bâtiment TPR2, 163 Avenue de Luminy, 13009 Marseille. We thank also Geneviève Victorero for technical supports. This work was supported by grants from AP-HM, Assistance Publique—Hôpitaux de Marseille, (AORC APHM Junior), and Aix-Marseille Université, TGML platform supported by the France Génomique.

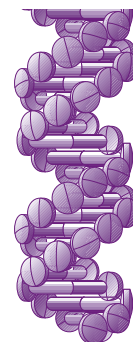
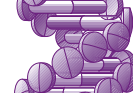
Compliance with ethical standards

Conflict of interest All authors declare no financial conflict of interest.

References

- Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 2010;115:453–74.
- Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LAG, Wu X, Jamison PM, et al. Annual report to the nation on the status of cancer, 1975–2001, with a special feature regarding survival. *Cancer*. 2004;101:3–27.
- Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Büchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the international working group for diagnosis, standardization of response criteria, treatment outcomes, and reporting standards for therapeutic trials in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 2003;21:4642–9.
- Asai O, Longo DL, Tian ZG, Hornung RL, Taub DD, Ruscetti FW, et al. Suppression of graft-versus-host disease and amplification of graft-versus-tumor effects by activated natural killer cells after allogeneic bone marrow transplantation. *J Clin Invest*. 1998;101:1835–42.
- Jiang YZ, Barrett AJ, Goldman JM, Mavroudis DA. Association of natural killer cell immune recovery with a graft-versus-leukemia effect independent of graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Ann Hematol*. 1997;74:1–6.
- Lavigne P, Acres S. Advisory committee on epidemiology, resolution. *Can Dis Wkly Rep Rapp Hebd Mal Au Can*. 1989;15:127–9.
- Elkins WL, Pickard A, Pierson GR. Deficient expression of class I HLA in some cases of acute leukemia. *Cancer Immunol Immunother CII*. 1984;18:91–100.
- Urlacher A, Falkenrodt A, Tongio MM, Mayer S. HLA class I antigens on normal and leukemic cells (quantitative analysis). *Tissue Antigens*. 1987;29:237–45.
- Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci M-J, Reviron D, et al. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2002;99:3661–7.
- Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sébahoun G. Expression of natural killer cell activating receptors in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2012;135:151–7.
- Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainy D, Olive D, et al. Deficient expression of NCR in NK cells from acute myeloid leukemia: evolution during leukemia treatment and impact of leukemia cells in NCRdull phenotype induction. *Blood*. 2007;109:323–30.
- Kiladjian J-J, Bourgeois E, Lobe I, Braun T, Visentin G, Bourhis J-H, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20:463–70.
- Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T, et al. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology*. 2013;139:338–41.
- Costello RT, Knoblauch B, Sanchez C, Mercier D, Le Treut T, Sébahoun G. Expression of natural killer cell activating receptors

- in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Immunology*. 2012;135:151–7.
15. Martner A, Rydström A, Riise RE, Aurelius J, Brune M, Foà R, et al. NK cell expression of natural cytotoxicity receptors may determine relapse risk in older AML patients undergoing immunotherapy for remission maintenance. *Oncotarget*. 2015;6:42569–74.
 16. Martner A, Rydström A, Riise RE, Aurelius J, Anderson H, Brune M, et al. Role of natural killer cell subsets and natural cytotoxicity receptors for the outcome of immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Oncoimmunology*. 2016;5:e1041701.
 17. Brune M, Hansson M, Mellqvist UH, Hermodsson S, Hellstrand K. NK cell-mediated killing of AML blasts: role of histamine, monocytes and reactive oxygen metabolites. *Eur J Haematol*. 1996;57:312–9.
 18. Thorén FB, Romero AI, Brune M, Hellstrand K. Histamine dihydrochloride and low-dose interleukin-2 as post-consolidation immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Expert Opin Biol Ther*. 2009;9:1217–23.
 19. Ramirez K, Chandler KJ, Spaulding C, Zandi S, Sigvardsson M, Graves BJ, et al. Gene deregulation and chronic activation in natural killer cells deficient in the transcription factor ETS1. *Immunity*. 2012;36:921–32.
 20. Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J. g:Profiler—a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acid Res*. 2007;35(suppl 2):W193–200.
 21. van Helden J, André B, Collado-Vides J. Extracting regulatory sites from the upstream region of yeast genes by computational analysis of oligonucleotide frequencies. *J Mol Biol*. 1998;281:827–42.
 22. Turatsinze J-V, Thomas-Chollier M, Defrance M, van Helden J. Using RSAT to scan genome sequences for transcription factor binding sites and cis-regulatory modules. *Nat Protoc*. 2008;3:1578–88.
 23. Thomas-Chollier M, Defrance M, Medina-Rivera A, Sand O, Herrmann C, Thieffry D, et al. RSAT 2011: regulatory sequence analysis tools. *Nucleic Acids Res*. 2011;39:W86–91.
 24. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting CN, Walunas TL, Lanier LL, et al. The Ets-1 transcription factor is required for the development of natural killer cells in mice. *Immunity*. 1998;9:555–63.
 25. Lacorazza HD, Miyazaki Y, Di Cristofano A, Deblasio A, Hedvat C, Zhang J, et al. The ETS protein MEF plays a critical role in perforin gene expression and the development of natural killer and NK-T cells. *Immunity*. 2002;17:437–49.
 26. Townsend MJ, Weinmann AS, Matsuda JL, Salomon R, Farnham PJ, Biron CA, et al. T-bet regulates the terminal maturation and homeostasis of NK and Valpha14i NKT cells. *Immunity*. 2004;20:477–94.
 27. Wang JH, Nichogiannopoulou A, Wu L, Sun L, Sharpe AH, Bigby M, et al. Selective defects in the development of the fetal and adult lymphoid system in mice with an Ikaros null mutation. *Immunity*. 1996;5:537–49.
 28. Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nat Rev Immunol*. 2004;4:900–11.
 29. Koizumi H, Horta MF, Youn BS, Fu KC, Kwon BS, Young JD, et al. Identification of a killer cell-specific regulatory element of the mouse perforin gene: an Ets-binding site-homologous motif that interacts with Ets-related proteins. *Mol Cell Biol*. 1993;13:6690–701.
 30. Khaznadar Z, Boissel N, Agaugué S, Henry G, Cheok M, Vignon M, et al. Defective NK cells in acute myeloid leukemia patients at diagnosis are associated with blast transcriptional signatures of immune evasion. *J Immunol*. 1950;2015(195):2580–90.



Case Report

For reprint orders, please contact: reprints@futuremedicine.com

Yin and yang of cytidine deaminase roles in clinical response to azacitidine in the elderly: a pharmacogenetics tale

Azacitidine is a mainstay for treating hematological disorders. Azacitidine is metabolized by cytidine deaminase, coded by a highly polymorphic gene. Here, we present two elderly patients with opposite clinical outcomes after azacitidine treatment. First, an acute myeloid leukemia patient showed life-threatening toxicities, but outstanding complete remission, after a single round of azacitidine. Further investigations showed that this patient was cytidine deaminase *79A>C* (rs2072671) homozygous with a marked deficient phenotype. Next, a chronic myelomonocytic leukemia patient displayed complete lack of response despite several cycles of azacitidine. This patient had a rapid-deaminator phenotype linked to the *-31delC* deletion (rs3215400). These polymorphisms lead to opposite clinical outcomes in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine, thus suggesting that determining cytidine deaminase status could help to forecast clinical outcome.

Keywords: azacitidine • cytidine deaminase • efficacy • genetic polymorphism • myelodysplastic syndromes • toxicity

Demethylating agent azacitidine is indicated for treating frail patients with myelodysplastic syndromes who are not eligible for hematopoietic stem cell transplantation. In particular, azacitidine is now a mainstay in acute myeloid leukemia (AML) patients, including as a monotherapy in the elderly [1–3]. Additionally, chronic myelomonocytic leukemia (CMML) is a clonal disorder of hematopoietic stem cells [4] whom treatment is still challenging with dismal prognosis and 20 months median survival; and azacitidine has recently shown significant efficacy in CMML patients, making this drug an interesting option in this disease [5]. Standard dosing and scheduling of azacitidine is 75 mg/m² daily over 1 week, administered as 28-days cycles, until disease progression or when severe toxicities occur. Drug-induced myelosuppression can sometime be severe with 30% of patients delaying treatment [6]. As with most cytotoxics, age is a risk factor because 13% of toxicity-related treatment discontinuation and 8% of fatal outcomes have been described in

the elderly [7]. Azacitidine pharmacokinetics primarily depends on cytidine deaminase (CDA), the liver enzyme that detoxifies the drug by deamination. *CDA* gene is highly polymorphic, and CDA deficiency has been extensively studied as a risk for life-threatening toxicities with a variety of nucleosidic analogs such as gemcitabine, cytarabine [8,9] or azacitidine [10,11]. Of note, two opposite CDA status can be found [9,12], depending on the underlying genetic polymorphisms. Indeed, both deficiency syndrome (i.e., with *79A>C* polymorphism with unclear mechanism of action yet, or *208G>A* polymorphism modifying an amino-acid residue next to the catalytic site of the enzyme) or conversely CDA rapid-deaminator phenotype (i.e., with *-31delC* promoter deletion increasing mRNA expression) have been described. Here, we present two CMML and AML elderly patients treated with standard azacitidine. Both patients showed outstanding clinical outcomes (i.e., life-threatening toxicities with complete response for one,

Raphaëlle Fanciullino^{1,2},
Cédric Mercier³, Cindy
Serdjebi¹, Geoffroy Venton³,
Julien Colle³, Frédéric Fina⁴,
L'Houcine Ouafik⁴, Bruno
Lacarelle¹, Joseph Ciccolini^{*1}
& Régis Costello³

¹SMARTc Unit, Pharmacokinetics
Laboratory, UMR_911 CRO2 AMU
Marseille, France

²Pharmacy Unit, La Conception University
Hospital of Marseille, APHM, Marseille,
France

³Onco-Hematology Unit, La Conception
University Hospital of Marseille, APHM,
Marseille, France

⁴Transfer Oncology Laboratory, Nord
University Hospital of Marseille, APHM,
Marseille, France

*Author for correspondence:
joseph.ciccolini@univ-amu.fr

and complete lack of response for the other one). Genetic and phenotypic investigations were therefore conducted on CDA as a possible culprit for the cases.

Report of cases

Case 1

The first patient was a caucasian 84 years old man hospitalized for AML6 with hemoglobin 5.5 g/dl, leukocytes 3.54 G/l with 22% blasts and platelets 40 G/l. Liver function was normal, but the patient presented a history of mild renal impairment (i.e., creatinine clearance 40 ml/min). After a first azacitidine cycle, this patient developed pancytopenia, acute respiratory distress, severe diarrhoea, grade-4 mucositis, aplasia and sepsis. Broad-spectrum antibiotherapy and blood transfusion were initiated. Aplasia lasted 30 days, despite G-CSF support and symptomatic treatment. Despite the fact that azacitidine was discontinued after this only cycle, 1 month later complete remission was observed (i.e., 3% blast count with normal medullar activity, hemoglobin 9.5 g/dl, leukocytes 4.19 G/l with no blasts and platelets 223 G/l). To understand this outstanding response, CDA status was investigated retrospectively following a double strategy. First, phenotype was established using a functional test by measuring spectrophotometrically secreted CDA activity in serum as a surrogate for CDA activity in liver as described elsewhere [13]. Briefly, ex-vivo enzymatic assay is performed from serum, accounting for global CDA activity in the body. In this patient, CDA residual activity in serum was 1.74 U/mg, a value 50% lower than mean CDA activities usually recorded in our institution (Figure 1). Next, after that written informed consent to perform germline genetic investigations was obtained, search for canonical genetic polymorphisms associated with CDA deficiency in caucasians (i.e., *CDA* 79A>C) was performed by high-resolution melting (HRM) analysis, as extensively described previously [14]. Screening for genetic polymorphisms affecting *CDA* gene confirmed that this patient was homozygous indeed for the 79A>C polymorphism (rs2072671, Figure 2A).

Case 2

The second patient was a caucasian 80 years old man with CMML-1, displaying favorable International Prognostic Scoring System, but with rapid increase of white blood cells associated with thrombocytopenia aggravation. The patient had no co-morbidities (i.e., impaired liver or renal functions were normal). Patient was standardly treated with azacytidine and hydroxyurea. After two cycles of administration, no response was observed with increased peripheral blood counts up to 183 G/l. CMML progression was further characterized by hyperleukocytosis and acquisition of new cytogenetic abnormalities. This lack of efficacy led

to stopping the treatment. Using the same methodology described above, phenotyping the patient evidenced an ultradeaminator status (CDA activity at 10.08 U/mg, i.e., 194% higher than mean CDA values, Figure 1). Next, after that written informed consent to perform germline genetic investigations was obtained, search for genetic polymorphisms associated with CDA rapid-deaminator status (i.e., deletion on CDA promoter -31delC [12]) was performed by HRM analysis as described previously [14]. HRM analysis confirmed that the ultrametabolizer status observed in this second patient was associated with the homozygous deletion on -31delC (rs3215400, Figure 2B).

Discussion

Genetic polymorphisms affecting drug-metabolizing enzymes in the liver have been associated with increased risk for treatment-related toxicities for decades. Changes in *DPYD*, *UGT1A1* or *TPMT* status are frequently reported as culprits for either severe or lethal toxicities with fluoropyrimidines, irinotecan or mercaptopurine, respectively, and screening for these polymorphisms is in full line with the current paradigm of precision medicine in oncology [15]. CDA is the pivotal enzyme implicated in the liver disposition of a variety of nucleosidic analogs and to date, genetic polymorphisms affecting *CDA* gene have been extensively investigated with gemcitabine [8,14], although several clinical reports suggest that this could be an issue with capecitabine and cytarabine as well [16,17]. CDA is implicated in the detoxification step of azacitidine, a cytotoxic with epigenetic hypomethylating mechanism of action that is widely used to treat a variety of myelodysplastic syndromes. Age has been identified as a risk factor for life-threatening toxicities with azacitidine [7], which can be an issue because myelodysplastic syndromes show more frequently in the elderly. In this respect, developing strategies to secure the administration of azacitidine in frail patients (e.g., elderly and pediatric populations) is a rising concern. Because no biomarker has been identified this far with this drug, identifying the possible causes for interindividual variability in drug exposure should help to forecast changes in clinical outcome. Among the variety of endogenous and exogenous factors likely to interfere with drug disposition and distribution in the body, genetic polymorphisms affecting *CDA* could be critical determinants and some early reports have suggested that this could be an issue indeed [10,11].

In this brief report we evidenced two opposite CDA status (i.e., deficiency and ultrarapid deaminator) in two elderly caucasian patients showing totally contradictory clinical outcomes, both being treated with standard azacitidine dosing for myelodysplastic syndromes. In the AML patient, CDA deficiency led to extremely

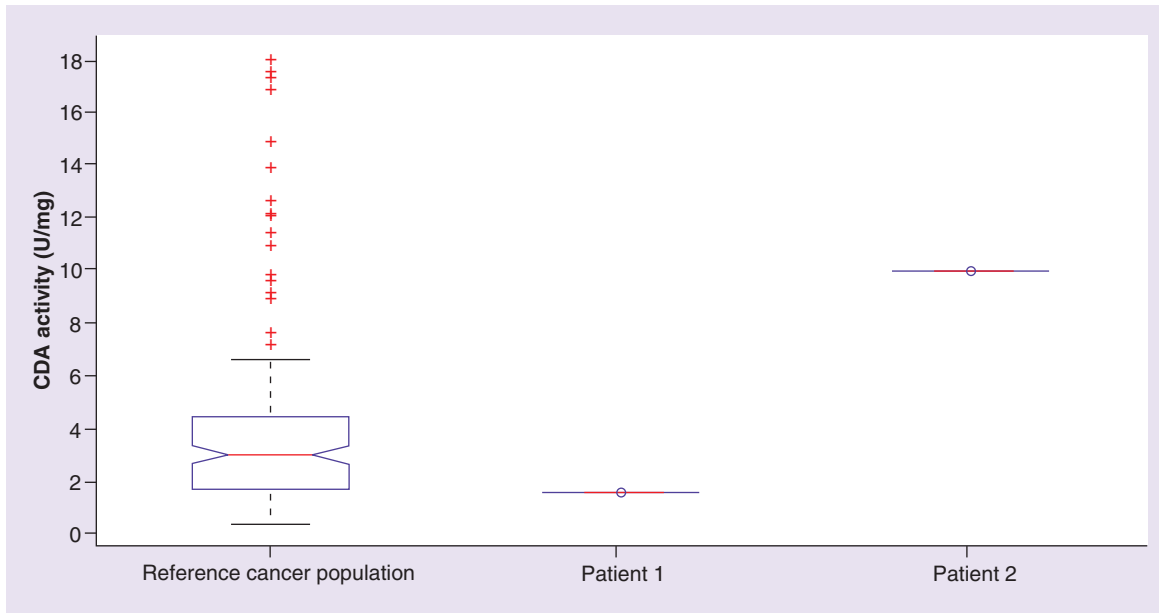


Figure 1. Cytidine deaminase phenotypic analysis of the patients. Patient 1 (AML) who displayed life-threatening toxicities with complete remission after a single round of azacitidine is considered as CDA deficient, whereas patient 2 (CMML) who had no toxicities and progressive disease despite two cycles of azacitidine is considered as rapid deaminator.

AML: Acute meloid leukemia; CDA: Cytidine deaminase; CMML: Chronic myelomonocytic leukemia.

severe toxicities including long-lasting aplasia and sepsis, but associated with outstanding complete remission after a single course. Of note, azacitidine is normally not expected to achieve such striking response in elderly patient, especially after only a single round of treatment [18,19]. This clinical observation is consistent with the hypothesis that $79A>C$ genetic polymorphism and reduced CDA activity increased azacitidine exposure, thus leading to higher efficacy eventually. The relationship between CDA deficiency and increase in both toxicities and efficacy has been mostly evidenced with gemcitabine to date [20] and the exact relevance of the $79A>C$ polymorphism the clinical outcome of patients treated nucleosidic analogs remains widely debated [21]. Conversely in the CMML patient, conversely, CDA rapid-deaminator status and $-31delC$ genotype led to treatment failure despite two complete cycles (i.e., up to 14 injections) of azacitidine. The $-31delC$ deletion has been associated with a loss of binding site for the E2F transcription factor indeed, thus increasing mRNA expression of CDA eventually. Beside, no toxicities were observed either in this second patient, an observation consistent with the hypothesis that high CDA activity resulting from increased mRNA expression probably detoxified most of the injected drug, thus impairing its efficacy while sparing patient from drug-related toxicity. To date, the relationship between CDA rapid-deaminator phenotype and treatment failure has been solely demonstrated with gemcitabine [22] and

our present data strongly suggest that this could be an issue with azacitidine as well. Developing strategies to individualize dosing is a rising trend in clinical oncology. Biomarker-based medicine is mostly based upon the determination of genetic or molecular abnormalities at the tumor level, thus helping decision-making for treatment choices. To date, no such predictive markers have been described with widely prescribed azacitidine. Here, we show that germline polymorphisms could be as important as somatic mutations to ensure a better efficacy/toxicity balance of this drug at bedside. Most patients with myelodysplastic syndromes scheduled for azacitidine treatment are elderly (median age range: 65–75 years), and this drug has been recently approved in children. In this respect, developing adaptive dosing strategies using CDA status as a covariate to tailor azacitidine dosing could help to ensure a better safety when administering this drug to these frail populations. The limitations of this case series include a small sample size of two patients only and the fact that CDA status has been recorded retrospectively, once unusual clinical outcome had drawn the attention of the practitioners. For the first patient, beside a marked CDA deficiency (i.e., 50% reduction in activity), the patient has an history of renal impairment as well. It is thus not possible to totally exclude that both toxicities and efficacy we observed can be attributed to a slowdown in the urinary excretion of azacitidine [23], in addition to a reduced breakdown of the drug in the liver as suggested

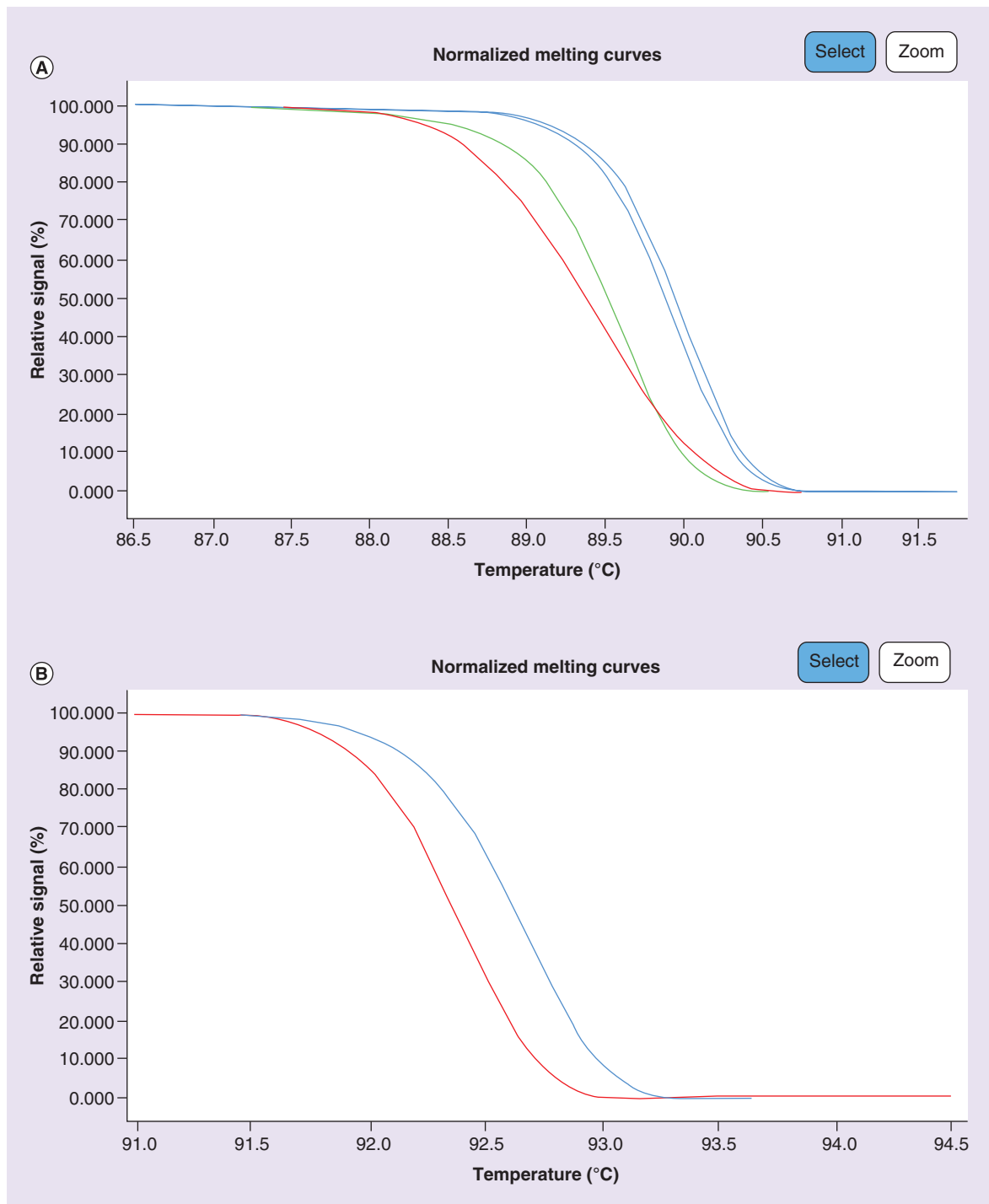


Figure 2. High-resolution melting analysis of cytidine deaminase polymorphisms in patients with hematological disorders. (A) HRM analysis for 79A>C (rs2072671) in the AML patient. The right double curve stands for the homozygous mutated standard and the patient, whereas the parallel curve in the middle represents the wild-type standard. The third curve on the left stands for the heterozygous standard. (B) HRM analysis for -31delC (rs3215400) in the CMML patient. The left curve represents the wild-type standard and the curve on the right is the melting curve of the patient. The data suggest that the patient carries the homozygous-mutated genotype. AML: Acute myeloid leukemia; CMML: Chronic myelomonocytic leukemia; HRM: High-resolution melting.

by the 79A>C genotype. To address these limitations, we aim to further investigate prospectively the relevance

of determining CDA status in larger cohort of patients scheduled for azacitidine treatment.

Conclusion

In this double case report, we showed that CDA phenotypic and genotypic status could have an impact on the clinical outcome of patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. In particular, our observation support the hypothesis that CDA-deficiency syndrome could be associated with both severe toxicities and outstanding response, whereas ultra-rapid deaminator phenotype could explain the complete lack of efficacy of azacitidine. Here, *79A>C* and *-31delC* genotypes led to opposite outcomes in patients, thus suggesting that upfront screening of those allelic variants could help to customize therapy and be a relevant information for decision-making at the bedside.

Future perspective

This brief report highlights how clinical outcome in azacitidine-treated patients could be strongly impacted by *CDA* genetic polymorphisms. In particular, this report suggests that beside genetic or molecular abnormalities at the tumor level, germline genetic polymorphisms affecting drugs pharmacokinetics could be used as biomarkers to personalize medicine. Further studies are warranted to confirm prospectively the relevance of CDA status as a biomarker to optimize the administration of azacitidine in patients with myelodysplastic syndromes, that is, through adaptive dosing strategies based upon *CDA* genotype or phenotype to be used as covariate in a dedicated

dosing algorithm. Beside the issue of securing the administration of azacitidine in the elderly, the recent approval of an oral form of azacitidine in pediatrics should prompt the physicians to screen for genetic polymorphisms prior to administering this drug into children as well.

Financial & competing interests disclosure

Dr Cedric Mercier and Dr Joseph Ciccolini own a patent on CDA testing (US 20130011392 A1). The authors have no other relevant affiliations or financial involvement with any organization or entity with a financial interest in or financial conflict with the subject matter or materials discussed in the manuscript apart from those disclosed.

No writing assistance was utilized in the production of this manuscript.

Ethical conduct of research

The authors state that they have obtained appropriate institutional review board approval or have followed the principles outlined in the Declaration of Helsinki for all human or animal experimental investigations. In addition, for investigations involving human subjects, informed consent has been obtained from the participants involved.

Informed consent disclosure

The authors state that they have obtained verbal and written informed consent from the patient/patients for the inclusion of their medical and treatment history within this case report.

Executive summary

- Azacitidine is now a mainstay for treating myelodysplastic syndromes in the elderly and has been approved in children.
- Azacitidine is a drug whose liver disposition depends on a deamination step driven by cytidine deaminase.
- Cytidine deaminase gene is highly polymorphic yielding opposite phenotypes (i.e., deficiency or ultra-deaminator syndromes).
- Opposite phenotypes have opposite impact on clinical outcome in azacitidine patients.
- Preliminary determination of cytidine deaminase status should help to individualize treatment.

References

Papers of special note have been highlighted as: • of interest; •• of considerable interest.

- 1 Kaur I, Constance JE, Kosak KM, Spigarelli MG, Sherwin CMT. An extensive PK, metabolic and toxicological review of elderly patients under intensive CT for AML. www.ema.europa.eu
- 2 Al-Ali HK, Jaekel N, Niederwieser D. The role of hypomethylating agents in the treatment of elderly patients with AML. *J. Geriatr. Oncol.* 5(1), 89–105 (2014).
- 3 Wang ES. Treating acute myeloid leukemia in older adults. *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program.* 5(1), 14–20 (2014).
- 4 Swerdlow SH, Campo E, Harris NL *et al.* WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues lyon. IARC Press (2008). <http://apps.who.int>
- 5 Germing U, Neukirchen J. How to treat patients with CMML? *Leuk. Res.* 37(6), 605–606 (2013).
- 6 Santini V, Fenaux P, Mufti G *et al.* Management and supportive care measures for adverse events in patients with myelodysplastic syndromes treated with azacitidine. *Eur. J. Haematol.* 85(2), 130–138 (2010).
- 7 Seymour J, Fenaux P, Silverman L *et al.* Effects of azacitidine compared with conventional care regimens in elderly (≥ 75 years) patients with higher-risk myelodysplastic syndromes. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 76(3), 218–227 (2010).
- 8 Ciccolini J, Mercier C, Dahan L, André N. Integrating pharmacogenetics into gemcitabine dosing – time for a change? *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8(7), 439–444 (2011).

- 9 Serdjebi C, Milano G, Ciccolini J. Role of cytidine deaminase in toxicity and efficacy of nucleosidic analogs. *Expert Opin. Drug Metab. Toxicol.* 13, 1–8 (2014).
- **Encapsulates the clinical data made available regarding the impact of cytidine deaminase (CDA) genetic polymorphism on the efficacy/toxicity of a variety of nucleosidic analogs.**
- 10 Fanciullino R, Serdjebi C, Mollard S *et al.* Abstract 2208-cytidine deaminase deficiency and severe toxicities upon aza-cytidine intake: clinical observations and experimental evidences. *Clin. Cancer Res.* 73, 2208 (2013).
- 11 Mahfouz RZ, Jankowska A, Ebrahem Q *et al.* Increased CDA expression/activity in males contributes to decreased cytidine analog half-life and likely contributes to worse outcomes with 5-azacytidine or decitabine therapy. *Clin. Cancer Res.* 19(4), 938–948 (2013).
- 12 Caronia D, Martin M, Sastre J *et al.* A polymorphism in the cytidine deaminase promoter predicts severe capecitabine-induced hand-foot syndrome. *Clin. Cancer Res.* 17(7), 2006–2013 (2011).
- **Shows for the first time that the -31delC deletion on the CDA promoter is associated with decreased activity and impact on clinical outcome.**
- 13 Ciccolini J, Dahan L, André N *et al.* Cytidine deaminase residual activity in serum is a predictive marker of early severe toxicities in adults after gemcitabine-based chemotherapies. *J. Clin. Oncol.* 28(1), 160–165 (2010).
- **Shows how a simple surrogate test for establishing CDA status allows to sort patients on their probability to experience or not severe toxicities upon gemcitabine.**
- 14 Serdjebi C, Gagnière J, Desramé J *et al.* FFCD-1004 Clinical trial: impact of cytidine deaminase activity on clinical outcome in gemcitabine-monootherapy treated patients. *PLoS One* 10(8), e0135907 (2015).
- 15 André F, Ciccolini J, Spano JP *et al.* Personalized medicine in oncology: where have we come from and where are we going? *Pharmacogenomics* 14(8), 931–939 (2013).
- 16 Ciccolini J, Evrard A, M'Batchi L *et al.* CDA deficiency as a possible culprit for life-threatening toxicities after cytarabine plus 6-mercaptopurine therapy: pharmacogenetic investigations. *Pharmacogenomics* 13(4), 393–397 (2012).
- 17 Dahan L, Ciccolini J, Evrard A *et al.* Sudden death related to toxicity in a patient on capecitabine and irinotecan plus bevacizumab intake: pharmacogenetic implications. *J. Clin. Oncol.* 30(4), e41–e44 (2012).
- 18 Lao Z, Yiu R, Wong GC, Ho A. Treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia with azacitidine results in fewer hospitalization days and infective complications but similar survival compared with intensive chemotherapy. *Asia Pac J. Clin. Oncol.* 11(1), 54–61 (2015).
- 19 Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E *et al.* Efficacy of azacitidine compared with that of conventional care regimens in higher-risk myelodysplastic syndromes: a randomised, open-label, Phase III study. *Lancet Oncol.* 10(3), 223–232 (2009).
- 20 Tibaldi C, Giovannetti E, Tiseo M *et al.* Correlation of cytidine deaminase polymorphisms and activity with clinical outcome in gemcitabine-/platinum-treated advanced non-small-cell lung cancer patients. *Ann. Oncol.* 23(3), 670–677 (2012).
- 21 Giovannetti E, Tibaldi C, Falcone A *et al.* Impact of cytidine deaminase polymorphisms on toxicity after gemcitabine: the question is still ongoing. *J. Clin. Oncol.* 28(14), e221–e222 (2010).
- 22 Serdjebi C, Seitz JF, Ciccolini J *et al.* Rapid deaminator status is associated with poor clinical outcome in pancreatic cancer patients treated with a gemcitabine-based regimen. *Pharmacogenomics* 14(9), 1047–1051 (2014).
- 23 Breccia M, Molica M, Zacheo I *et al.* Azacitidine for myelodysplastic patients aged >65 years: a review of clinical efficacy. *Expert Opin. Pharmacother.* 15(11), 1621–1630 (2014).



Disponible en ligne sur

ScienceDirect
www.sciencedirect.com

Elsevier Masson France

EM|consulte
www.em-consulte.com

**Médecine et
maladies infectieuses**

Médecine et maladies infectieuses xxx (2016) xxx–xxx

Short communication

Micafungin as primary antifungal prophylaxis in patients presenting with acute myeloid leukemia

Micafungine comme prophylaxie antifongique primaire chez les patients atteints de leucémie aigüe myéloïde

G. Venton^{a,b,c,1}, H. Adam^{g,1}, J. Colle^{a,b,c}, Y. Labiad^{a,b}, C. Mercier^{c,d}, V. Ivanov^c, P. Suchon^{e,f},
R. Fanciullino^{d,g}, L. Farnault^c, R. Costello^{a,b,c,*}

^a Inserm, UMR1090 TAGC, 13288 Marseille, France

^b Aix-Marseille université, UMR1090 TAGC, 13288 Marseille, France

^c Service d'hématologie et de thérapie cellulaire AP-HM, hôpital de la Conception, Marseille, France

^d UMR-911 Inserm laboratoire de toxicocinétique et pharmacocinétique, faculté de pharmacie, Marseille, France

^e Laboratoire d'hématologie, AP-HM, hôpital de la Timone, Marseille, France

^f UMR 1062 NORT, Inserm, Marseille, France

^g Unité pharmacie hospitalière hôpital de la Conception, Marseille, France

Received 11 December 2015; received in revised form 29 January 2016; accepted 18 March 2016

Abstract

Objective. – To study the efficacy and safety of micafungin for prophylaxis of invasive fungal infections in patients undergoing induction chemotherapy for acute myeloid leukemia.

Patients and methods. – A prospective observational single-center study of 41 patients from the hematology department between May 2012 and April 2015. Micafungin was administered once daily from the first day of induction chemotherapy to the end of the neutropenic phase.

Results. – Neither *Candida* nor *Aspergillus* infection was documented in our 41 patients from the first day of micafungin infusion to the end of the neutropenic phase. Patients were followed for three months after discontinuation of micafungin and none of them contracted an invasive fungal infection. Only one patient presented with grade III–IV hepatic and ionic toxicities.

Conclusion. – Micafungin is associated with a good safety profile and is an interesting option for preventing invasive fungal infections in the high-risk population of patients presenting with hematological disorders.

© 2016 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

Keywords: Micafungin; Acute myeloid leukemia; *Aspergillus*

Résumé

Objectif. – Notre objectif était d'étudier l'efficacité et l'innocuité de la micafungine comme prophylaxie antifongique primaire chez les patients atteints de leucémie aigüe myéloïde.

Patients et méthodes. – Nous avons inclus 41 patients de mai 2012 à avril 2015. La micafungine a été administrée du premier jour de la chimiothérapie d'induction jusqu'à la fin de la période de neutropénie.

Résultats. – Aucune infection à *Candida* ou *Aspergillus* n'a été documentée chez nos 41 patients entre le premier jour de la chimiothérapie d'induction et la fin de la période de neutropénie. Trois mois après l'arrêt de la micafungine, aucun patient n'a développé d'infection fongique invasive. Un seul patient a présenté une toxicité de grade III–IV.

* Corresponding author. Service d'hématologie, centre hospitalier universitaire La Conception, 147, boulevard Baille, 13005 Marseille, France.

E-mail address: regiscostello.tagc@gmail.com (R. Costello).

¹ Equal contribution.

Conclusion. – La micafungine est associée à un excellent profil de tolérance et semble être une option intéressante pour prévenir les infections fongiques invasives dans la population à haut risque des patients traités pour hémopathie maligne.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots clés : Micafungine ; Leucémie aiguë myéloïde ; *Aspergillus*

1. Introduction

Patients presenting with hematological disorders with an anticipated duration of neutropenia of more than seven days are at high risk of invasive fungal infections (IFIs) involving both *Candida* and *Aspergillus* species. IFI early diagnosis is difficult to establish and, given the high morbidity and mortality of established invasive fungal disease, primary antifungal prophylaxis is highly recommended in current guidelines (e.g., ECIL, ASBMT) [1,2]. Broad-spectrum treatments active against both *Candida* and *Aspergillus* species have an advantage over those with activity against *Candida* alone.

Posaconazole is recommended for the prevention of fungal risk in acute myeloid leukemia (AML) patients undergoing induction chemotherapy [1]. However, oral posaconazole shows great variability in terms of bioavailability and compliance [3]. Moreover, cross-resistance to azoles (fluconazole, voriconazole, posaconazole) may occur among *Candida* species and particularly *C. glabrata*. Emergent infections with resistant bacteria may thus occur in patients receiving prophylaxis with any azole drug [4,5].

This is why echinocandins such as micafungin, a recent class of antifungal agents active against *Candida* and *Aspergillus* species, are increasingly used for prophylaxis [6–8]. Micafungin, unlike fluconazole, does not interact with drugs metabolized via the cytochrome P450 [9]. Dose adjustment is also not required in patients presenting with renal impairment.

2. Patients and methods

We conducted a prospective observational single-center study at the Hematology and Cellular Therapy Department of the University Hospital of Marseille (Hôpital de la Conception). We aimed to study the efficacy and safety of micafungin in preventing IFIs in AML patients undergoing induction chemotherapy in routine practice. All patients requiring first induction chemotherapy for AML (de novo AML or AML secondary to myelodysplastic or myeloproliferative syndromes) and treated with primary prophylactic micafungin were included in the study. Patients had to be free of invasive fungal disease at the time of enrollment.

Micafungin was administered once daily as a one-hour infusion (50 mg/day) on the first day of induction therapy for AML. Patients were monitored after the first day of induction for galactomannan antigenemia at least once per week. A CT scan was performed in case of persistent fever for at least five days following broad-spectrum empirical antibacterial therapy. Micafungin

was discontinued when absolute neutrophil count (ANC) had reached $> 1500/\text{mm}^3$ in the absence of fever and IFI.

Criteria for proven and probable infection were consistent with those for IFI described by the Invasive Fungal Infections Cooperative Group of the European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Institute of Allergy, and Infectious Diseases Mycoses Study Group. A proven fungal infection was defined as a biopsy-proven invasive or disseminated infection. A probable pulmonary aspergillosis was diagnosed by lower respiratory tract diagnostic tests and was defined by the presence of fungi as well as clinical and radiographic findings. Suspected fungal infection was defined as fever (temperature $>38^\circ\text{C}$) lasting for 96 h during the neutropenic phase despite a broad-spectrum antibacterial therapy. Suspected fungal infection led to empirical antifungal therapy [10].

A successful treatment was defined as the absence of a proven or probable systemic fungal infection until the end of the neutropenic phase. The use of systemic antifungal agents for the treatment of suspected fungal infections was considered a failure. Safety analyses included standard micafungin adverse events: hepatic and ionic grade III–IV toxicity according to the 2009 WHO classification, and no hematopoietic reconstitution.

Induction of chemotherapy was performed using daunorubicin (90 mg/m²/day, 3 days) and cytarabine (200 mg/m²/day, 7 days) in patients aged <65 years. Idarubicin (8 mg/m²/day, 5 days) and cytarabine (100 mg/m²/day, 7 days) were used in patients aged >65 years. Refractory patients (bone marrow blasts $>5\%$) at day 15 after first induction chemotherapy received a second-line chemotherapy.

All patients received the same supportive care during the whole study period. *P. jiroveci* pneumonia prophylaxis consisted of trimethoprim (160 mg) + sulfamethoxazole (800 mg) administered twice weekly in all patients. Trimethoprim–sulfamethoxazole was initiated after induction of chemotherapy, but at the end of the neutropenic phase as soon as ANC reached $>1000/\text{mm}^3$. The objective was to avoid slowing down the hematopoiesis recovery. Prophylaxis against HSV included oral valacyclovir (500 mg \times 2/day) during micafungin treatment.

3. Results

Overall, 41 patients from our department were enrolled between May 2012 and April 2015.

Patients received a median of 30 micafungin infusions (range 7–40). Neither *Candida* nor *Aspergillus* infection was documented in our 41 patients between the first day of the induction regimen and until ANC reached $>1500/\text{mm}^3$. Patients were

Table 1
Acute myeloid leukemia patients undergoing induction chemotherapy.
Patients atteints de leucémie myéloïde chronique sous chimiothérapie d'induction.

Baseline and demographic characteristics	n=41
<i>Patient age (median)</i>	62 years (range: 21–85)
<i>Patient sex</i>	
Male	24 (58.5%)
Female	17 (41.5%)
<i>Median number of prior chemotherapies before AML induction chemotherapy</i>	0
<i>Chemotherapy regimen</i>	
Daunorubicin + cytarabine	24
Idarubicin + cytarabine	17
<i>Median period of neutropenia (days)</i>	22 (range: 14–65)
<i>Bacterial infections</i>	11 (26.8%)
<i>Fungal infections</i>	
Confirmed	0
Probable	0

AML: acute myeloid leukemia.

monitored for three months following the last micafungin infusion and none of them contracted IFIs. No patient had a positive galactomannan antigenemia above 0.5. No treatment failure requiring the use of empirical systemic antifungal agents was observed. Eleven patients (26.8%) presented with a documented bacterial infection during the neutropenic phase (Table 1).

Only one patient (2.4%) presented with grade III–IV hepatic and ionic toxicities. However, the patient had multiple organ failure due to septic shock; thus, toxicities cannot be formally attributed to micafungin. No other grade III–IV toxicity was observed and grade I–II toxicities did not require treatment discontinuation. The median period of neutropenia was 22 days (range 14–65). A 65-day neutropenia post-induction chemotherapy was observed in a patient resistant to the first-line chemotherapy who presented with septic shock and died after multivisceral failure despite intensive care.

4. Discussion

IFIs occurring during the post-induction chemotherapy aplasia phase in AML patients is a life-threatening complication. When occurring during the first induction chemotherapy, IFI increases the risk of short-term death and hinders complete remission and long-term survival in AML patients [11].

None of our 41 AML patients presented with IFI. This is quite interesting as literature data is scarce on the incidence of IFIs after micafungin prophylaxis in AML patients undergoing induction chemotherapy. However, our work was an observational study of real-life practice and not a randomized controlled trial. Our small sample size and our study design therefore prevented us from drawing definitive conclusions. Nevertheless, these preliminary findings support the need for further prospective and comparative efficacy studies.

Nachbaur et al. [12] were the only ones to perform a retrospective study of the use of micafungin in AML patients undergoing induction chemotherapy. They observed an

incidence of IFIs of 7% and micafungin was at least as effective as posaconazole (historical control) in preventing IFIs [12].

The authors of two randomized studies demonstrated the efficacy of another echinocandin (casposfungin) in preventing IFIs in AML patients undergoing induction chemotherapy. Efficacy and safety of casposfungin were similar to other prophylactic regimens, especially to itraconazole prophylaxis [13,14].

Posaconazole has been extensively studied and is now used in the prevention of IFIs during the neutropenic phase of AML induction therapy [15]. However, cross-resistance to azoles (fluconazole, voriconazole, posaconazole) may occur among *Candida* species and posaconazole interacts with drugs metabolized via the cytochrome P450 [4,5,9]. Moreover, the incidence of IFIs in patients receiving posaconazole prophylaxis greatly varies from one study to another (0–17.2%) [16]. The variability of IFI incidence with posaconazole prophylaxis may be due to poor compliance to posaconazole as formulation is poorly adapted to patients presenting with severe aplasia. Indeed, compliance with an oral treatment is very difficult and erratic in patients presenting with grade II–III mucitis and frequent vomiting. This may result in a wide variation in posaconazole serum level [16]. A daily monitoring of drug serum level would be the only way to ensure good compliance. This therapeutic drug monitoring strategy is both time- and cost-effective but is not performed in routine practice. Nevertheless, the upcoming arrival of a new oral and intravenous formulation may solve this problem.

5. Conclusion

IFIs are severe and fatal complications in immunocompromised patients. Their prevention and the choice of an appropriate antifungal prophylaxis are major issues for hematologists. Micafungin is associated with a great efficacy and with an excellent safety profile. Its intravenous administration at a daily dose of 50 mg seems to be an interesting option in the prevention of IFIs in the high-risk population of AML patients undergoing induction chemotherapy.

Funding

The authors did not receive any funding.

Disclosure of interest

The authors declare that they have no competing interest.

Acknowledgment

Geoffroy Venton wrote the article.

Hélène Adam, Julien Colle, and Yasmine Labiad collected the data.

Cedric Mercier, Vadim Ivanov, and Laure Farnault reviewed the article.

Pierre Suchon performed the weekly monitoring of galactomannan antigenemia.

Regis Costello designed the study protocol.

References

- [1] Maertens J, Marchetti O, Herbrecht R, Cornely OA, Flückiger U, Frère P, et al. European guidelines for antifungal management in leukemia and hematopoietic stem cell transplant recipients: summary of the ECIL 3–2009 update. *Bone Marrow Transplant* 2011;46:709–18, <http://dx.doi.org/10.1038/bmt.2010.175>.
- [2] Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR), National Marrow Donor Program (NMDP), European Blood and Marrow Transplant Group (EBMT), American Society of Blood and Marrow Transplantation (ASBMT), Canadian Blood and Marrow Transplant Group (CBMTG), Infectious Disease Society of America (IDSA), et al. Guidelines for preventing infectious complications among hematopoietic cell transplant recipients: a global perspective. *Bone Marrow Transplant* 2009;44:453–558.
- [3] Andes D. Optimizing antifungal choice and administration. *Curr Med Res Opin* 2013;29(Suppl. 4):13–8, <http://dx.doi.org/10.1185/03007995.2012.761135>.
- [4] Pfaller MA, Messer SA, Boyken L, Tendolkar S, Hollis RJ, Diekema DJ. Geographic variation in the susceptibilities of invasive isolates of *Candida glabrata* to seven systemically active antifungal agents: a global assessment from the ARTEMIS Antifungal Surveillance Program conducted in 2001 and 2002. *J Clin Microbiol* 2004;42:3142–6, <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.42.7.3142-3146.2004>.
- [5] Tsai H-F, Bard M, Izumikawa K, Krol AA, Sturm AM, Culbertson NT, et al. *Candida glabrata* erg1 mutant with increased sensitivity to azoles and to low oxygen tension. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:2483–9, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.48.7.2483-2489.2004>.
- [6] Ethier MC, Science M, Beyene J, Briel M, Lehnbecher T, Sung L. Mould-active compared with fluconazole prophylaxis to prevent invasive fungal diseases in cancer patients receiving chemotherapy or haematopoietic stem-cell transplantation: a systematic review and meta-analysis of randomised controlled trials. *Br J Cancer* 2012;106:1626–37, <http://dx.doi.org/10.1038/bjc.2012.147>.
- [7] Petraitis V, Petraitiene R, Groll AH, Roussillon K, Hemmings M, Lyman CA, et al. Comparative antifungal activities and plasma pharmacokinetics of micafungin (FK463) against disseminated candidiasis and invasive pulmonary aspergillosis in persistently neutropenic rabbits. *Antimicrob Agents Chemother* 2002;46:1857–69.
- [8] Walsh TJ. Echinocandins—an advance in the primary treatment of invasive candidiasis. *N Engl J Med* 2002;347:2070–2, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMe020142>.
- [9] Niwa T, Shiraga T, Takagi A. Effect of antifungal drugs on cytochrome P450 (CYP) 2C9, CYP2C19, and CYP3A4 activities in human liver microsomes. *Biol Pharm Bull* 2005;28:1805–8.
- [10] Asciglu S, Rex JH, de Pauw B, Bennett JE, Bille J, Crokaert F, et al. Defining opportunistic invasive fungal infections in immunocompromised patients with cancer and hematopoietic stem cell transplants: an international consensus. *Clin Infect Dis Off Publ Infect Dis Soc Am* 2002;34:7–14, <http://dx.doi.org/10.1086/323335>.
- [11] Girmenia C, Micozzi A, Picococchi A, Gentile G, Di Caprio L, Nasso D, et al. Invasive fungal diseases during first induction chemotherapy affect complete remission achievement and long-term survival of patients with acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 2014;38:469–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.leukres.2014.01.007>.
- [12] Nachbaur D, Angelova O, Orth-Höller D, Ditlbacher A, Lackner M, Auberger J, et al. Primary antifungal prophylaxis with micafungin in patients with haematological malignancies: real-life data from a retrospective single-centre observational study. *Eur J Haematol* 2014;94:261, <http://dx.doi.org/10.1111/ejh.12426>.
- [13] Cattaneo C, Monte S, Algarotti A, Audisio E, Borlenghi E, Campiotti L, et al. A randomized comparison of caspofungin versus antifungal prophylaxis according to investigator policy in acute leukaemia patients undergoing induction chemotherapy (PROFIL-C study). *J Antimicrob Chemother* 2011;66:2140–5, <http://dx.doi.org/10.1093/jac/dkr271>.
- [14] Mattiuzzi GN, Alvarado G, Giles FJ, Ostrosky-Zeichner L, Cortes J, O'Brien S, et al. Open-label, randomized comparison of itraconazole versus caspofungin for prophylaxis in patients with hematologic malignancies. *Antimicrob Agents Chemother* 2006;50:143–7, <http://dx.doi.org/10.1128/AAC.50.1.143-147.2006>.
- [15] Cornely OA, Maertens J, Winston DJ, Perfect J, Ullmann AJ, Walsh TJ, et al. Posaconazole vs. fluconazole or itraconazole prophylaxis in patients with neutropenia. *N Engl J Med* 2007;356:348–59, <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa061094>.
- [16] Desplanques P-Y, Burlacu R, Poinignon V, Boussion H, Borget I, Wyplosz B, et al. Factors influencing posaconazole plasmatic concentrations in patients presenting with acute myeloid leukemia. *Med Mal Infect* 2014;44:174–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.02.005>.



Contents lists available at ScienceDirect

journal homepage: www.elsevier.com/locate/humimm

Natural killer cells in patients with polycythemia vera



Carole Sanchez^{a,b,c,d,1}, Céline Baier^{a,1}, Julien G. Colle^{a,b}, Rabie Chelbi^a, Pascal Rihet^a, Thérèse Le Treut^c, Jean Imbert^a, Gérard Sébahoun^{b,c}, Geoffroy Venton^{a,b}, Régis T. Costello^{a,b,c,*}

^aAix-Marseille Université, UMR 1090 TAGC, Marseille, France

^bAP-HM, Hôpital de La Conception, Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Marseille, France

^cAP-HM, Laboratoire d'Hématologie, Hôpital Nord, Marseille, France

^dLaboratoire de Biologie Médicale, Centre Hospitalier, Salon de Provence, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 10 April 2015

Revised 24 July 2015

Accepted 21 September 2015

Available online 25 September 2015

Keywords:

Natural killer

Expansion

Cytotoxicity

Natural cytotoxicity receptors

Transcriptome analysis

ABSTRACT

Natural killer cells (NK) are pivotal cells of innate immunity. They are potent antileukemic cytotoxic effectors. A defect in their cytotoxicity has been described in some hematopoietic malignancies such as acute myeloid leukemia, multiple myeloma and myelodysplastic syndromes. This defect is at least partially linked to a decreased or absent expression of some activating NK cells molecules, more particularly the so-called natural cytotoxicity receptors. In the present study, we more particularly focused our attention on NK cells of polycythemia vera, a myeloproliferative disease characterized by the presence of mutated JAK2 tyrosine kinase. The polymerase chain reaction analysis of NK cells from patients showed that they expressed the mutated form of JAK2. In polycythemia vera the proportion of NK was increased compared to healthy donors. The proliferative and cytotoxic abilities of NK cells from patients were similar to healthy donors. Expression of activating or inhibitory receptors was comparable in patients and donors, with nonetheless an imbalance for the inhibitory form of the CD158a,h couple of receptors in patients. Finally, the transcriptomic profile analysis clearly identified a discriminant signature between NK cells from patients and donors that could putatively be the consequence of abnormal continuous activation of mutated JAK2.

© 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Myeloproliferative disorders (MPD) are clonal pluripotent stem cell disorders characterized by a spontaneous growth of myeloid cells in bone marrow. Among the Philadelphia (Ph1) chromosome-negative MPD, polycythemia vera (PV) often has a favorable evolution limited to thrombotic events, although an increased incidence of secondary malignancies, development of myelofibrosis or acute leukaemia may impair life expectancy [28]. Moreover, in absence of allogenic hematopoietic stem cells

transplantation, these diseases are incurable. PV is treated with phlebotomy and non specific cytotoxic drug such as hydroxyurea, or more recently, in the presence of myelofibrosis, by Janus kinase (JAK) inhibitors which do not stop the evolution of disease but improve symptoms and decrease splenomegaly.

Since malignant cells in haemopathies often have abnormal human leukocyte antigen (HLA) class I molecule expression, they should be natural targets for natural killer (NK) cells although they have developed some way to escape to innate immunity [2,26]. Knowledge on NK cell functions in MPD relies on very few studies. Early studies have shown that MPD patients have decreased cytotoxic activity of NK cells despite an increase in the absolute count of CD16+. In vitro treatment with IFN- α or IL-2 restored normal NK cytotoxicity in the study of Gersuk et al. but not in the study of Froom et al. [13,14]. Among MPD, PV is characterized by a constant acquired mutation of JAK2 affecting exon 14 and, less frequently, exon 12 [3,16]. This mutation leads to a gain of function with constitutive phosphorylation and downstream signaling via STAT3 and STAT5. JAK2 participates in the signaling of the interferon gamma

Abbreviations: NK, natural killer; PV, polycythemia vera; JAK2, janus kinase 2; MPD, myeloproliferative disorders; Ph1, phildadelphia; HLA, human leukocyte antigen; STAT, signal transducer and activator of transcription; CML, chronic myeloid leukemia; KIRs, inhibitory killer immunoglobulin-like receptors; LAMP-1, lysosomal-associated membrane protein-1; NCR, natural cytotoxicity receptors.

* Corresponding author at: Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, 147 boulevard Baille, 13005 Marseille, France.

E-mail address: regis.costello@free.fr (R.T. Costello).

¹ Equal contribution.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.010>

0198-8859/© 2015 American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

receptor (IFN γ -R), which is expressed by NK cells and lead to STAT1 activation that increases the expression of interferon-stimulated genes [27]. On the one hand, defect in NK cytotoxic functions have been described in many malignancies [2,26]. On the other hand, a simple view could assess that the JAK2 gain of function could induce NK cell activation and augment cytotoxicity, thus providing an increased anti-tumoral and anti-infectious defense. Of note, since IFN- γ is also produced by NK cells, JAK2 gain of function could lead to a self-entertained autocrine loop with constitutive activation of STAT1, leading to auto-immunity and susceptibility to infections, a result that is counter-intuitive with the hypothesis of increased NK activation [23]. Moreover, it has been shown that the non-classical HLA molecule HLA-G is secreted by erythroblasts in all hematopoietic organs and that this molecule turns-off the erythropoietin receptor signaling through JAK2 and JAK2 V617F dephosphorylation in PV [21]. In addition, the HLA-G molecule can be transferred to activated NK cells by trogocytosis, leading to blockade of NK proliferation and cytotoxicity owing to its interaction with the IL2 inhibitory receptor on other NK cells [5]. Chronic myeloid leukemia (CML) is a MPD characterized by a gain of function due to constitutive tyrosine-kinase properties of the bcr-abl protein. In this disease, decreased NK cytotoxicity is linked to an abnormal expression of inhibitory killer immunoglobulin-like receptors (KIRs) [8].

From these observations, we conclude that available data do not allow us to predict NK phenotype in PV, although the development of an immune response against PV clone could be of great interest in the attempt to eradicate the disease. In order to answer this question we analyzed NK from PV patients in comparison with healthy donors (HD) regarding the expression of activating and inhibitory molecules, cytotoxic functions and gene expression patterns.

2. Materials and methods

2.1. Cell preparation and cultures

Peripheral blood mononucleated cells (PBMC) were isolated from blood samples using lymphocyte separation medium density gradient centrifugation (Eurobio Technologies, France). Purified NK cells were obtained after depletion using EasySep kit (StemCell Technologies, Vancouver, Canada). Purity of the NK cell fraction (CD3⁻/CD16⁺/CD56⁺) obtained from PV patients was assessed by flow cytometry and varied from 64% to 86%. NK were expanded for three weeks from total PBMC cultured at $0.75 \cdot 10^6$ cells/ml with feeder EBV cells at $0.75 \cdot 10^6$ cells/ml in RPMI 1640 medium GlutaMAX with 10% fetal calf serum (FCS) in the presence of recombinant human IL-2 (1000 UI/mL) (Sigma, St Louis, MO). The K562 cell line was grown in RPMI 1640 medium with 10% FCS.

2.2. CD107a mobilization assay

NK cells were stimulated with K562 cells at ratio 1/1. The negative control was obtained with NK cells and medium. The positive control was obtained with NK cells stimulated with phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) (2.5 μ g/mL) and ionomycin (0.5 μ g/mL). The CD107a-FITC antibody was added directly to the wells at a concentration of 50 μ L/mL and incubated overnight. After incubation, cells were labeled with CD56^{PC5} for 15 min at 4 °C in the dark.

2.3. Immunophenotyping

Fluorescein isothiocyanate (FITC), phycoerythrin (PE), phycoerythrin-cyanin (PC5) coupled monoclonal antibodies

(mAbs) were used to define the NK cells phenotype: CD3 (IgG1), CD16 (IgG1), CD56 (IgG1); activatory receptors and coreceptors: NCR3/NKp30 (IgG1), NCR2/NKp44 (IgG1), NCR1/NKp46 (IgG1), NKG2D (IgG1), CD244/2B4 (IgG1); inhibitory receptors: CD158a,h (IgG1), CD158b1,b2j (IgG1), CD158e1/e2 (IgG1), CD158i (IgG2a), CD85j/ILT2 (IgG1), CD159a/NKG2A (IgG2b). PBMC were stained with anti-CD3, anti-CD56, anti-CD158a,h (clone EB6) and anti-CD158a (clone 143211, IgG1, R&D Systems)-conjugated mAb. All antibodies were purchased from Beckman Coulter (Marseille, France). Total blood was incubated for 15 min at 4 °C, washed with PBS and analyzed on a XL-Epics (Beckman Coulter, Marseille, France). Background levels were measured using isotypic controls.

2.4. Quantification of intracellular perforin and granzyme

NK cells ($5 \cdot 10^5$) were first incubated during 15 min at 4 °C with 10 μ L anti-CD3^{FITC}/CD56^{PC5} and then fixed and permeabilized with Intraprep reagent (Beckman Coulter, Marseille, France). NK cells were incubated with anti-perforin^{PE} (eBiosciences, San Diego, USA) or anti-granzyme B^{PE} (R&D Systems) during 15 min at room temperature.

2.5. Transcriptome analysis

Sample amplification, labeling, and hybridization followed the Low Input Quick Amp Labeling, one-color protocol (version 6.5, May 2010) recommended by Agilent Technologies. 500 ng of each total RNA sample was reverse transcribed into cDNA using oligo dT-T7 promoter primer. Labeled cRNA was synthesized from the cDNA. The reaction was performed in a solution containing dNTP mix, cyanine 3-dCTP, and T7 RNA Polymerase, and incubated at 40 °C for 2 h. Hybridization was performed into whole human genome microarray slides (4 \times 44 K G4112F, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) containing 45,220 oligonucleotide probes at 65 °C for 17 h. Hybridized microarray slides were then washed according to the manufacturer's instructions and scanned using an Agilent DNA Microarray Scanner, using the Agilent Feature Extraction Software (Agilent Technologies). Quantification files derived from the Agilent Feature Extraction Software were analyzed using the AgiND package (<http://tagc.univmrs.fr/AgiND>). We also used the AgiND R package for quality control and normalization. Quantile methods and a background correction were used for data normalization.

3. Results

3.1. Characteristics of patients and controls

After informed consent, blood samples were obtained from 17 patients with PV and from 15 aged-matched HD (66.3 years \pm 12.3 for PV patients vs 64.4 \pm 9.3 for HD). The patients were diagnosed according to the world health organization (WHO) criteria. Median haemoglobin, platelets and leucocytes counts at the time of blood sample collection were 18.7 g/dL (range: 16.0–22.6 g/dL), 438 G/L (range: 210–643 G/L) and 12.1 G/L (range: 3.3–26.4 G/L), respectively. The JAK2 V617F mutation was found in granulocytes of all patients and in 16 highly purified NK cells sample from patients and one patient had a mutation in exon 12 (F537-K539delinsL) (data not shown). PV patients were naive from any cytotoxic treatment at time of blood sampling.

3.2. Proportion and proliferation of NK cells in PV patients

Distribution of lymphoid populations in EDTA blood was compared between seventeen PV patients and fifteen HD and did not

reveal significant difference regarding absolute number of lymphocytes ($1.66 \text{ G/L} \pm 0.67$ vs $1.79 \text{ G/L} \pm 0.49$, not significant [NS]) (data not shown). We observed an increased percentage of NK cells ($12.2\% \pm 7.3$ vs $7.4\% \pm 5.3$, $p < 0.05$) (Fig. 1A) as well as an increased absolute number of NK cells ($0.180 \text{ G/L} \pm 0.088$ vs $0.126 \text{ G/L} \pm 0.082$, $p < 0.05$) (Fig. 1B). In line with the predominance of the CD56^{dim} subset in peripheral blood, this subset accounted for the increase of NK cells. In vitro stimulation with IL-2 induced a mean fold increase of 500 ± 250 at 21 days of culture for HD and of 400 ± 200 for PV-NK cells (Fig. 1C). After 21 days of culture, proliferation capacities of PV and HD NK cells decreased (data not shown).

3.3. NK cells cytotoxicity

NK cells cytolytic granules membrane contains the lysosomal-associated membrane protein-1, corresponding to the CD107a cluster, which detection is considered to reflect degranulation and indirectly cytotoxic capacities [1]. The basal NK-mediated cytolytic activity against K562, assessed by evaluation of degranulation by CD107a surface expression, was not significantly different between PV patients and HD after short term (overnight) culture ($11.4\% \pm 5.93$ vs $11.04\% \pm 5.39$, [NS]) (Fig. 2A), or long term (17 days) culture with 1000 U/ml IL-2rh ($23.3\% \pm 9.9$ vs 29.2 ± 13.2 , [NS]) (Fig. 2B). We next investigated the content in intracellular perforin and granzyme B of NK cells (Fig. 2C). We did not find any difference between PV patients and HD, either in percentage of NK cells expressing perforin ($74.4\% \pm 27.0$ vs $70.6\% \pm 31.9$) and granzyme B ($66.6\% \pm 10.8$ vs $58.7\% \pm 14.2$) or in MFI: perforin (16.8 ± 8.7 vs 19.6 ± 9.6) and granzyme B (8.9 ± 2.8 vs 7.4 ± 2.2) (data not shown). So, PV-NK cells did not present any deficit in content of important cytolytic molecules, perforin and granzyme B. We investigated gene expression of *TNF α* , *granzyme B* and *IFN γ* by RT-qPCR. In PV patients, the expression of *TNF α* gene tended to be increased (4.8 ± 1.60 vs 6.18 ± 0.91 in relative value) while gene expression of *granzyme B*, *IFN γ* tended to be decreased (1.8 ± 0.81 vs 0.73 ± 2.62 and 4.86 ± 2.14 vs 4.07 ± 1.76). We did not detect any difference in NK cytotoxicity between PV patient and HD.

3.4. Expression of activating receptors by peripheral PV NK cells

Flow cytometry analyses were investigated in EDTA blood on NK cells. We failed to detect any significant difference in percentage of NK cells expressing NKp30/NCR3 ($58.1\% \pm 20.6$ vs $58.1 \pm 20.7\%$, $p > 0.05$, [NS]), NKp46/NCR1 ($68.9\% \pm 20.9$ vs $74.9\% \pm 16.0$, $p > 0.05$, [NS]), NKG2D ($95.8\% \pm 1.7$ vs $94.8\% \pm 2.5$, $p > 0.05$, [NS]), 2B4/CD244 ($97.6\% \pm 1.7$ vs $97.4\% \pm 1.1$, $p > 0.05$, [NS]), and CD158i ($0.7\% \pm 17.7$ vs $1.8\% \pm 20.7$, $p > 0.05$, [NS]) between PV patients and HD (Fig. 3A). MFI for these four receptors and this co-receptor were also similar for NKp30/NCR3 (9.24 ± 8.8 vs 11.79 ± 6.74 , $p > 0.05$, [NS]), NKp46/NCR1 (16.55 ± 14.75 vs 22.14 ± 12.32 , $p > 0.05$, [NS]), NKG2D (29.82 ± 19.45 vs 38.63 ± 15.35 , $p > 0.05$, [NS]), 2B4/CD244 (65.81 ± 24.67 vs 67 ± 32.21 , $p > 0.05$, [NS]), and CD158i (3.55 ± 4.61 vs 2.65 ± 4.18 , $p > 0.05$, [NS]) between PV patients and HD (Fig. 3B). NKp44/NCR2 is expressed only by activated NK cells. Three PV patients expressed this receptor (17.6% of the patients) and only one HD expressed it (data not shown), although in both cases with very low MFI. In RT-qPCR, as expected, we were not able to detect RNA for *NKp44/NCR2* in resting NK cells. Gene expression of *2B4* and *NKp46/NCR1* was similar between PV patients and HD (6.4 ± 0.70 vs 6.2 ± 1.07 and 5.3 ± 0.48 vs 5.4 ± 2.34). In PV patients, gene expression of *NKp30/NCR3* and *NKG2D* tends to be decreased (5.9 ± 0.94 vs 4.6 ± 1.78 and 7.8 ± 0.66 vs 6.9 ± 0.76), but this difference was not significant.

3.5. Expression of inhibitory receptors by peripheral PV-NK cells

In the series of fifteen HD, CD158b, CD158e, CD85j and CD159a were expressed by $25.8\% \pm 16.5$, $12.2\% \pm 8.0$, $36.3\% \pm 25.8$ and $47.7\% \pm 20$ of NK cells respectively. Fourteen PV patients exhibited same percentage of positive cells for these different receptors: $31.2\% \pm 17.5$ [NS], $14.2\% \pm 11.5$ [NS], $49.3\% \pm 20.5$ [NS] and $45.5\% \pm 16.7$ [NS] respectively (Fig. 4A). Concerning the mean fluorescence intensity, we were not able to detect any statistical difference between PV-NK cells and HD-NK cells (Fig. 4B).

The receptor CD158/KIR2DL1/DS1, exists in inhibitory and activating forms. We quantified the expression of both forms by using the CD158a,h antibody that recognizes both activating and inhibitory form and the 143,211 antibody that recognizes the inhibitory form only of CD158 [9]. In a series of eight PV patients and eight HD, PV-NK cells expressed higher percentage of inhibitory form of CD158a,h receptor ($58.9\% \pm 33$ vs $48.4\% \pm 27.15$, $p > 0.05$, [NS]) although not reaching a statistical significant difference (Fig. 4C).

3.6. Gene expression analysis of PV NK cells

By transcriptional approach, we looked for genes that were differentially expressed between NK cells from PV patients and HD. Thus, 10 RNA samples from 5 PV patients, 4 HD and NK-92 cell line were used to characterize the transcriptional signature of PV. Hierarchical clustering revealed seventeen differentially expressed genes and completely separated PV patients from HD (Fig. 5). Several genes like *FAM27*, *XRRAR1*, *HDDC*, *ZNF282*, *TNFRSF 1B*, *GCG*, *NFIC*, *ALF1*, *SLC6A5*, *TOAP*, *SNX21*, *TRAV5* and the non-coding ARN *LOC100506845*, *LOC100508554* and *A_33_P3348151* were down regulated while *C7orf54* gene is the only gene that was over-expressed compared to HD.

4. Discussion

The possible role of the immune system in the control of PV, in its evolution to myelofibrosis or acute myeloid leukemia and in the increased incidence of secondary malignancies led us to thoroughly study NK cell phenotype. Although PV patients have a normal number of lymphocytes, they present an increased percentage and absolute number of NK cells in comparison with HD. This could suggest a proliferative advantage of PV-NK cells at least in vivo, since in vitro proliferation was not different from HD. We can hypothesize that under suboptimal in vivo conditions PV-NK cells have a proliferative advantage that disappears when NK are cultured under optimal conditions, i.e. high concentrations of IL-2 and strong stimulation by feeder cells (EBV-infected B-cells) that express high level of NK stimulating molecules. In so far as the JAK2 mutation present in PV patients corresponds to a gain of function with increased activation of the JAK/STAT pathway, we hypothesize it could explain the increased number of NK cells in PV patients. To test this hypothesis, we performed RT-qPCR on highly purified PV-NK cells. The JAK2 mutation was detected at a significant level in all samples, we concluded to its presence in PV-NK cells, in accordance with the notion that this mutation occurs in very primitive cells explaining the multi-lineage abnormalities observed in JAK2-mutated MPD [12,19]. We then tested the expression of both stimulating and inhibitory molecules on PV-NK in comparison with HD-NK, since the observation of increased KIRs expression in CML suggested that the JAK2 gain of function mutation, which has common point with the BCR/ABL gain of function, could lead to comparable results [8]. Regarding the activating and co-activating receptors expression (NCRs, NKG2D and 2B4) we failed to detect a significant difference in surface expression between PV-NK and HD-NK, although RT-qPCR

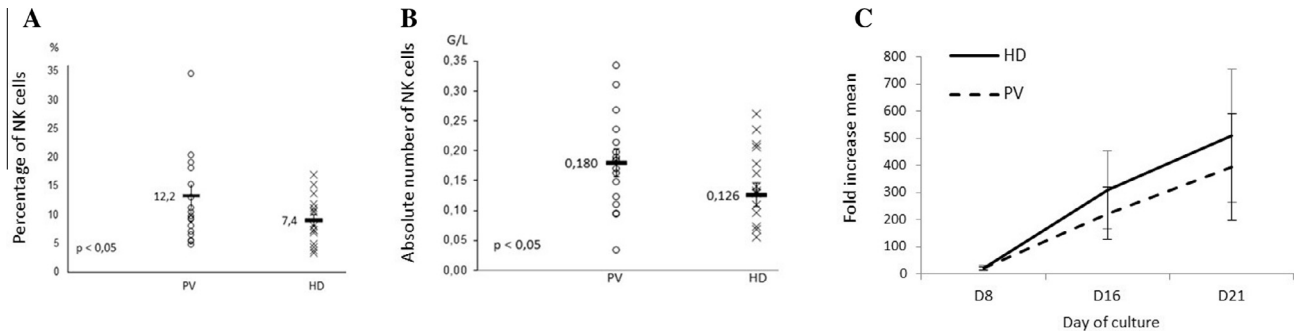


Fig. 1. Distribution of NK cells in PV and proliferation capacities of PV-NK cells in vitro, in response to recombinant human IL-2. Distribution of lymphoid populations in EDTA blood was compared between PV patients ($n = 17$) and HD ($n = 15$). The percentage (A) and the absolute number (B) of NK cells in PV patient (o) compared to HD (x). (C) NK cells from 10 PV patients and 9 HD are counted following 21 days of culture. The mean of fold increase is determined and reflects the proliferation capacities of NK cells.

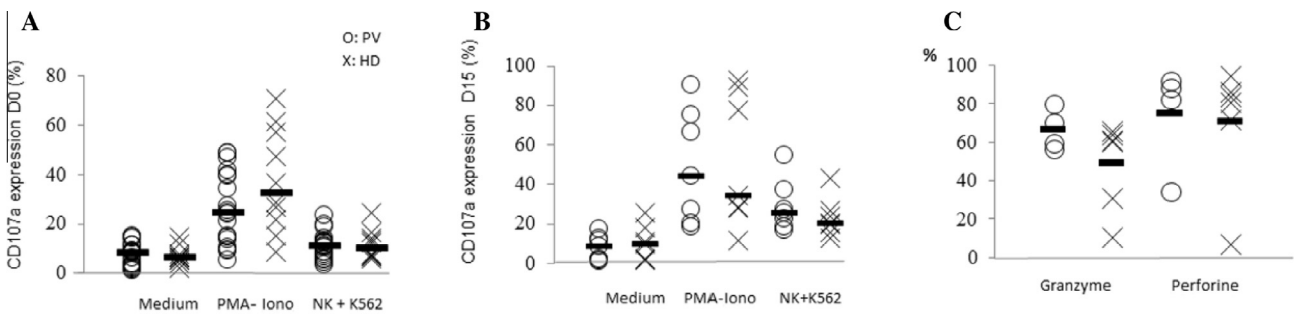


Fig. 2. Short and long term cytolytic function with the content in perforin and granzyme of NK cells. (A) Cytolytic activity of resting NK cells against K562, for 19 PV patients (O) and 10 HD (X). (B) Cytolytic function of NK cells from 7 HD and 7 PV-patients is measured after seventeen days of culture. (C) The content in perforin and granzyme of NK cells was measured by flow cytometry. Results are expressed in percentage of NK cells containing perforin and granzyme in a series of 6 HD and 4 PV patients.

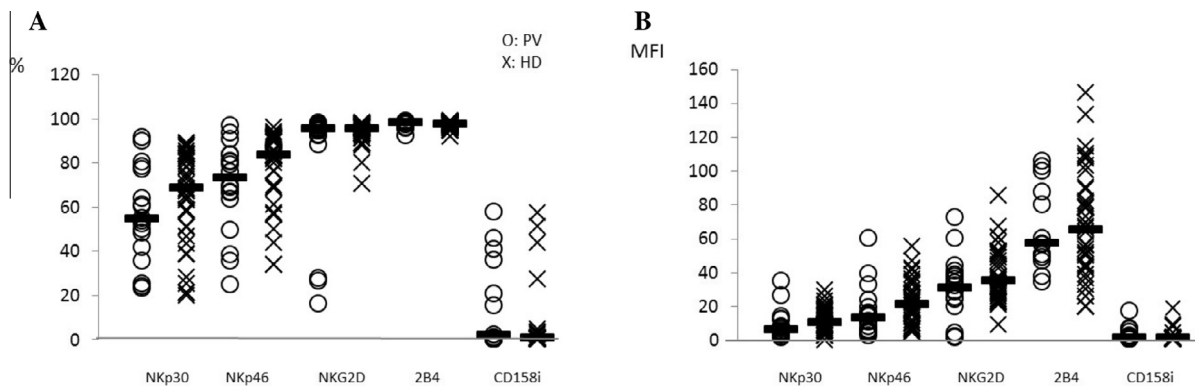


Fig. 3. Expression of (co) activating receptors in PV. Expression of activating receptors (NKp30, NKp46, NKG2D, and CD158i) and co-receptor 2B4 by resting NK cells in PV patients (O) and in HD (X): (A) percentage of expression, (B) MFI.

showed a trend for decreased genes expression of NKp30/NCR3 and NKG2D in PV patients, but without impact on protein level, suggesting that post-transcriptional regulation plays a role in the level of expression of these molecules. We also failed to detect any expression difference for the inhibitory receptors CD158a, CD158b, CD158e, CD159a and CD85j. In addition, we evaluated the expression of CD158a,h a receptor that shares both an inhibitory and an activating form [9]. We observed a trend for an increased expression of the inhibitory form of CD158a,h. Of note, the small sample size does not allow us to exclude we failed to detect significant differences in molecule or gene expression. The study of Chiorena et al. [8] has showed that the BCR/ABL fusion protein induced decreased NK cytotoxicity. This prompted us to indirectly test this property by flow cytometry detection of NK degranulation. We observed a trend for short term decreased

degranulation in PV-NK, which was restored during culture and even became higher than HD-NK. Although we did not reach a statistically significant level, this data suggest that PV-NK have normal degranulation functions and probably cytotoxic functions, or that at least these functions are restored by optimal ex vivo culture conditions, allowing their use in a immunotherapeutic approach. Furthermore, the quantification by flow cytometry of perforin and granzyme B showed no differences between PV-NK and HD-NK, thus indicating a normal cytotoxic armamentarium. Detection of granzyme gene expression by RT-qPCR detected only moderately decreased levels, suggesting again a role for post-transcriptional regulation of protein levels (data not shown). On the contrary, increased RNA levels were detected for TNF α (data not shown), in line with the normal expression observed by Chiorena et al. in CML-NKs [8]. Human NK cells constitutively express

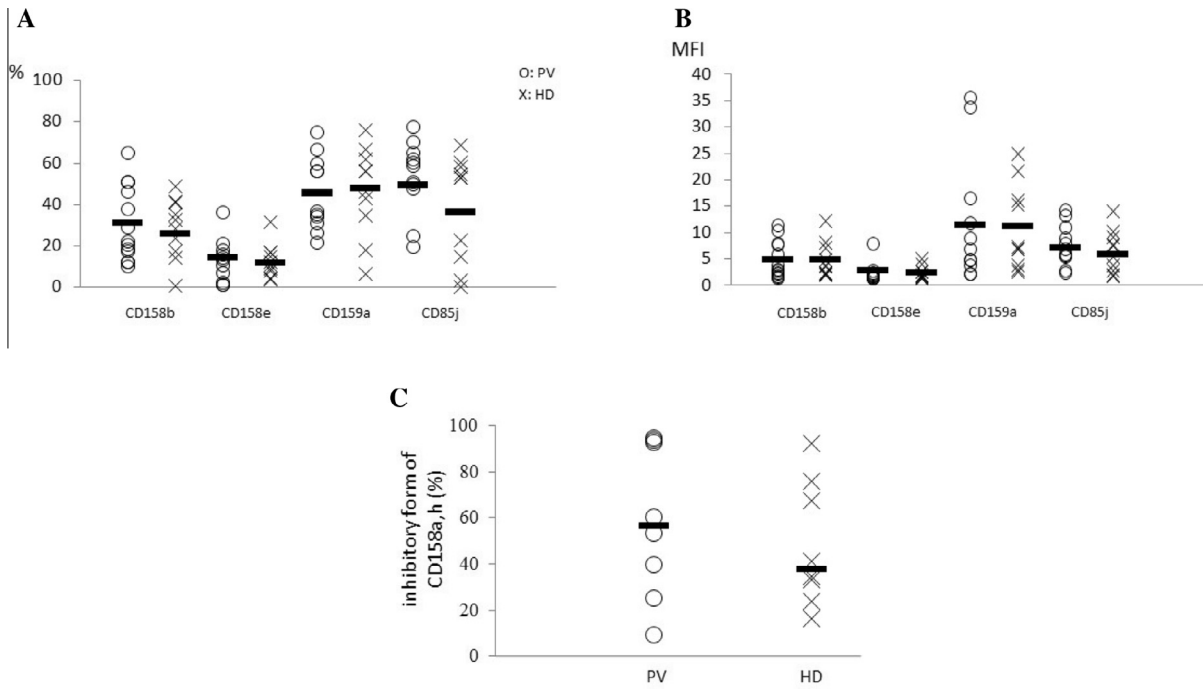


Fig. 4. Expression of inhibitory receptors (CD158b, CD158e, CD159a and CD85j) by resting NK cells in PV patients (O) and in HD (X): (A) percentage of expression, (B) MFI. (C) This figure represents the percentage of inhibitory form of CD158a,h in PV patient (8) and HD (8).

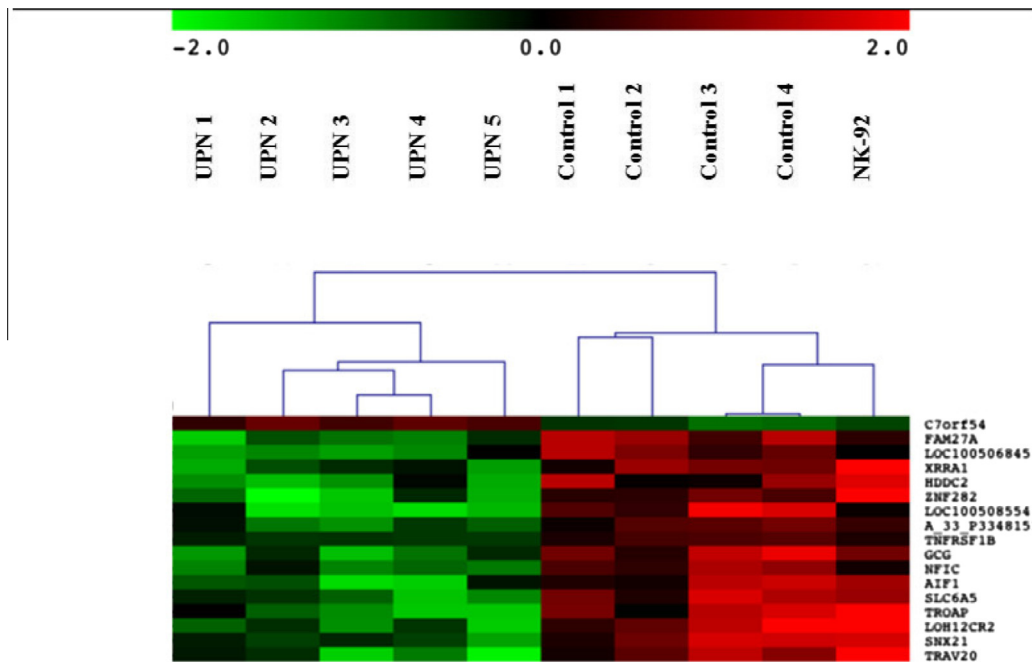


Fig. 5. Hierarchical clustering of PV-NK cells genes. Differential gene expression obtained between resting NK cells from 5 PV-patients (UPN) and 4 HD with one NK cells line NK-92. Seventeen genes are differentially expressed; over-expressed genes are represented in red and down-regulated genes in green.

membrane $TNF\alpha$ (m $TNF\alpha$) that is responsible for cytotoxic activity of resting NK cells (assessed using paraformaldehyde fixed NK cells in order to avoid the participation of cytotoxic soluble mediators such as perforine, granzyme and $TNF\alpha$) [4]. Normal or even increased $TNF\alpha$ levels could participate in immune surveillance by resting PV-NK, without any effect of a putative imbalance of negative vs positive signaling surface molecules. Finally, since PV-NK seems to mostly behave as normal HD-NK despite the

JAK2 gain of function mutation, we compared the whole gene expression in the two NK populations by the transcriptomic microarray approach. We identified a pattern of gene expression that distinguished PV-NK from HD-NK, with seventeen genes differentially expressed between PV and HD NK cells. The only gene expression up-regulated in PV-NK was C7orf54 (Chromosome 7 open reading frame 54). This gene has no known function and has been identified in a genome-wide gene-environment

interaction analysis for asbestos exposure in lung [29]. The other fifteen genes were all less expressed in PV-NK than in HD-NK. The functions of these fifteen genes are mostly unknown in NK, except for the tumor necrosis factor receptor superfamily member 1B (TNFRS1B = TNFR2 = CD120b = p75) which is the ligand for TNF α , a cytokine produced by NK themselves and monocytes/macrophages. The down-regulation of both TNFRS1B could have putative implication for NK cytotoxicity, since this receptor as a positive role in the regulation of cytotoxic function of NK cells that could not be detected under our investigational procedures. Nonetheless, the measure of TNFR2 expression at NK cell surface has to be performed since RNA levels do not preclude effective protein expression [20]. We lack of identified functions for some of the other fourteen differentially expressed genes. Nonetheless, we surprisingly observed that some genes more expressed in HD-NK than in PV-NK corresponded to genes associated to diseases and more particularly to cancer. AIF1 (allograft inflammatory factor 1) is associated with demyelinating polyneuropathy, XRRAR1 (X-ray radiation resistance associated 1) is suspected to be involved in neuroblastoma and colorectal cancer, TROAP (trophinin associated protein) is associated with in human gallbladder cancer, while ZNF282 (zinc finger protein 282/HUB-1) and LOH-12CR2 (loss of heterozygosity, 12, chromosomal region 2) expression are both associated with leukemia [6,7,22,24,25]. Although it is not possible to draw firm conclusion from this observation, we can nonetheless observe that JAK2 gain of function mutation, despite the constitutive activation of the JAK/STAT pathway, does not lead to over-expression (at least in NK) of oncogenes. We also failed to obtain a functional enrichment from our transcriptional study of PV-NK, a result that is counterintuitive in the context of a gain of function mutation.

We conclude that, in contrast with the study of Chiorean et al. [8] in CML in which the significant modification of CML-NK phenotype is induced by BCR/ABL gain of function mutation, the JAK2 mutation did not drastically modify PV-NK phenotype at least for the parameter we tested. This could be in part due to the inhibition of receptor signaling through JAK2 (either normal or mutated) by HLA-G molecules secreted by the remaining normal erythroblasts [21]. This observation is important since it may give some clue for the relative good prognosis of PV that, despite its potent gain of function mutation, has a relatively low rate of leukemic transformation that could in part be explained by effective innate immune surveillance, in contrast with CML, leukemia, myeloma or even myelodysplastic syndromes [10,11,17]. Moreover, the preserved functions of PV-NK predict the putative efficacy of immunotherapeutic strategies and could partly explain the efficiency of PV treatment by IFN α [18]. In fact, part of the mechanisms of action of IFN α in PV relies on its immune properties; enhancement of NK cells cytotoxicity, production of IFN- γ , accumulation and survival of NK by IL-15 induction, together with the secretion of other cytokines via an autocrine IFN- γ loop [15]. All these effects are likely to be more efficient on a population with normal or subnormal baseline properties, in sharp contrast with the drastic loss of function of NK observed in leukemia and that is hardly overcome by today available immune-restoration strategies.

Conflict of interest

The authors have no competing interests.

Acknowledgments

The authors would like to thank INSERM and Region Provence-Alpes C \hat{ot} es d'Azur for grants "bourse doctorale regionale 2011–2014." We are grateful to Laurence Borge for assistance with

the use of the cell culture platform facility (CRCM U1068, Marseille) and we thank Drs. Amelie Cornillon and Martin Villalba (UMR_S 1040, Montpellier) for training us in the NK cell expansion protocol.

References

- [1] Alter G, Malenfant JM, Altfeld M. CD107a as a functional marker for the identification of natural killer cell activity. *J. Immunol. Methods* 2004;294:15–22.
- [2] Baier C, Fino A, Sanchez C, Farnault L, Rihet P, Kahn-Perles B, Costello RT. Natural killer cells modulation in hematological malignancies. *Front. Immunol.* 2013;4:459.
- [3] Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, et al. Acquired mutation of the tyrosine kinase JAK2 in human myeloproliferative disorders. *Lancet* 2005;365:1054–61.
- [4] Caron G, Delneste Y, Aubry JP, Magistrelli G, Herbault N, Blaecke A, Meager A, Bonnefoy JY, Jeannin P. Human NK cells constitutively express membrane TNF-alpha (mTNFalpha) and present mTNFalpha-dependent cytotoxic activity. *Eur. J. Immunol.* 1999;29:3588–95.
- [5] Caumartin J, Favier B, Daouya M, Guillard C, Moreau P, Carosella ED, LeMaout J. Trogocytosis-based generation of suppressive NK cells. *EMBO J.* 2007;26:1423–33.
- [6] Cave H, Gerard B, Martin E, Guidal C, Devaux I, Weissenbach J, Elion J, Vilmer E, Grandchamp B. Loss of heterozygosity in the chromosomal region 12p12–13 is very common in childhood acute lymphoblastic leukemia and permits the precise localization of a tumor-suppressor gene distinct from p27KIP1. *Blood* 1995;86:3869–75.
- [7] Chang XZ, Yu J, Zhang XH, Yin J, Wang T, Cao XC. Enhanced expression of trophinin promotes invasive and metastatic potential of human gallbladder cancer cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2009;135:581–90.
- [8] Chiorean EG, Dylla SJ, Olsen K, Lenvik T, Soignier Y, Miller JS. BCR/ABL alters the function of NK cells and the acquisition of killer immunoglobulin-like receptors (KIRs). *Blood* 2003;101:3527–33.
- [9] Cognet C, Farnier C, Gauthier L, Frassati C, Andre P, Magerus-Chatinet A, Anfosso N, Rieux-Laucat F, Vivier E, Schleinitz N. Expression of the HLA-C2-specific activating killer-cell Ig-like receptor KIR2DS1 on NK and T cells. *Clin. Immunol.* 2010;135:26–32.
- [10] Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, Le Treut T, Sebahoun G. Differential expression of natural killer cell activating receptors in blood versus bone marrow in patients with monoclonal gammopathy. *Immunology* 2013;139:338–41.
- [11] Costello RT, Sivori S, Marcenaro E, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Reviron D, Gastaut JA, Pende D, Olive D, Moretta A. Defective expression and function of natural killer cell-triggering receptors in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2002;99:3661–7.
- [12] Delhommeau F, Dupont S, Tonetti C, Masse A, Godin I, Le Couedic JP, Debili N, Saulnier P, Casadevall N, Vainchenker W, et al. Evidence that the JAK2 G1849T (V617F) mutation occurs in a lymphomyeloid progenitor in polycythemia vera and idiopathic myelofibrosis. *Blood* 2007;109:71–7.
- [13] Froom P, Aghai E, Kinarty A, Lahat N. Decreased natural killer (NK) activity in patients with myeloproliferative disorders. *Cancer* 1989;64:1038–40.
- [14] Gersuk GM, Carmel R, Pattamakom S, Challita PM, Rabinowitz AP, Pattengale PK. Quantitative and functional studies of impaired natural killer (NK) cells in patients with myelofibrosis, essential thrombocythemia, and polycythemia vera. I. A potential role for platelet-derived growth factor in defective NK cytotoxicity. *Nat. Immun.* 1993;12:136–51.
- [15] Hervás-Stubb S, Perez-Gracia JL, Rouzaut A, Sanmamed MF, Le Bon A, Melero I. Direct effects of type I interferons on cells of the immune system. *Clin. Cancer Res.* 2011;17:2619–27.
- [16] James C, Ugo V, Le Couedic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griselli A, et al. A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature* 2005;434:1144–8.
- [17] Kiladjian JJ, Bourgeois E, Lobe I, Braun T, Visentin G, Bourhis JH, Fenaux P, Chouaib S, Caignard A. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia* 2006;20:463–70.
- [18] Kiladjian JJ, Mesa RA, Hoffman R. The renaissance of interferon therapy for the treatment of myeloid malignancies. *Blood* 2011;117:4706–15.
- [19] Larsen TS, Christensen JH, Hasselbalch HC, Pallisgaard N. The JAK2 V617F mutation involves B- and T-lymphocyte lineages in a subgroup of patients with Philadelphia-chromosome negative chronic myeloproliferative disorders. *Br. J. Haematol.* 2007;136:745–51.
- [20] Mason AT, McVicar DW, Smith CA, Young HA, Ware CF, Ortaldo JR. Regulation of NK cells through the 80-kDa TNFR (CD120b). *J. Leukoc. Biol.* 1995;58:249–55.
- [21] Menier C, Guillard C, Cassinat B, Carosella ED, Rouas-Freiss N. HLA-G turns off erythropoietin receptor signaling through JAK2 and JAK2 V617F dephosphorylation: clinical relevance in polycythemia vera. *Leukemia* 2008;22:578–84.
- [22] Mesak FM, Osada N, Hashimoto K, Liu QY, Ng CE. Molecular cloning, genomic characterization and over-expression of a novel gene, XRRAR1, identified from human colorectal cancer cell HCT116Clone2_XRR and macaque testis. *BMC Genomics* 2003;4:32.

- [23] O'Shea JJ, Holland SM, Staudt LM. JAKs and STATs in immunity, immunodeficiency, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 2013;368:161–70.
- [24] Okumura K, Sakaguchi G, Naito K, Tamura T, Igarashi H. HUB1, a novel Kruppel type zinc finger protein, represses the human T cell leukemia virus type 1 long terminal repeat-mediated expression. *Nucleic Acids Res.* 1997;25:5025–32.
- [25] Pawlik A, Herczynska MM, Dziedziejko V, Malinowski D, Kurzawski M, Drozdziak M, Gawronska-Szklarz B. Effect of allograft inflammatory factor-1 gene polymorphisms on rheumatoid arthritis treatment with methotrexate. *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)* 2013;67:637–42.
- [26] Sanchez CJ, Le Treut T, Boehrer A, Knoblauch B, Imbert J, Olive D, Costello RT. Natural killer cells and malignant haemopathies: a model for the interaction of cancer with innate immunity. *Cancer Immunol. Immunother.* 2011;60:1–13.
- [27] Schneider WM, Chevillotte MD, Rice CM. Interferon-stimulated genes: a complex web of host defenses. *Annu. Rev. Immunol.* 2014;32:513–45.
- [28] Tefferi A, Rumi E, Finazzi G, Gisslinger H, Vannucchi AM, Rodeghiero F, Randi ML, Vaidya R, Cazzola M, Rambaldi A, et al. Survival and prognosis among 1545 patients with contemporary polycythemia vera: an international study. *Leukemia* 2013;27:1874–81.
- [29] Wei S, Wang LE, McHugh MK, Han Y, Xiong M, Amos CI, Spitz MR, Wei QW. Genome-wide gene-environment interaction analysis for asbestos exposure in lung cancer susceptibility. *Carcinogenesis* 2012;33:1531–7.

Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

R. Costello, G. Venton, J. Colle, Y. Labiad, P. Poullin

À V. Bergoin-Costello, In Memoriam.

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques après intensification thérapeutique est considérée comme un standard dans la prise en charge de plusieurs pathologies, comme le myélome multiple du sujet jeune ou les lymphomes de haut grade de malignité en rechute. Ces deux pathologies constituent l'essentiel des indications de l'autogreffe, bien que cette approche thérapeutique puisse présenter un intérêt dans certaines tumeurs solides ou certaines affections auto-immunes. Le greffon est très majoritairement recueilli par cytophérèse et non plus par prélèvements médullaires, procédure devenue marginale. Le greffon collecté est utilisé en l'état, sans purge tumorale ni expansion cellulaire. La réinjection d'un nombre suffisant de cellules souches hématopoïétiques (évalué par le marqueur CD34) associée à l'utilisation de facteurs de croissance hématopoïétiques et aux soins de support (antibiotiques notamment) permet de réduire significativement la durée de l'aplasie médullaire induite par le conditionnement intensif et d'amener la mortalité de la procédure en dessous de 3%. La chimiothérapie de conditionnement de l'autogreffe dépend de la pathologie traitée, le melphalan à haute dose étant généralement utilisé dans le myélome, et la chimiothérapie BEAM (carmustine, étoposide, cytarabine, melphalan) ou ses dérivés dans les lymphomes. L'utilisation de fortes doses de chimiothérapie lors du conditionnement à la greffe peut entraîner des toxicités à long terme, notamment cardiovasculaires et hématologiques, rendant nécessaire une surveillance à vie de ces patients. Il est probable cependant que les avancées thérapeutiques dans les deux indications majeures que sont le lymphome hodgkinien ou non hodgkinien en rechute et le myélome remettent en question la place de l'autogreffe dans la stratégie de leur prise en charge.

© 2016 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.

Mots-clés : Autogreffe ; Cellules souches hématopoïétiques ; Thérapie cellulaire

Plan

■ Introduction	1
■ Évolution des pratiques	2
■ Notions réglementaires	2
■ Aspects techniques	2
Prélèvement des cellules souches	2
Contamination du greffon	3
■ Bilan prégreffe	4
■ Conditionnement	4
■ Indications	4
Hémopathies	4
Autres indications	7
■ Suivi des patients autogreffés	8
■ Complications de l'autogreffe	8
■ Perspectives et conclusions	9

■ Introduction

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) après intensification thérapeutique consiste en l'administration d'une chimiothérapie intensive, extrêmement aplasante, suivie de la réinjection d'un greffon autologue qui permet une reconstitution hématologique rapide. Cette procédure permet de raccourcir significativement la durée d'aplasie théorique, et de fait, diminue la morbidité et la mortalité du traitement intensif à un seuil acceptable pour le patient. L'utilisation de l'autogreffe comme support pour des chimiothérapies moins intensives, afin de respecter des délais courts entre deux cycles de chimiothérapie, n'a pas à ce jour montré un grand intérêt. Moins d'une centaine d'autogreffes sont réalisées par an en France dans cette optique.

L'autogreffe de CSH s'est largement développée durant les deux dernières décennies, notamment grâce à l'utilisation des facteurs de croissance hématopoïétiques. À quelques exceptions près (quelques cas de tumeurs solides, affections auto-immunes),

L'autogreffe est indiquée dans la prise en charge des hémopathies malignes. Contrairement à l'allogreffe, il n'y a pas d'effet antitumoral propre du greffon, mais des techniques de manipulation du greffon peuvent être utilisées pour augmenter ses capacités immunitaires (affections malignes) ou au contraire induire une immunosuppression durable (affections auto-immunes).

■ Évolution des pratiques

Le nombre d'autogreffes réalisées en Europe et déclarées à l'*European Group for Blood and Marrow Transplantation* (EBMT, Annual Report/13) n'a cessé d'augmenter durant les deux dernières décennies, passant de 3000 greffes en 1990 à près de 20000 en 2012. En 2012, 532 autogreffes ont été effectuées pour des leucémies aiguës, 17209 pour des hémopathies lymphoïdes (lymphomes hodgkiniens ou non, hémopathies plasmocytaires), 1581 pour des tumeurs solides et 195 pour des affections non malignes.

■ Notions réglementaires

L'activité clinique d'autogreffe de CSH ne nécessite pas en soi d'autorisation, mais doit être déclarée auprès de l'Agence de biomédecine. En revanche, la collecte, le transport et la conservation de ces cellules sont encadrés par des règles très strictes définies dans le document édité par le ministère du Travail, de l'Emploi et de la Santé / ministère des Solidarités et de la Cohésion sociale : *Décision du 27 octobre 2010 définissant les règles de bonnes pratiques relatives à la préparation, à la conservation, au transport, à la distribution et à la cession des tissus, des cellules et des préparations de thérapie cellulaire* (NOR : SASM1020261S).

■ Aspects techniques

Prélèvement des cellules souches

La grande majorité des prélèvements se fait par mobilisation de cellules souches périphériques (CSP) et non plus par prélèvements médullaires, pour plusieurs raisons : tout d'abord éviter une anesthésie générale, mais aussi permettre une reconstitution hématopoïétique plus rapide et diminuer la contamination potentielle du greffon par des cellules tumorales résiduelles^[1]. La cytophérèse se déroule en ambulatoire, le patient non à jeun, confortablement installé et surveillé (tension artérielle, pouls, électrocardiogramme). Elle nécessite un séparateur de cellules à flux continu, dont divers modèles sont disponibles, d'efficacité comparable. La procédure est assez longue, car elle nécessite le traitement d'un volume de deux à trois masses sanguines. Sa durée dépend du volume sanguin du patient et de la qualité de ses accès veineux périphériques. Généralement bien tolérée, la procédure de cytophérèse comporte certains effets indésirables : thrombopénie, hypovolémie, hématomes aux points de ponction veineuse, plus rarement complications liées à la pose d'un cathéter central (thrombose ou infection), hypocalcémie induite par l'anticoagulant utilisé (solution de citrate, ACD-A). Ce dernier effet secondaire peut être facilement prévenu en réduisant le débit de prélèvement et le ratio d'anticoagulant, et en apportant du calcium intraveineux pendant la procédure.

La richesse en CSH du sang ou du greffon est évaluée par l'expression de la molécule membranaire CD34 en cytométrie de flux. Cependant, seule une faible fraction de ce pool de cellules CD34⁺ (1/1000) est constituée d'authentiques CSH. Même le phénotype classique de la CSH (Lin⁻, Sca-1⁺, c-kit⁺, CD150⁺ et en G0 du cycle cellulaire) est remis en question par des données de 2014 montrant une grande plasticité dans ce phénotype, liée notamment à une continue remise en cycle des CSH^[2]. Un taux de cellules CD34⁺ circulantes au moins égal à 10/ μ l permet de réaliser la collecte par cytophérèse. Le nombre minimal de cellules CD34 à collecter pour obtenir un greffon qui permet une

bonne reconstitution hématologique est estimé à 2×10^6 /kg. Par sécurité, le nombre optimal est fixé à 5×10^6 /kg^[3]. La marge de sécurité est assez large ; en effet, pour les doses de CD34⁺ supérieures à $0,5 \times 10^6$ /kg, les délais médians de reconstitution de l'hématopoïèse ne varient que très peu. Ils passent de 11 jours ($0,5$ à $2,5 \times 10^6$ /kg) à 8 jours ($> 12,5 \times 10^6$ /kg) pour un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 0,5 G/l, et de 12 jours ($0,5$ à $2,5 \times 10^6$ /kg) à 8 jours ($> 12,5 \times 10^6$ /kg) pour une reconstitution plaquettaire supérieure à 20 G/l. Les autres paramètres à considérer sont l'impact significativement favorable sur les neutrophiles de l'utilisation de *granulocyte - colony stimulating factor* (G-CSF) et l'impact défavorable sur la reconstitution plaquettaire lorsque le recueil d'un greffon suffisant a nécessité de réaliser plus d'une mobilisation. De nombreux facteurs peuvent a priori laisser présager une mauvaise collecte, comme certaines chimiothérapies (fludarabine, sels de platine, lénalidomide), une numération plaquettaire faible, une moelle pauvre, un faible taux basal de CD34⁺, une irradiation préalable ou un âge avancé.

La mobilisation des cellules souches requiert l'utilisation d'un facteur de croissance, le G-CSF essentiellement, puisque le *granulocyte macrophage colony - stimulating factor* (GM-CSF) n'est plus disponible en France. Le mécanisme d'action du G-CSF passe par l'augmentation du contingent granuleux médullaire, mais aussi par la diminution d'expression des molécules d'adhésion des cellules souches, dont l'interaction SDF-1/CXCR4, mécanisme exploité plus spécifiquement par le plérixafor (cf. infra). La mobilisation peut se faire selon deux schémas. Soit « à l'équilibre », c'est-à-dire à distance de toute chimiothérapie, alors que le fonctionnement médullaire est à l'état basal. On utilise alors du G-CSF à la dose de 10 μ g/kg par jour, avec en général une augmentation significative des CD34⁺ à partir du cinquième jour. L'autre possibilité est l'utilisation d'une chimiothérapie de mobilisation, la plus courante étant certainement le cyclophosphamide à forte dose (3 à 6 g/m²). Dans ce cas, la dose de G-CSF est souvent réduite à 5 μ g/kg par jour car l'aplasie induite par la chimiothérapie provoque déjà, lors de la récupération médullaire, un passage sanguin de cellules hématopoïétiques CD34⁺. La chimiothérapie de mobilisation permet une meilleure collecte de CSH, diminue la contamination du greffon par des cellules tumorales et augmente la réponse au G-CSF. En cas d'échec de la collecte par G-CSF associée ou non à la chimiothérapie, l'utilisation du plérixafor permet d'obtenir malgré tout un greffon autologue de qualité acceptable chez un certain nombre de patients.

Le plérixafor (Mozobil[®], AMD3100) est une molécule qui inhibe l'interaction entre SDF-1 et CXCR4. Il est habituellement utilisé à la dose de 240 μ g/kg par voie sous-cutanée, en association avec le G-CSF à la dose de 10 μ g/kg. Il est nécessaire de respecter un délai d'une dizaine d'heures avant la cytophérèse. En effet, la courbe de la concentration de cellules CD34⁺ en fonction du temps comporte un pic à neuf heures après l'injection sous-cutanée de plérixafor seul et un pic à dix heures en association au G-CSF. Néanmoins, si l'on suit le taux de CD34⁺ de façon répétée après l'injection de plérixafor, on observe que le taux de CD34⁺ suffisant pour déclencher le début de la cytophérèse est souvent obtenu dès la troisième heure, avec une diminution souvent rapide après la huitième heure, d'où la nécessité d'un dosage précoce des CD34⁺, surtout chez les mauvais mobilisateurs^[4]. Le plérixafor permet de mobiliser les CSH chez certains patients en échec après mobilisation standard et il est dans certains cas utilisé d'emblée chez des patients présentant des facteurs de risque de mauvaise mobilisation. Une étude randomisée en double aveugle dans le myélome a montré que l'utilisation du plérixafor permettait de mobiliser plus de 6×10^6 CD34⁺/kg dans plus de 71 % des cas, contre seulement un peu plus de 34 % dans le groupe traité par G-CSF seul^[5]. Il a aussi été mis en évidence que l'utilisation du plérixafor permet de mobiliser une population de cellules souches plus primitives, donc plus clonogéniques, identifiées par leur phénotype CD34⁺ CD38⁻ et une expression forte de l'aldéhyde déshydrogénase^[6]. D'autres inhibiteurs de l'interaction CXCR4/SDF-1 sont en cours de développement, comme le peptide POL6326, le TG-0054, le NOX-A12 ou le BTK140. Ce dernier composé a donné des résultats intéressants car il a une affinité pour CXCR4 20 fois supérieure au plérixafor, et permet, avec une seule injection à la dose de 0,9 mg/kg, un recueil médian de plus de 20×10^6 CD34⁺/kg, chez

des patients en première ligne de mobilisation pour myélome^[7]. Ce composé BTK140 aurait de plus une action antimyéломateuse directe.

En plus du plérixafor, utilisé en pratique clinique courante, et des autres inhibiteurs de l'interaction CXCR4/SDF-1, d'autres molécules présentent un intérêt potentiel (pour revue^[8]). Le *stem cell factor* (SCF, ligand de c-kit), dans sa forme membranaire, induit l'adhésion des cellules souches au stroma médullaire en se liant à c-kit, cette interaction pouvant être inhibée en utilisant la forme soluble du SCF. Une étude récente a montré qu'une collecte d'au moins 2×10^6 /kg CD34⁺ peut être obtenue grâce à l'utilisation du SCF (Ancestim®) chez 31 % des patients mauvais mobilisateurs^[9]. Les agonistes de la sphingosine-1-phosphate (S1P) augmentent la mobilisation des CSP induite par les inhibiteurs de CXCR4^[10]. L'inhibition des intégrines *very late antigen 4* (VLA-4) /*vascular adhesion molecule 1* (VCAM-1) par l'anticorps monoclonal natalizumab induit une augmentation significative des CSH circulantes. On a pu observer chez les patients traités par le natalizumab pour une sclérose en plaques que cet effet persiste dans l'intervalle qui sépare les perfusions mensuelles^[11]. Cet effet rémanent pourrait être intéressant pour des protocoles de mobilisation chez les patients mauvais répondeurs. Autre effet intéressant, celui de la parathormone sur les taux de CSH circulants, permettant d'obtenir une mobilisation satisfaisante chez plus de 40 % des patients après échec d'un ou deux protocoles de mobilisation^[12]. L'hypoxie est un facteur de quiescence pour les cellules souches ; l'*hypoxia-inducible factor* (HIF) induit l'augmentation d'expression du *vascular endothelial growth factor* (VEGF), qui provoque à son tour une vasodilatation des sinusoides médullaires et par là-même facilite le passage sanguin des CSH. Ceci a été mis à profit par l'utilisation du FG-4497, stabilisateur de HIF-1, qui augmente d'un facteur six la mobilisation provoquée par l'association de G-CSF et de plérixafor^[13]. Enfin, il faut noter que l'inhibiteur du protéasome bortézomib (Velcade®), molécule capitale dans le traitement du myélome, améliore la mobilisation des cellules souches en association avec la chimiothérapie de mobilisation classique cyclophosphamide/G-CSF, avec un nombre médian de cellules CD34⁺ collectées supérieur à 20×10^6 /kg chez 85 % des patients^[14].

Un autre élément important à considérer lors de la collecte est la technique d'aphérèse utilisée (pour revue^[15]), mais les différences entre les systèmes de collecte en flux continu disponibles n'ont qu'un impact modeste sur la richesse du greffon par rapport aux facteurs prédictifs précollecte liés au patient lui-même.

Si la collecte de cellules souches est insuffisante, une alternative consisterait à procéder à l'expansion de ces cellules in vitro (pour revue^[16]). Les premières tentatives d'expansion utilisaient des cytokines jouant un rôle important dans l'hématopoïèse, telles que le SCF, Flt3L, Tpo, les interleukines 3, 6 ou 11. Cependant, ces cocktails de cytokines induisent le plus souvent une différenciation des cellules, avec pour résultat un appauvrissement du greffon en cellules dotées de capacités de repopulation à long terme. Dans le meilleur des cas, on aboutit à une amplification modeste au prix d'un surcoût important, rendant la procédure inapplicable en routine clinique. La modulation des voies métaboliques gouvernant la différenciation/division des cellules souches hématopoïétiques (WNT, NOTCH, TGFβ) pourrait permettre de contrôler les divisions cellulaires asymétriques et d'obtenir l'expansion du greffon tout en préservant le pool de cellules indifférenciées. Enfin, des molécules utilisées en hématologie dans d'autres indications (acide tout-transrétinoïque, prostaglandine E₂, inhibiteurs d'histone désacétylases) pourraient théoriquement permettre l'autorenouvellement in vitro des cellules souches hématopoïétiques.

Une fois collectées, les cellules doivent être le plus souvent congelées, car la réinjection est différée, bien que l'on puisse utiliser des cellules souches non congelées jusqu'à neuf jours après le recueil sans nuire à la reconstitution hématopoïétique^[17]. La conservation du greffon se fait le plus souvent en azote liquide, car même si le stockage à -80 °C est possible, la viabilité cellulaire ne permettrait un délai de conservation que de quelques mois. Les techniques en azote liquide peuvent utiliser la phase liquide

à -196 °C, qui permettrait la dissémination de certains champignons et des virus, ce qui fait in fine préférer la technique en vapeur d'azote à -156 °C (pour revue^[18]).

“ Point fort

Le recueil des cellules souches s'effectue en 2015 le plus souvent par cytophérèse, après mobilisation par G-CSF, soit « à l'équilibre », soit après une chimiothérapie, spécifique ou non. Les facteurs prédictifs de mauvaise mobilisation doivent être identifiés. L'introduction du plérixafor dans la stratégie de mobilisation permet d'obtenir plus facilement le nombre requis de cellules souches et de réduire fortement les échecs de mobilisation.

Contamination du greffon

La déplétion en cellules tumorales contaminant le greffon autologue par des techniques in vitro ou ex vivo a perdu quelque peu d'intérêt, notamment grâce aux progrès effectués durant les dernières années dans le traitement du myélome et des lymphomes. Selon une étude ancienne et non randomisée dans le myélome, la sélection positive des cellules CD34⁺, censée éliminer les pré-curseurs plasmocytaires, n'apporte pas de bénéfice^[19]. Une étude plus récente a comparé 24 patients ayant bénéficié d'une sélection positive des CD34⁺ par technique CliniMACS à 32 patients autogreffés avec un greffon non manipulé^[20]. Le taux de survie globale à trois ans était de 91 % dans le groupe « sélection CD34⁺ » versus 56 % pour les greffons non manipulés, avec des taux de survie sans progression respectifs de 79 % et 53 %. Dans le groupe traité par greffon manipulé, le délai de reconstitution hématologique était plus long et l'incidence des réactivations du cytomégalovirus plus élevée, sans que cela ne se traduise par une augmentation de la mortalité. Néanmoins, le faible effectif de cette étude et l'hétérogénéité des patients empêchent toute conclusion définitive. Dans les leucémies aiguës, une étude récente montre une corrélation entre le niveau du transcrit du gène WT-1 dans le produit de cytophérèse et le risque de rechute, mais évidemment cette donnée peut aussi simplement refléter la charge tumorale résiduelle du patient et n'est pas un argument décisif pour la purge du greffon^[21]. Dans le lymphome folliculaire en rechute, une étude randomisée a montré que la purge du greffon n'améliore pas le pronostic^[22]. La purge du greffon a pu aussi être incriminée dans l'augmentation des complications infectieuses^[23].

En conclusion, la contamination du greffon apparaît plutôt comme un reflet de la charge tumorale résiduelle, ce qui incite à améliorer la purge « in vivo » c'est-à-dire le traitement préalable de l'hémopathie, plutôt que d'éliminer les cellules tumorales résiduelles du greffon. Néanmoins, cette notion est à moduler car à mesure que l'efficacité du conditionnement de l'autogreffe s'améliore, les quelques cellules tumorales résiduelles du greffon peuvent redevenir un élément important du risque de rechute.

“ Point fort

Conceptuellement intéressante, la purge du greffon de ses éventuelles cellules tumorales résiduelles, soit en détruisant ex vivo ces cellules, soit en sélectionnant de façon positive les cellules CD34⁺, n'a pas vraiment fait ses preuves. Cette technique entraîne la perte de cellules, des risques infectieux et un surcoût important pour un gain thérapeutique discutable, car les rechutes émanent souvent de cellules résiduelles présentes chez le patient, dont la contamination du greffon est plutôt un témoin.

■ Bilan prégreffe

La réalisation en toute sécurité de l'autogreffe, dont le risque essentiel réside dans la période d'aplasie, nécessite un bilan prégreffe rigoureux pour minimiser les risques de la procédure [24].

“ Point important

Recommandations pour le bilan prégreffe

- Évaluation biologique des fonctions hépatique et rénale.
- Fraction d'éjection ventriculaire gauche (échographie, méthode isotopique).
- Électrocardiogramme.
- Radiographie du thorax en l'absence de scanner récent.
- Épreuves fonctionnelles respiratoires (dont diffusion du monoxyde de carbone et gazométrie).
- Test de grossesse.
- Évaluation de l'état buccodentaire/orthopantomogramme.
- Sérologies du cytomégalovirus, des herpès virus, varicelle/zona, virus de l'immunodéficience humaine, hépatites B et C.

“ Point fort

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est largement utilisée, notamment en raison de la sûreté de la procédure, dont le taux de mortalité inférieur à 3 % est bien plus faible que dans l'allogreffe.

■ Conditionnement

Si l'irradiation corporelle totale a pu être utilisée dans certains cas en association à divers conditionnements, cette procédure semble apporter plus de toxicité sans gain thérapeutique appréciable, à quelques exceptions près. Les chimiothérapies de conditionnement les plus classiques sont le melphalan à haute dose dans le myélome et les polychimiothérapies BEAM (carmustine, étoposide, cytarabine, melphalan), CBV (cyclophosphamide, carmustine, étoposide), BEAC (carmustine, étoposide, cytarabine, melphalan) dans les lymphomes. Dans le myélome du sujet jeune, la dose de référence de melphalan est de 200 mg/m², depuis que l'Intergroupe francophone du myélome (IFM) a montré que cette dose de melphalan seul était aussi efficace et moins toxique que l'association de melphalan 140 mg/m² et d'une irradiation corporelle totale de 8 Gy. De même, l'association busulfan-melphalan 140 mg/m² est plus toxique que le melphalan seul, avec une moins bonne réponse [25]. Chez le sujet âgé (au-delà de 65 ans) ou à fonction rénale altérée, le melphalan est utilisé à la dose réduite de 140 mg/m². Une étude de l'IFM a montré l'intérêt de l'association melphalan-bortézomib, qui n'augmente pas la toxicité hématologique du melphalan tout en donnant un meilleur taux de réponse complète [26].

Dans les lymphomes, divers schémas de conditionnement ont été testés, notamment le remplacement du rituximab (R) par un anticorps radioactif. L'association d'ibrutumomab tiuxetan (Zevalin®) au BEAM est faisable en termes de toxicité mais, selon une étude rétrospective portant sur 46 patients atteints de lymphome du manteau, n'a pas apporté de bénéfice en termes de survie par rapport à R-BEAM [27]. L'adjonction de l'iode 131-

tositumomab est techniquement complexe à mettre en œuvre, en France au moins, car l'iode 131 est un émetteur gamma qui impose des précautions particulières. Le remplacement de la carmustine par la bendamustine semble donner des résultats identiques, voire supérieurs au classique BEAM [28]. Certaines formes de lymphomes, touchant en particulier le système nerveux central, semblent bénéficier de conditionnements spécifiques comme l'association rituximab-busulfan-thiotépa [29].

Dans l'amylose, la dose de melphalan peut être réduite de 200 à 140 mg/m² en fonction des facteurs pronostiques, notamment le taux de *brain natriuretic peptide* (BNP) [30].

Les conditionnements utilisés dans le cadre des indications restreintes de greffe autologue pour leucémie aiguë sont eux aussi spécifiques. L'association d'idarubicine à haute dose et de busulfan a donné lieu à une probabilité de rechute de 40 % à deux ans dans le groupe des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) de bon pronostic ou de pronostic intermédiaire [31].

Dans les pathologies auto-immunes, le risque léthal lié à la greffe a amené certaines équipes à utiliser des conditionnements atténués. Par exemple, dans la sclérose en plaques, où le conditionnement de référence est le BEAM, l'utilisation d'un conditionnement « mini-BEAM-like » semble donner de bons résultats, sans aucune létalité [32]. Dans la sclérose en plaques, le conditionnement par chimiothérapie classique peut être utilement complété par un traitement immunosuppresseur de type immunoglobulines antithymocytes [33]. Dans le diabète de type 1 d'installation récente, l'autogreffe a pu montrer une certaine efficacité, avec un conditionnement par cyclophosphamide 200 mg/m² plus immunoglobulines antithymocytes, mais au prix d'une toxicité certaine, dont un décès dans une série de 65 patients [34].

“ Point fort

Le conditionnement est l'élément essentiel de l'efficacité antitumorale de l'autogreffe. Il s'agit d'une chimiothérapie à haute dose dont la composition dépend de la nature de la maladie à traiter.

■ Indications

L'autogreffe ne se limite pas à l'hématologie maligne, qui constitue néanmoins l'essentiel des indications. En effet, l'autogreffe peut présenter un intérêt dans certains cas très particuliers de tumeurs solides, voire dans des pathologies auto-immunes. L'EBMT publie des recommandations qui peuvent servir de base à la discussion [35]. Ces indications sont résumées dans les [Tableaux 1 et 2](#), en se limitant à celles qui sont reconnues comme un traitement de référence ou comme une option raisonnable au vu des données disponibles (donc en excluant les possibles essais thérapeutiques en cours). Une discussion au cas par cas est toujours indispensable, pour prendre en compte le profil individuel du patient et intégrer, le cas échéant, les données nouvelles générées depuis l'élaboration de ces recommandations.

Hémopathies

Myélome

L'autogreffe s'est imposée dans le contexte des chimiothérapies « classiques », de type VAD (vincristine, adriamycine, dexaméthasone) ou autres, comme le traitement de référence des patients jeunes (<65 ans) atteints de myélome. Au-delà de 65 ans, la toxicité de la procédure en diminue l'intérêt. L'arrivée des inhibiteurs du protéasome et des agents dits immunomodulateurs a permis d'obtenir une plus grande efficacité antitumorale du

Tableau 1.
Indications oncohématologiques de l'autogreffe chez l'adulte.

Leucémies aiguës myéloïdes		
Rémission complète 1, faible risque		Optionnel
Rémission complète 1, risque intermédiaire		Standard de prise en charge
Rémission complète 1, haut risque		Optionnel
Rémission complète 2		Optionnel
Leucémie myéloïde chronique		Expérimental
Leucémies aiguës lymphoïdes		
Rémission complète 1		Expérimental
Syndromes myélodysplasiques		
Leucémie aiguë myéloïde (20–30 % blastes)		Optionnel
Leucémie lymphoïde chronique		Optionnel
Lymphomes		
LBDGC, IPI 2-3		Optionnel
LBDGC, rémission complète 2		Standard
LNH du manteau, rémission complète 1 ou 2		Standard
Lymphome lymphoblastique		Optionnel
Lymphome de Burkitt		Optionnel
LNH folliculaire de haut risque		Optionnel
LNH folliculaire, rémission complète 2 ou plus		Standard
Lymphome T		Optionnel
Lymphome de Hodgkin, rémission complète 2		Standard
Lymphome de Hodgkin réfractaire		Optionnel
Myélome multiple		Standard
Amylose AL		Optionnel

Standard : attitude standard pour la majorité des patients éligibles (et s'il n'existe pas d'autre option thérapeutique définie).

Optionnel : à considérer dans certains cas.

Expérimental : dans le cadre de protocoles de recherche.

Les situations où l'autogreffe n'est pas recommandée n'ont pas été citées dans le tableau.

LNH : lymphome non hodgkinien ; LBDGC : LNH B diffus à grandes cellules ; IPI : index pronostique international.

Tableau 2.
Indications non oncohématologiques de l'autogreffe chez l'adulte.

Affections auto-immunes	Cytopénies auto-immunes	Optionnel
	Sclérodermie	Optionnel
	Polyarthrite rhumatoïde	Optionnel
	Lupus érythémateux disséminé	Optionnel
	Maladie de Crohn	Optionnel
	Sclérose en plaques	Optionnel
Tumeurs solides	Cancer du sein	Optionnel
	Tumeur à cellules germinales	Optionnel/standard
	Cancer de l'ovaire	Expérimental
	Médulloblastome	Expérimental
	Carcinome pulmonaire à petites cellules	Expérimental
	Sarcome des tissus mous	Expérimental

Standard : attitude standard pour la majorité des patients éligibles (et s'il n'existe pas d'autre option thérapeutique définie).

Optionnel : à considérer dans certains cas.

Expérimental : dans le cadre de protocoles de recherche.

Les situations où l'autogreffe n'est pas recommandée n'ont pas été citées dans le tableau.

traitement pré-greffe. Les recommandations de l'EBMT restent, pour les patients éligibles, une chimiothérapie de réduction tumorale (quatre à six cycles) contenant deux à quatre des substances actives dans le myélome (corticoïdes, inhibiteurs du protéasome, immunomodulateurs et alkylants), suivie de l'autogreffe, dont le conditionnement repose en règle sur le melphalan à haute

dose^[36,37]. La collecte des cellules souches est effectuée habituellement dans le sang périphérique, soit à l'équilibre après chimiothérapie d'induction, soit après mobilisation par le cyclophosphamide à haute dose, surtout dans le cas où il existe une charge tumorale persistante significative et des plasmocytes circulants. Néanmoins, l'efficacité des nouvelles substances, qui permettent d'obtenir des taux de réponse supérieurs à ceux obtenus précédemment par les chimiothérapies classiques suivies d'intensification, pose le problème de la place de l'autogreffe dans la stratégie thérapeutique^[38,39] : en première ou deuxième ligne ? Dans une étude de la Mayo Clinic^[40], l'analyse de 290 patients traités en première ligne par thalidomide-dexaméthasone ou lénalidomide-dexaméthasone ne montre pas de différence selon que les patients greffés ont bénéficié d'une autogreffe précoce (dans les 12 mois suivant le diagnostic) ou plus tardive. Toutefois, il ne s'agissait pas d'un essai randomisé et les modalités du choix entre greffe précoce ou tardive n'étaient pas précisées. De plus, l'association d'un immunomodulateur et de dexaméthasone n'est pas en France le traitement de référence en première ligne chez les sujets éligibles à une intensification. Dunavin et al.^[41] aboutissent aux mêmes conclusions dans une série de 167 patients ayant reçu des schémas d'induction comportant du bortézomib ou un immunomodulateur. Le retard (> 1 an) de l'autogreffe d'une partie des patients s'explique en réalité par le délai séparant le diagnostic et l'arrivée du patient au centre de référence réalisant l'autogreffe. Dans une étude randomisée, Palumbo et al.^[42] ont comparé l'association melphalan, prednisone, lénalidomide à l'intensification suivie d'autogreffe. Ils ont conclu à un bénéfice significatif du traitement intensif en termes de survie sans progression et de survie globale.

Un autre essai randomisé du même groupe a comparé chez 389 patients de moins de 65 ans, après une induction par quatre cycles lénalidomide-dexaméthasone, une consolidation par six cycles de l'association cyclophosphamide-lénalidomide-dexaméthasone à une intensification suivie d'autogreffe. Le taux de survie sans progression à trois ans est significativement meilleur dans le bras avec autogreffe (60 % contre 38 %), sans que cela ne se traduise encore, après un suivi médian de 31 mois, par une différence de survie globale^[43].

Dans l'essai IFM/DFCI 2009, le schéma thérapeutique comporte pour tous les patients trois cycles de lénalidomide-bortézomib-dexaméthasone (VRD), une mobilisation des cellules souches par cyclophosphamide, ainsi qu'un traitement d'entretien par lénalidomide. Dans le bras autogreffe, l'intensification prend place après les trois cycles VRD et la mobilisation ; les autres patients reçoivent cinq cycles supplémentaires de VRD et l'intensification n'est réalisée que lors de la rechute. L'essai HO95 multicentrique européen randomisé, après quatre cycles de chimiothérapie par bortézomib-cyclophosphamide-dexaméthasone, puis recueil des cellules souches mobilisées par cyclophosphamide et G-CSF, une autogreffe simple ou double contre quatre cycles de bortézomib, melphalan, prednisone. Une nouvelle randomisation est prévue pour évaluer l'intérêt d'une consolidation par deux cycles de VRD, un traitement d'entretien par lénalidomide étant proposé à tous les patients. Les résultats de ces deux essais comprenant en tout environ 2500 patients sont attendus pour 2015 et préciseront le positionnement de l'autogreffe dans le myélome.

Amylose AL

L'autogreffe n'est pas à ce jour le traitement de référence de l'amylose AL. En dépit de son indubitable efficacité, elle n'a pas permis d'obtenir d'amélioration de la survie par rapport au traitement conventionnel car elle est grevée par la mortalité liée à la procédure, notamment lorsqu'il existe une atteinte cardiaque. Cette mortalité pourrait cependant devenir inférieure à 10 % grâce à une sélection plus stricte des patients en fonction des facteurs de pronostic pré-greffe, évalué sur les critères suivants^[44] : atteinte de plus de deux organes, ECOG supérieur à 1, débit de filtration glomérulaire inférieur ou égal à 45 ml/min, atteinte cardiaque symptomatique, HS troponine T supérieure ou égale à 0,06 ng/ml, neuropathie autonome, atteinte gastro-intestinale symptomatique, ainsi que NT-proBNP supérieur à 500 pg/ml (pour les patients non dialysés). Le conditionnement à la greffe repose

habituellement sur le melphalan à la dose de 200 mg/m², de plus faibles doses semblant donner de moins bons résultats^[30]. Le traitement prégreffe est indispensable, car la survie globale est meilleure lorsque l'autogreffe est effectuée après un traitement préalable par bortézomib-dexaméthasone que lorsqu'elle est effectuée d'emblée^[45,46]. Un nouveau facteur pronostique cardiovasculaire a été identifié, l'ostéopontine, dont le rôle dans l'éligibilité à l'autogreffe reste néanmoins à prouver^[47]. Enfin, des critères prédictifs de la survie en fonction de la qualité de la réponse au traitement (essentiellement autogreffes) ont été définis par Palladini et al.^[48]. Néanmoins, il semble que dans une certaine limite les patients en réponse complète ou en très bonne réponse partielle aient des pronostics peu différents, ce qui ne rend pas indispensable un traitement complémentaire tant qu'il n'est pas observé de progression^[49].

Lymphomes et hémopathies lymphoïdes

À la suite des études PARMA et CORAL, une chimiothérapie de rattrapage suivie d'une autogreffe est considérée comme le standard de traitement des lymphomes B diffus à grandes cellules en rechute^[50,51]. La meilleure chimiothérapie de rattrapage n'est pas définie. L'étude CORAL^[50] n'a pas montré de différence entre le bras rituximab-ICE (ifosfamide, carboplatine, étoposide) et le bras rituximab-DHAP (dexaméthasone, cytarabine à haute dose, cisplatine). Néanmoins, l'analyse complémentaire par sous-groupes histologiques^[52] montre une meilleure réponse à la chimiothérapie de type R-DHAP dans les lymphomes de type centre germinatif, ce qui fait de ce schéma la chimiothérapie de référence. Il importe cependant de souligner que le phénotype a été défini à l'aide de l'algorithme immunohistochimique de Hans^[53] et non par l'étude du profil d'expression génique, déterminé chez seulement 39 patients de l'étude.

Le conditionnement de l'autogreffe est probablement un élément important de la procédure. Le schéma standard est le BEAM, mais des variantes prometteuses ont été proposées. Le schéma Z-BEAM (cf. supra) a donné des résultats intéressants en première ligne pour des lymphomes de mauvais pronostic (index pronostique international ≥ 2), avec un taux de survie globale à deux ans de 83 %^[54]. En revanche, une étude randomisée qui comparait, dans une population de patients en rechute, l'association du schéma BEAM à une radio-immunothérapie par tositumomab marqué à l'iode 131 ou au rituximab a montré une plus grande toxicité (mucites) dans le bras radio-immunothérapie, sans gain de survie à deux ans (61 % versus 65 % respectivement) ni diminution du taux de rechutes (45 % versus 48 % respectivement), mais aussi sans problème particulier de prise du greffon^[28]. Dans le protocole BeEAM, la carmustine est remplacée par la bendamustine. Bien qu'il ne s'agisse pas d'un essai randomisé et que l'effectif en soit réduit (43 patients dont seulement 28 lymphomes non hodgkiniens), le taux de survie sans progression de 72 % à trois ans est encourageant et justifie une étude randomisée^[55].

Bien que l'autogreffe soit considérée comme le standard de traitement des lymphomes de Hodgkin en rechute ou réfractaires^[56], on ne dispose pas de preuves convaincantes d'un bénéfice de survie globale. Une revue systématique de la littérature n'a recensé que trois essais randomisés^[57]. Deux d'entre eux (1993 et 2002) ont conclu à un bénéfice de survie sans progression, aucun n'a montré de bénéfice significatif de survie globale. Le facteur pronostique le plus important est le statut avant la greffe : les résultats sont très significativement meilleurs chez les patients en réponse complète métabolique. La question se pose de la place du brentuximab vedotin, anticorps anti-CD30 couplé à une toxine inhibitrice de la tubuline, la monométhyl-auristatine E. Avant l'autogreffe, le brentuximab vedotin permet d'obtenir des réponses chez des patients réfractaires à une chimiothérapie de rattrapage comportant des sels de platine, permettant de réaliser l'autogreffe dans une situation plus favorable^[58]. Après l'autogreffe chez des patients à haut risque (lymphome de Hodgkin réfractaire, rechute à moins de 12 mois, localisations extraganglionnaires), le brentuximab vedotin prolonge la durée de survie sans rechute et la survie globale^[59]. Enfin, dans les rechutes après autogreffe, le brentuximab vedotin permet

d'obtenir une réponse dans plus de deux tiers des cas, permettant de conduire les patients à l'allogreffe^[60]. Si la place de l'autogreffe est établie dans le lymphome de Hodgkin (cf. supra), l'avènement du brentuximab vedotin a sensiblement changé la stratégie, avec son positionnement à la fois en pré- et post-autogreffe.

Dans le lymphome du manteau, l'autogreffe constitue un standard de première ligne pour les patients jeunes, après une chimiothérapie comportant cytarabine et cisplatine (R-DHAP) en alternance ou non avec du rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone (R-CHOP)^[61,62]. Cette stratégie agressive de première ligne ne permet néanmoins pas d'obtenir une guérison définitive. Les résultats de l'étude LYMA^[63] ont démontré le bénéfice en termes de survie sans progression d'un traitement d'entretien par rituximab après l'intensification.

L'autogreffe a pu être proposée aussi dans les lymphomes folliculaires, qui demeurent incurables avec les approches de chimiothérapie classique. En première ligne thérapeutique, trois méta-analyses^[64-66] sont parvenues aux mêmes conclusions, à savoir l'absence d'amélioration de la survie globale, mais une amélioration de la survie sans événement avec l'autogreffe, sans différence dans le risque de mortalité ou de morbidité à court ou long terme. Ces résultats sont néanmoins en partie contredits par une étude de 2014 non randomisée comparant les résultats d'une autogreffe en première ou deuxième ligne à ceux d'une intensification plus tardive. À sept ans, les taux de survie globale et de survie sans progression sont pour l'intensification précoce respectivement de 76 % et 60 %. Mesurée à partir du diagnostic, la survie globale se révèle significativement supérieure à celle de l'intensification plus tardive ($p=0,03$)^[67]. De plus, cette publication démontre l'atteinte d'un plateau de survie sans progression après 9,3 ans pour les patients greffés en première ligne et 6,4 ans pour ceux greffés en deuxième ligne, suggérant un effet curatif de la procédure pour une partie des patients. Ces données corroborent les conclusions de l'étude de Metzner et al., montrant l'absence de rechute au-delà de six ans après l'autogreffe^[68]. L'impact du conditionnement par irradiation corporelle totale par rapport à une chimiothérapie de type BEAM a été évalué dans une étude rétrospective de l'EBMT, qui a conclu à un certain avantage en termes de survie sans rechute en faveur de l'irradiation corporelle totale, sans différence de survie globale^[69]. Bien qu'elle porte sur un effectif restreint de 24 patients, traités en première ligne, et ne soit pas randomisée, l'étude de Derenzini et al. est intéressante du fait d'un suivi médian qui atteint dix ans^[70]. La chimiothérapie initiale était une approche séquentielle utilisant R-CHOP en alternance avec rituximab-fludarabine-mitoxantrone (R-FM), dans le but d'améliorer la réponse prégreffe, et le conditionnement était le schéma classique BEAM. Le taux de survie sans progression à dix ans atteint 70 %, mais il n'est pas possible de déterminer si ces bons résultats sont dus à la chimiothérapie séquentielle R-CHOP/R-FM ou à l'intensification.

Qu'en est-il de l'autogreffe en situation de rechute ? L'étude du GELA montre une amélioration importante de la survie après autogreffe comparée à une chimiothérapie classique^[71]. Comme pour les autres pathologies lymphoïdes, le degré de réponse évalué par la tomographie à émission de positons (TEP)-scan avant autogreffe a une forte valeur prédictive de la survie sans progression^[72]. Après l'autogreffe, un traitement d'entretien par rituximab prolonge la survie sans progression mais non la survie globale^[73]. L'approche de type « greffe en tandem », où la greffe autologue est suivie d'une greffe allogénique à conditionnement d'intensité réduite, paraît plus intéressante encore. Elle permet d'obtenir un taux de survie globale et de survie sans progression de 96 % à trois ans^[74]. Pour les lymphomes folliculaires transformés, une approche thérapeutique analogue à celle des rechutes des lymphomes de haut grade semble intuitivement pertinente. Deux études plaident en faveur de cette attitude^[75,76], avec peut-être de moins bons résultats pour les patients traités par rituximab antérieurement, ce qui est évidemment maintenant la situation la plus fréquente. Néanmoins, l'arrivée des nouvelles substances actives dans les lymphomes folliculaires, notamment les inhibiteurs de BTK, de la PI3 kinase et de Bcl-2, laisse prévoir des modifications drastiques de la prise en charge de ces pathologies, avec potentiellement des stratégies thérapeutiques leur associant une intensification.

Leucémies

Leucémies aiguës myéloïdes

L'autogreffe de CSH est possible dans les leucémies aiguës myéloïdes, elle est même considérée par l'EBMT comme une référence dans les LAM de risque intermédiaire^[35]. La justification de cette approche est le fort taux de rechute après chimiothérapie, notamment chez les sujets âgés (>60 ans) pour qui l'allogreffe, techniquement possible, comporte néanmoins un risque majeur. Un essai déjà ancien du groupe EORTC-GIMEMA a inclus 941 patients, d'âge compris entre 10 et 45 ans (en pratique, supérieur à 15 ans)^[77]. En fonction de la disponibilité ou non d'un donneur intrafamilial, les patients bénéficiaient d'une allogreffe ou étaient traités (selon le centre) soit par chimiothérapie intensive (104 patients), soit par autogreffe de cellules souches obtenues par prélèvement médullaire (95 patients). Le taux de survie sans maladie projeté à quatre ans a été de 48 % dans le bras autogreffe contre 30 % dans le bras chimiothérapie intensive, sans que cela ne se traduise par un gain de survie car les patients rechutant dans le bras chimiothérapie intensive avaient une meilleure réponse à la deuxième ligne de traitement, incluant l'autogreffe, que les patients traités en première intention par autogreffe. L'essai du groupe EORTC-GIMEMA AML-13 s'est attaché à la population des patients d'âge compris entre 61 et 70 ans, avec un indice OMS 0-1^[78]. Cet essai a montré la relative faisabilité de l'autogreffe (cellules souches périphériques) avec, sur les 61 patients éligibles, 35 patients effectivement greffés. Les durées médianes de survie sans maladie et de survie globale étaient de 1,1 et 1,6 ans, et les taux à trois ans de survie sans maladie et de survie globale de 28 % et 39 %, respectivement, sans différence par rapport aux autres patients inclus dans cet essai pour lesquels les centres participants avaient fait le choix d'une chimiothérapie de consolidation conventionnelle. L'essai randomisé MRC AML 10 a porté sur des patients de moins de 56 ans (sans limite d'âge inférieure) en rémission mais sans donneur allogénique^[79]. Si on limite l'analyse aux patients de 35 ans ou plus (89 patients dans le bras autogreffe versus 80 dans le bras chimiothérapie intensive), on constate 31 rechutes dans le bras autogreffe contre 50 dans le bras chimiothérapie intensive. L'analyse des survies, notamment chez les patients de 35 ans ou plus, est statistiquement en faveur de l'autogreffe, les patients non autogreffés n'étant pas, contrairement à l'étude citée précédemment^[77], remis plus facilement en rémission en cas de rechute. Une étude de registre publiée en 2013 à partir des données du *Center for International Blood and Marrow Transplantation Research* a comparé les résultats de l'allogreffe (moelle versus sang périphérique) à ceux de l'autogreffe avec cellules souches du sang périphérique^[80]. Le taux de survie sans maladie à cinq ans était similaire (61 % et 54 % pour l'allogreffe versus 47 %), de même que le taux de survie globale (64 % et 59 % versus 54 %).

L'impact éventuel du profil cytogénétique et moléculaire est encore mal connu. Cette question a été abordée dans une étude rétrospective comparant les résultats de l'autogreffe à ceux d'une chimiothérapie intensive dans des LAM à caryotype normal avec FLT3ITD, à risque élevé de rechute précoce^[81]. Le taux de survie sans maladie est plus favorable après autogreffe (40 % versus 10 % à 4 ans, $p=0,05$) sans que cela ne se traduise par un avantage de survie globale (40 % versus 20 % à 4 ans, $p=0,27$), mais le faible nombre de patients (11 pour l'autogreffe et dix pour la chimiothérapie) rend toute conclusion hasardeuse.

Des essais cliniques d'association autogreffe/immunothérapie ont été menés. Des résultats encourageants ont été rapportés avec une méthode d'immunothérapie cellulaire faisant appel à l'administration, avant l'autogreffe, de cellules leucémiques autologues associées à des cellules sécrétant du GM-CSF et des lymphocytes sensibilisés^[82]. Chez les patients ayant développé une réponse immunitaire antileucémique, le taux de survie sans rechute rapporté est de 100 % à trois ans, mais il s'agit d'un essai non randomisé, avec 28 patients seulement ayant bénéficié du traitement pré-greffe.

Dans les LAM, différents types de conditionnements ont été testés, sans démonstration d'une supériorité de l'un ou l'autre des schémas. L'une des options de conditionnement les plus

prometteuses consiste dans l'utilisation du busulfan par voie intraveineuse pour pallier la variabilité des taux circulants lors d'une prise per os^[83].

Un des problèmes liés à l'autogreffe dans les LAM est la contamination potentielle du greffon. Les tentatives de purge du greffon se sont révélées toxiques in vitro et rendent sa prise délicate, même si des techniques de sélection positive des cellules CD34⁺ et/ou CD133⁺ permettent une décontamination du greffon d'un facteur 10⁻³ à 10⁻⁴ tout en préservant sa viabilité^[84]. La contamination potentielle du greffon par les cellules souches leucémiques persiste, car il n'est pas possible de les distinguer aisément des cellules souches normales. L'utilisation de nouvelles substances ciblant des voies métaboliques sensibles dans les blastes leucémiques est néanmoins à l'étude.

Pour conclure sur les LAM, les résultats d'une méta-analyse récente^[85] montrent une supériorité de l'autogreffe sur la chimiothérapie classique en termes de rechute, sans impact sur la survie globale, notamment à cause de la mortalité liée à la procédure. Les résultats restent inférieurs à ceux de l'allogreffe, mais celle-ci reste inaccessible pour un nombre non négligeable de patients, faute de donneur compatible. Le conditionnement préalable à l'autogreffe doit être encore optimisé afin d'en diminuer encore la mortalité, déjà très faible grâce à l'utilisation de cellules mobilisées du sang périphérique, qui permet une reconstitution hématologique plus rapide que les cellules médullaires. Le conditionnement le plus adéquat doit certainement contenir du busulfan intraveineux^[83]. Enfin, les rechutes très tardives (16 % à 10 ans)^[86] observées chez les patients autogreffés montrent la persistance d'un contingent leucémique résiduel de faible importance après l'autogreffe. Cela suggère l'utilisation d'un traitement d'entretien, par chimiothérapie ou immunothérapie, une réponse immunitaire antileucémique ayant le temps de se développer dans ces délais. La diminution de la mortalité liée à la transplantation et le meilleur contrôle des rechutes, notamment tardives (purge du greffon, chimiothérapie d'entretien, immunothérapie post-greffe), devraient permettre un renouveau de l'autogreffe dans les LAM, qui reste néanmoins une procédure standard pour les LAM de risque intermédiaire en RC1 et une option envisageable dans les autres cas, si une allogreffe ne semble pas possible ou raisonnable^[35].

Leucémies aiguës lymphoïdes

Selon les recommandations de l'EBMT, l'autogreffe n'a pas d'indication reconnue dans les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL), en dehors d'éventuels protocoles expérimentaux. Une méta-analyse de 2013, correspondant à un total de 13 études et de 2962 patients, montre que l'autogreffe n'apporte pas de bénéfice dans les LAL Ph1- comparée à une chimiothérapie intensive, et pourrait même aggraver le pronostic^[87]. Néanmoins, les données récentes sur la maladie résiduelle (*minimal residual disease* [MRD]) tendent à démontrer que les patients MRD-négatifs à la fin de la chimiothérapie d'induction ont un pronostic favorable qui n'est pas sensiblement amélioré par la greffe allogénique. Or, aucune étude de transplantation autologue n'a été effectuée en ciblant cette population de patients à « faible risque » MRD-négatifs. Les LAL Ph1+ constituent un cas particulier: leur pronostic, considéré comme très péjoratif, a été bouleversé par l'utilisation des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK). Une étude récente portant sur de petits effectifs (58 patients) a comparé la greffe autologue à la greffe allogénique après un traitement d'induction associant l'imatinib et une chimiothérapie^[88], sans montrer de différence entre les deux groupes. Si le nombre de patients est trop faible pour pouvoir tirer des conclusions fermes, il est intéressant dans cette étude de noter que sur 13 greffons analysés, neuf étaient négatifs en *polymerase chain reaction* pour le transcrit bcr-abl, et les quatre autres faiblement positifs, suggérant une efficacité certaine de l'association des ITK à la chimiothérapie « classique » pour la purge in vivo du greffon.

Autres indications

Tumeurs solides

Les indications d'autogreffe de CSH hors hémopathies malignes représentent une fraction très faible de l'ensemble des autogreffes.

Elles relèvent dans la quasi-totalité des cas du domaine de la recherche clinique ou d'indications de prise en charge au cas par cas dans des situations particulières.

Dans le cancer du sein, une méta-analyse regroupant 14 études et 5747 patients a montré un effet positif de l'autogreffe en première ligne sur la survie sans maladie mais pas sur la survie globale, sauf dans une sous-population de patientes à haut risque^[89]. Il importe cependant de souligner que les auteurs n'ont pas eu accès aux données individuelles des patientes, ce qui limite la portée de leurs conclusions. Une étude portant sur 1183 patientes à haut risque (plus de trois ganglions envahis) a fait état d'une médiane de survie sans maladie de 101 mois et de survie globale de 134 mois, suggérant, malgré l'absence de groupe témoin, un bénéfice de l'autogreffe en situation adjuvante par rapport à la chimiothérapie conventionnelle^[90]. Bien entendu, les nouvelles molécules utilisées dans cette pathologie peuvent venir remettre en cause l'intérêt de ces analyses rétrospectives.

Dans les tumeurs à cellules germinales, l'autogreffe semble intéressante chez les patients réfractaires ou en rechute, avec un taux de survie globale à deux ans de 71 %, dans une série limitée de 17 patients^[91].

Dans les tumeurs de l'ovaire, l'autogreffe avec conditionnement par melphalan n'apporte pas de bénéfice^[92]. Néanmoins ces résultats pourraient être modifiés avec l'utilisation d'autres conditionnements, notamment par le topotécan^[93].

Dans les tumeurs embryonnaires du système nerveux central de l'adulte, les données proviennent souvent d'observations isolées. Une comparaison historique a néanmoins montré après rechute une survie globale médiane de 3,5 ans chez dix patients transplantés versus deux ans chez 13 patients traités par chimiothérapie conventionnelle^[94].

Dans le cancer du poumon à petites cellules, les méta-analyses ne parviennent pas à déterminer la place de l'autogreffe, faute de séries suffisantes^[95].

Enfin, bien que de nombreuses études aient été publiées dans les sarcomes des tissus mous, non-rhabdomyosarcomes^[96] ou rhabdomyosarcomes^[97], le nombre d'essais randomisés est faible, et il n'est pas possible de statuer sur l'utilité de l'autogreffe.

Affections auto-immunes

Dans ces pathologies, la base du raisonnement est que la chimiothérapie de conditionnement détruit les lymphocytes autoréactifs, avec une « remise à zéro » du système immunitaire. Un essai de phase II de 2015 dans la sclérose en plaques a comparé une greffe autologue conditionnée par carmustine, cytarabine, étoposide et melphalan plus immunoglobulines antithymocytes contre un traitement par mitoxantrone^[33] en se basant sur le nombre de lésions cérébrales détectables en T2 durant les quatre années suivant le traitement. Malgré un effectif faible, l'autogreffe a réduit de 79 % le nombre de nouvelles lésions par rapport à la mitoxantrone. Un autre type de conditionnement lymphoablatif à faible intensité (cyclophosphamide 120 mg/kg) semble aussi intéressant, mais l'étude n'a porté que sur sept patients^[98]. Parmi les pathologies digestives, la maladie de Crohn peut bénéficier de l'autogreffe dans certains cas, avec notamment une réponse rapide de la maladie à la chimiothérapie de conditionnement^[99]. Les résultats de l'autogreffe de CSH sont intéressants dans le lupus érythémateux disséminé réfractaire aux thérapeutiques classiques, avec un taux de contrôle de la maladie à cinq ans de l'ordre de 50 % dans la majorité des études publiées (représentant environ 200 patients)^[100]. Dans cette pathologie, l'autogreffe se heurte à des problèmes infectieux importants liés au terrain et se voit concurrencée par la greffe de cellules mésenchymateuses stromales, aux propriétés immunosuppressives. Dans la polyarthrite rhumatoïde, si un contrôle rapide de la maladie peut être obtenu, la disponibilité des nouvelles biothérapies met l'autogreffe de CSH au second plan^[101]. Dans la sclérodémie, une étude récente a randomisé 156 patients entre autogreffe conditionnée par cyclophosphamide 200 mg/kg plus immunoglobulines antithymocytes contre un traitement par perfusion mensuelle de 750 mg/m² de cyclophosphamide pendant 12 mois^[102]. Cette étude a montré une augmentation significative de la mortalité dans le groupe autogreffe au cours de la première année, malgré l'exclusion des

Tableau 3.

Programme de vaccination post-autogreffe.

Vaccin	Délai par rapport à la greffe
Antigrippal	3-6 mois
Pneumocoque	3-6 mois
<i>Haemophilus influenzae</i>	6-12 mois
Tétanos, diphtérie, coqueluche	6-12 mois
Méningocoque	6-12 mois
Poliomyélite (vaccin tué)	6-12 mois
Hépatite B	6-12 mois

patients à comorbidités importantes (10 % de décès versus 0 %), mais un modeste gain à long terme, ne permettant pas de positionner l'autogreffe comme un standard de traitement dans la sclérodémie. Au cours des cytopénies auto-immunes réfractaires, une réponse à l'autogreffe est observée dans 40 % des cas, mais ne persiste à long terme que chez un quart des patients^[103]. En conclusion, l'autogreffe dans les pathologies auto-immunes a permis d'obtenir certains succès, mais au prix d'une morbidité non négligeable pour des résultats souvent transitoires. Aussi cette option thérapeutique n'est pas recommandable en dehors d'essais cliniques, d'autant qu'elle est aussi concurrencée par les nouvelles biothérapies ainsi que par les techniques innovantes d'immunomodulation telles que la greffe de cellules mésenchymateuses stromales.

“ Point fort

Les deux indications principales de l'autogreffe sont le myélome du sujet jeune et les lymphomes de haut grade en rechute. Néanmoins, de nombreuses autres indications sont à discuter au cas par cas, notamment dans les pathologies auto-immunes, ainsi que dans les tumeurs solides.

■ Suivi des patients autogreffés

Le suivi dans les suites immédiates de l'autogreffe est essentiellement centré sur la reconstitution hématologique et les problèmes infectieux. Une réévaluation tumorale est généralement effectuée 2 à 3 mois après l'autogreffe. Par la suite, le suivi dépend de la pathologie, avec néanmoins au minimum une visite annuelle dans le centre de référence de l'autogreffe. Le patient doit bénéficier en post-greffe d'un programme de vaccination car les taux d'anticorps spécifiques diminuent fortement après la greffe. Il est donc recommandé d'effectuer les vaccinations en laissant un délai post-greffe d'au moins trois mois^[104]. Le **Tableau 3** récapitule les vaccinations recommandées et leur délai par rapport à la greffe (d'après^[24]). Il faut noter que les vaccins vivants ne sont administrés que s'ils sont vraiment indispensables et après un délai d'au moins deux ans par rapport à la greffe. Sur le long terme, les patients autogreffés présentent un risque accru de leucémies secondaires, de pathologies cardiovasculaires, de troubles endocriniens et métaboliques, ainsi que d'infections, justifiant un suivi spécialisé à minima annuel, même au-delà de cinq ans.

■ Complications de l'autogreffe

En plus de la toxicité directe des différentes chimiothérapies de conditionnement, les complications de l'autogreffe sont essentiellement dues aux infections, favorisées par la neutropénie profonde induite par le conditionnement et qui dure en

général un peu plus d'une semaine. Les germes responsables sont souvent endogènes, tels qu'*Escherichia coli*. On peut également observer une diarrhée liée à *Clostridium difficile*, des infections fongiques, notamment à *Candida albicans*, mais aussi des infections liées à la présence d'une voie centrale, favorisées notamment par une alimentation parentérale. Une prophylaxie antifongique est habituellement administrée, moins souvent une prophylaxie antimicrobienne, dont l'efficacité n'est pas clairement établie [105]. Les complications liées à la chimiothérapie et à la période d'aplasie incluent alopécie, mucite, nausées et vomissements. Beaucoup plus rare que dans l'allogreffe, la maladie veino-occlusive du foie est une complication grave, qui se manifeste par une hépatomégalie douloureuse, un ictère et une rétention hydrique. Des complications pulmonaires surviennent chez plus d'un quart des patients, pour moitié d'origine infectieuse. Les complications non infectieuses incluent l'œdème aigu du poumon (5 %), le syndrome de pneumonie idiopathique (1 %), les hémorragies diffuses alvéolaires (2 %), le syndrome de détresse respiratoire péri-greffe (notamment la capacité de diffusion du monoxyde de carbone) sont des facteurs pronostiques du développement de ces complications [106]. L'ensemble de la procédure d'autogreffe est grevée d'un taux de mortalité précoce (dans les 100 premiers jours), de l'ordre d'un peu moins de 3 %.

La toxicité à moyen et long termes ne doit pas être négligée [107, 108]. En premier lieu, la stérilité, aussi bien chez l'homme que chez la femme, est d'observation très fréquente, notamment du fait de la chimiothérapie de conditionnement. Dans ce contexte, des grossesses obtenues sans assistance médicale sont observées dans moins de 15 % des cas, amenant à proposer une congélation de sperme chez l'homme et un éventuel prélèvement d'ovocytes chez la femme. Chez les femmes récupérant un cycle menstruel, la ménopause précoce est quand même une complication fréquente. Un délai d'au moins deux ans après l'autogreffe est requis chez la femme avant une grossesse, délai correspondant à la période de risque maximal de rechute. Selon l'âge de la patiente, ce délai peut être repoussé à cinq ans par sécurité. Lorsqu'il y a grossesse, celle-ci se déroule sans complication. Même en excluant le risque de rechute, l'espérance de vie des patients ayant bénéficié d'une greffe autologue est inférieure à celle de la population générale, en raison de toxicités tardives, notamment cardiovasculaires.

Ces différentes complications ont amené à proposer un suivi particulier des patients ayant bénéficié d'une autogreffe, résumé dans le **Tableau 4** (d'après [108]).

Les complications cardiovasculaires de l'autogreffe apparaissent le plus souvent plusieurs années après la procédure : insuffisance cardiaque, anomalies valvulaires ou de la conduction, liées à la cardiomyopathie due à la chimiothérapie conventionnelle et au conditionnement à la greffe. En plus des facteurs de risque classiques, les facteurs prédictifs de ce type de complications sont l'état antérieur du cœur, les doses cumulées d'anthracyclines, l'utilisation de la radiothérapie, la surcharge martiale liée aux transfusions répétées. En dehors de la maladie veino-occlusive ou d'éventuels épisodes d'infection et/ou réactivation virale, une atteinte hépatique peut être liée à l'hémochromatose post-transfusionnelle. Les complications rénales sont liées à l'usage pré-transplantation d'agents néphrotoxiques, notamment de sels de platine, et de la radiothérapie, avec des atteintes glomérulaires, ainsi qu'à l'utilisation d'antibiotiques et antifongiques néphrotoxiques à l'origine d'une atteinte plutôt tubulaire.

L'une des complications les plus graves de l'autogreffe est le développement de cancers secondaires. Les cancers radio-induits (sarcomes, thyroïde, sein) sont peu augmentés par l'autogreffe, en raison de la faible utilisation de la radiothérapie, mais plutôt liés aux traitements antérieurs. Le risque essentiel dans l'autogreffe est celui de myélodysplasie et/ou de leucémie secondaire, dont le taux de survenue est de l'ordre de 5 %, avec un délai médian d'un peu plus de deux ans. Ce risque dépend bien entendu aussi de l'usage d'alkylants et de la radiothérapie avant la greffe. Le pronostic de ces leucémies secondaires est lié au caryotype, malheureusement bien souvent défavorable dans ce contexte.

Tableau 4.

Recommandations pour le suivi de greffe.

Immunité anti-infectieuse	Prophylaxie anti- <i>Pneumocystis carinii</i> pendant 6 mois Vaccinations
Examen ophtalmologique	Annuel
État buccodentaire	Évaluation annuelle
Pneumologie	Arrêt du tabagisme Évaluation clinique annuelle
Cardiovasculaire	Examen clinique annuel Hygiène cardiovasculaire Activité physique adaptée Surveillance annuelle de la tension artérielle
Fonction hépatique	Transaminases/bilirubine/ferritine tous les 6 mois la première année
Fonction rénale	Urée/créatinine/protéinurie annuelles
Squelette	Densitométrie osseuse si facteur de risque, suivi en fonction de cette première évaluation
Neurologie	Examen clinique annuel + fonctions cognitives
Endocrine	Bilan thyroïdien annuel
État muqueux et cutané	Examen dermatologique annuel Conseils vis-à-vis de l'exposition solaire Examen gynécologique annuel
Psychosocial	Évaluation annuelle de l'insertion professionnelle/sociale et des fonctions sexuelles
Cancers secondaires	Dépistage clinique orienté

“ Point fort

La surveillance de la procédure d'autogreffe ne se limite pas à la phase d'hospitalisation et d'aplasie mais s'étend à la période post-greffe, avec notamment la possibilité de complications infectieuses (moyen terme), mais aussi cardiovasculaires et hématologiques (moyen et long termes) justifiant un suivi spécialisé prolongé.

■ Perspectives et conclusions

L'autogreffe de cellules souches est devenue une technique de pratique courante, notamment du fait de la relative facilité du prélèvement par cytophérèse grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques classiques (G-CSF) et aux nouveaux agents de mobilisation, tel le plérixafor. L'autogreffe nécessite néanmoins un plateau technique important et spécialisé pour être réalisée dans les meilleures conditions de sécurité. Un des éléments-clés de la réussite de la procédure est la qualité du greffon, qui dépend bien sûr du patient, mais aussi de l'expérience de l'unité d'hémaphérèse, ainsi que des différentes étapes du transport/congélation/décongélation du greffon. À l'origine simple support d'une chimiothérapie à haute dose, l'autogreffe devrait évoluer vers des techniques plus sophistiquées d'immunomodulation afin d'améliorer son potentiel antitumoral par rapport à l'allogreffe, sans en avoir la toxicité parfois prohibitive.

Déclaration d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts en relation avec cet article.



Références

- [1] Schmitz N, Linch DC, Dreger P, Goldstone AH, Boogaerts MA, Ferrant A, et al. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients. *Lancet* 1996;**347**: 353–7.
- [2] Quesenberry PJ, Goldberg L, Aliotta J, Dooner M. Marrow hematopoietic stem cells revisited: they exist in a continuum and are not defined by standard purification approaches; then there are the microvesicles. *Front Oncol* 2014;**4**:56.
- [3] Weaver CH, Hazelton B, Birch R, Palmer P, Allen C, Schwartzberg L, et al. An analysis of engraftment kinetics as a function of the CD34 content of peripheral blood progenitor cell collections in 692 patients after the administration of myeloablative chemotherapy. *Blood* 1995;**86**:3961–9.
- [4] Lefrere F, Mauge L, Rea D, Ribeil JA, Dal CL, Brignier AC, et al. A specific time course for mobilization of peripheral blood CD34+ cells after plerixafor injection in very poor mobilizer patients: impact on the timing of the apheresis procedure. *Transfusion* 2013;**53**: 564–9.
- [5] DiPersio JF, Stadtmauer EA, Nademanee A, Micallef IN, Stiff PJ, Kaufman JL, et al. Plerixafor and G-CSF versus placebo and G-CSF to mobilize hematopoietic stem cells for autologous stem cell transplantation in patients with multiple myeloma. *Blood* 2009;**113**:5720–6.
- [6] Taubert I, Saffrich R, Zepeda-Moreno A, Hellwig I, Eckstein V, Bruckner T, et al. Characterization of hematopoietic stem cell subsets from patients with multiple myeloma after mobilization with plerixafor. *Cytotherapy* 2011;**13**:459–66.
- [7] Peled A, Abraham M, Avivi I, Rowe JM, Beider K, Wald H, et al. The high-affinity CXCR4 antagonist BKT140 is safe and induces a robust mobilization of human CD34+ cells in patients with multiple myeloma. *Clin Cancer Res* 2014;**20**:469–79.
- [8] Hopman RK, DiPersio JF. Advances in stem cell mobilization. *Blood Rev* 2014;**28**:31–40.
- [9] Lapierre V, Rossi JF, Heshmati F, Azar N, Vekhof A, Makowski C, et al. Ancestim (r-metHuSCF) plus filgrastim and/or chemotherapy for mobilization of blood progenitors in 513 poorly mobilizing cancer patients: the French compassionate experience. *Bone Marrow Transplant* 2011;**46**:936–42.
- [10] Juarez JG, Harun N, Thien M, Welschinger R, Baraz R, Pena AD, et al. Sphingosine-1-phosphate facilitates trafficking of hematopoietic stem cells and their mobilization by CXCR4 antagonists in mice. *Blood* 2012;**119**:707–16.
- [11] Bonig H, Wundes A, Chang KH, Lucas S, Papayannopoulou T. Increased numbers of circulating hematopoietic stem/progenitor cells are chronically maintained in patients treated with the CD49d blocking antibody natalizumab. *Blood* 2008;**111**:3439–41.
- [12] Ballen KK, Shpall EJ, Avigan D, Yeap BY, Fisher DC, McDermott K, et al. Phase I trial of parathyroid hormone to facilitate stem cell mobilization. *Biol Blood Marrow Transplant* 2007;**13**:838–43.
- [13] Forristal CE, Winkler IG, Nowlan B, Barbier V, Walkinshaw G, Levesque JP. Pharmacologic stabilization of HIF-1 α increases hematopoietic stem cell quiescence in vivo and accelerates blood recovery after severe irradiation. *Blood* 2013;**121**:759–69.
- [14] Niesvizky R, Mark TM, Ward M, Jayabalan DS, Pearse RN, Manco M, et al. Overcoming the response plateau in multiple myeloma: a novel bortezomib-based strategy for secondary induction and high-yield CD34+ stem cell mobilization. *Clin Cancer Res* 2013;**19**:1534–46.
- [15] Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *J Blood Med* 2015;**6**:55–67.
- [16] Walasek MA, van OR, de HG. Hematopoietic stem cell expansion: challenges and opportunities. *Ann N Y Acad Sci* 2012;**1266**:138–50.
- [17] Al-Anazi KA. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for multiple myeloma without cryopreservation. *Bone Marrow Res* 2012;**2012**:917361.
- [18] Berz D, McCormack EM, Winer ES, Colvin GA, Quesenberry PJ. Cryopreservation of hematopoietic stem cells. *Am J Hematol* 2007;**82**:463–72.
- [19] Remes K, Itala M, Kauppila M, Pelliniemi TT, Rajamaki A. Autologous blood cell transplantation in multiple myeloma: impact of CD34+ cell selection with long follow-up. *J Hematother Stem Cell Res* 2003;**12**:63–70.
- [20] Yahng SA, Yoon JH, Shin SH, Lee SE, Cho BS, Eom KS, et al. Influence of ex vivo purging with CliniMACS CD34(+) selection on outcome after autologous stem cell transplantation in non-Hodgkin lymphoma. *Br J Haematol* 2014;**164**:555–64.
- [21] Messina C, Candoni A, Carrabba MG, Tresoldi C, Sala E, Tassara M, et al. Wilms' Tumor Gene 1 transcript levels in leukapheresis of peripheral blood hematopoietic cells predict relapse risk in patients autografted for acute myeloid leukemia. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;**20**:1586–91.
- [22] Schouten HC, Qian W, Kvaloy S, Porcellini A, Hagberg H, Johnsen HE, et al. High-dose therapy improves progression-free survival and survival in relapsed follicular non-Hodgkin's lymphoma: results from the randomized European CUP trial. *J Clin Oncol* 2003;**21**:3918–27.
- [23] Crippa F, Holmberg L, Carter RA, Hooper H, Marr KA, Bensinger W, et al. Infectious complications after autologous CD34-selected peripheral blood stem cell transplantation. *Biol Blood Marrow Transplant* 2002;**8**:281–9.
- [24] Hamadani M. Autologous hematopoietic cell transplantation: an update for clinicians. *Ann Med* 2014;**46**:619–32.
- [25] Blanes M, Lahuerta JJ, Gonzalez JD, Ribas P, Solano C, Alegre A, et al. Intravenous busulfan and melphalan as a conditioning regimen for autologous stem cell transplantation in patients with newly diagnosed multiple myeloma: a matched comparison to a melphalan-only approach. *Biol Blood Marrow Transplant* 2013;**19**:69–74.
- [26] Roussel M, Moreau P, Huynh A, Mary JY, Danho C, Caillot D, et al. Bortezomib and high-dose melphalan as conditioning regimen before autologous stem cell transplantation in patients with de novo multiple myeloma: a phase 2 study of the Intergroupe Francophone du Myelome (IFM). *Blood* 2010;**115**:32–7.
- [27] Berger MD, Branger G, Klaeser B, Taleghani BM, Novak U, Banz Y, et al. Zevalin and BEAM (Z-BEAM) versus rituximab and BEAM (R-BEAM) conditioning chemotherapy prior to autologous stem cell transplantation in patients with mantle cell lymphoma. *Hematol Oncol* 2015 [Epub ahead of print].
- [28] Vose JM, Carter S, Burns LJ, Ayala E, Press OW, Moskowitz CH, et al. Phase III randomized study of rituximab/carmustine, etoposide, cytarabine, and melphalan (BEAM) compared with iodine-131 tositumomab/BEAM with autologous hematopoietic cell transplantation for relapsed diffuse large B-cell lymphoma: results from the BMT CTN 0401 trial. *J Clin Oncol* 2013;**31**:1662–8.
- [29] Oh DH, Chua N, Street L, Stewart DA. Treatment of secondary central nervous system lymphoma patients with high-dose Busulfan/Thiotepa-based conditioning and autologous stem cell transplantation. *Leuk Lymphoma* 2015:1–6 [Epub ahead of print].
- [30] Hayashi T, Ikeda H, Igarashi T, Maruyama Y, Aoki Y, Nojima M, et al. Autologous stem cell transplantation for AL amyloidosis: adjustment of melphalan dose by factors including BNP. *Int J Hematol* 2014;**100**:554–8.
- [31] Hong M, Miao KR, Zhang R, Lu H, Liu P, Xu W, et al. High-dose idarubicin plus busulfan as conditioning regimen to autologous stem cell transplantation: promising post-remission therapy for acute myeloid leukemia in first complete remission? *Med Oncol* 2014;**31**:980.
- [32] Shevchenko JL, Kuznetsov AN, Ionova TI, Melnichenko VY, Fedorenko DA, Kurbatova KA, et al. Long-term outcomes of autologous hematopoietic stem cell transplantation with reduced-intensity conditioning in multiple sclerosis: physician's and patient's perspectives. *Ann Hematol* 2015;**94**:1149–57.
- [33] Mancardi GL, Sormani MP, Gualandi F, Saiz A, Carreras E, Merelli E, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation in multiple sclerosis: a phase II trial. *Neurology* 2015;**84**:981–8.
- [34] D'Addio F, Valderrama VA, Ben NM, Franek E, Zhu D, Li L, et al. Autologous nonmyeloablative hematopoietic stem cell transplantation in new-onset type 1 diabetes: a multicenter analysis. *Diabetes* 2014;**63**:3041–6.
- [35] Gratwohl A, Baldomero H, Sureda A. In: Apperley J, Carreras E, Gluckman E, Masszi T, editors. *Haematopoietic stem cell transplantation. The EBMT Handbook*. Genoa: Forum Service Editore; 2012. p. 302–15.
- [36] Engelhardt M, Terpos E, Kleber M, Gay F, Wasch R, Morgan G, et al. European Myeloma Network recommendations on the evaluation and treatment of newly diagnosed patients with multiple myeloma. *Haematologica* 2014;**99**:232–42.
- [37] Moreau P, Attal M. All transplantation-eligible patients with myeloma should receive ASCT in first response. In: Anderson KC, Bauer KA, Tallman MS, Crowther MA, editors. *Hematology 2014*. Washington: Blood; 2014. p. 250–4.

- [38] Gertz MA, Dingli D. How we manage autologous stem cell transplantation for patients with multiple myeloma. *Blood* 2014;**124**:882–90.
- [39] Richardson PG, Laubach JP, Munshi NC, Anderson KC. Early or delayed transplantation for multiple myeloma in the era of novel therapy: does one size fit all? In: Anderson KC, Bauer KA, Tallman MS, Crowther MA, editors. *Hematology 2014*. Washington: Blood; 2014. p. 255–61.
- [40] Kumar SK, Lacy MQ, Dispenzieri A, Buadi FK, Hayman SR, Dingli D, et al. Early versus delayed autologous transplantation after immunomodulatory agents-based induction therapy in patients with newly diagnosed multiple myeloma. *Cancer* 2012;**118**:1585–92.
- [41] Dunavin NC, Wei L, Elder P, Phillips GS, Benson Jr DM, Hofmeister CC, et al. Early versus delayed autologous stem cell transplant in patients receiving novel therapies for multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 2013;**54**:1658–64.
- [42] Palumbo A, Cavallo F, Gay F, Di RF, Ben YD, Petrucci MT, et al. Autologous transplantation and maintenance therapy in multiple myeloma. *N Engl J Med* 2014;**371**:895–905.
- [43] Palumbo A, Gay F, Spencer A, Di Raimondo F, Zdenek A, Larocca A, et al. A phase III study of ASCT vs cyclophosphamide-lenalidomide-dexamethasone and lenalidomide-prednisone maintenance vs lenalidomide alone in newly diagnosed myeloma patients; ASH Annual Meeting 2013, [abstract 763].
- [44] Venner CP, Gillmore JD, Sachchithanatham S, Mahmood S, Lane T, Foard D, et al. Stringent patient selection improves outcomes in AL amyloidosis after autologous stem cell transplantation in the upfront and relapsed setting. *Haematologica* 2014;**99**:e260–3.
- [45] Huang X, Wang Q, Chen W, Zeng C, Chen Z, Gong D, et al. Induction therapy with bortezomib and dexamethasone followed by autologous stem cell transplantation versus autologous stem cell transplantation alone in the treatment of renal AL amyloidosis: a randomized controlled trial. *BMC Med* 2014;**12**:2.
- [46] Scott EC, Heitner SB, Dibb W, Meyers G, Smith SD, Abar F, et al. Induction bortezomib in AL amyloidosis followed by high dose melphalan and autologous stem cell transplantation: a single institution retrospective study. *Clin Lymphoma Myeloma Leuk* 2014;**14**:424–30.
- [47] Kristen AV, Rosenberg M, Lindenmaier D, Merkle C, Steen H, Andre F, et al. Osteopontin: a novel predictor of survival in patients with systemic light-chain amyloidosis. *Amyloid* 2014;**21**:202–10.
- [48] Palladini G, Dispenzieri A, Gertz MA, Kumar S, Wechalekar A, Hawkins PN, et al. New criteria for response to treatment in immunoglobulin light chain amyloidosis based on free light chain measurement and cardiac biomarkers: impact on survival outcomes. *J Clin Oncol* 2012;**30**:4541–9.
- [49] Girnius S, Seldin DC, Cibeira MT, Sanchowala V. New hematologic response criteria predict survival in patients with immunoglobulin light chain amyloidosis treated with high-dose melphalan and autologous stem-cell transplantation. *J Clin Oncol* 2013;**31**:2749–50.
- [50] Gisselbrecht C, Glass B, Mounier N, Singh GD, Linch DC, Trneny M, et al. Salvage regimens with autologous transplantation for relapsed large B-cell lymphoma in the rituximab era. *J Clin Oncol* 2010;**28**:4184–90.
- [51] Philip T, Guglielmi C, Hagenbeek A, Somers R, Van der Lelie H, Bron D, et al. Autologous bone marrow transplantation as compared with salvage chemotherapy in relapses of chemotherapy-sensitive non-Hodgkin's lymphoma. *N Engl J Med* 1995;**333**:1540–5.
- [52] Thieblemont C, Briere J, Mounier N, Voelker HU, Cuccuini W, Hirschaud E, et al. The germinal center/activated B-cell subclassification has a prognostic impact for response to salvage therapy in relapsed/refractory diffuse large B-cell lymphoma: a bio-CORAL study. *J Clin Oncol* 2011;**29**:4079–87.
- [53] Hans CP, Weisenburger DD, Greiner TC, Gascoyne RD, Delabie J, Ott G, et al. Confirmation of the molecular classification of diffuse large B-cell lymphoma by immunohistochemistry using a tissue microarray. *Blood* 2004;**103**:275–82.
- [54] Fruchart C, Tilly H, Morschhauser F, Ghesquieres H, Bouteloup M, Ferme C, et al. Upfront consolidation combining yttrium-90 ibritumomab tiuxetan and high-dose therapy with stem cell transplantation in poor-risk patients with diffuse large B cell lymphoma. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;**20**:1905–11.
- [55] Visani G, Stefani PM, Capria S, Malerba L, Galienucci P, Gaudio F, et al. Bendamustine, etoposide, cytarabine, melphalan, and autologous stem cell rescue produce a 72% 3-year PFS in resistant lymphoma. *Blood* 2014;**124**:3029–31.
- [56] Colpo A, Hochberg E, Chen YB. Current status of autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma. *Oncologist* 2012;**17**:80–90.
- [57] Rancea M, von TB, Monsef I, Engert A, Skoetz N. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma: a systematic review with meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol* 2014;**92**:1–10.
- [58] Onishi M, Graf SA, Holmberg L, Behnia S, Shustov AR, Schiavo K, et al. Brentuximab vedotin administered to platinum-refractory, transplant-naïve Hodgkin lymphoma patients can increase the proportion achieving FDG PET negative status. *Hematol Oncol* 2014 [Epub ahead of print].
- [59] Moskowitz CH, Nademanee A, Masszi T, Agura E, Holowiecki J, Abidi MH, et al. Brentuximab vedotin as consolidation therapy after autologous stem-cell transplantation in patients with Hodgkin's lymphoma at risk of relapse or progression (AETHERA): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet* 2015;**385**:1853–62.
- [60] Chen R, Palmer JM, Thomas SH, Tsai NC, Farol L, Nademanee A, et al. Brentuximab vedotin enables successful reduced-intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation in patients with relapsed or refractory Hodgkin lymphoma. *Blood* 2012;**119**:6379–81.
- [61] Delarue R, Haioun C, Ribrag V, Brice P, Delmer A, Tilly H, et al. CHOP and DHAP plus rituximab followed by autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a phase 2 study from the Groupe d'Étude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood* 2013;**121**:48–53.
- [62] Touzeau C, Leux C, Bouabdallah R, Roussel M, Delarue R, Bouabdallah K, et al. Autologous stem cell transplantation in mantle cell lymphoma: a report from the SFGM-TC. *Ann Hematol* 2014;**93**:233–42.
- [63] Le Gouill S, Cartron G, Tourmilhac O, Morschhauser F, Dorvaux V, Fleury J, et al. Rituximab maintenance versus WW after R-DHAP plus ASCT in untreated patients with MCL: Interim analysis of the LYMA trial. A LYSA study. 13th International Conference on Malignant Lymphoma, June 17-20, 2015, Lugano, Switzerland. abstract 061.
- [64] Al KM, de Almeida JR, Guyatt GH, Kuruvilla J, Crump M. Autologous stem cell transplantation in follicular lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *J Natl Cancer Inst* 2012;**104**:18–28.
- [65] Wang B, Ren C, Zhang W, Ma X, Xia B, Sheng Z. Intensified therapy followed by autologous stem-cell transplantation (ASCT) versus conventional therapy as first-line treatment of follicular lymphoma: a meta-analysis. *Hematol Oncol* 2013;**31**:29–33.
- [66] Schaaf M, Reiser M, Borchmann P, Engert A, Skoetz N. High-dose therapy with autologous stem cell transplantation versus chemotherapy or immuno-chemotherapy for follicular lymphoma in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;(1):CD007678.
- [67] Kothari J, Peggs KS, Bird A, Thomson KJ, Morris E, Virchis AE, et al. Autologous stem cell transplantation for follicular lymphoma is of most benefit early in the disease course and can result in durable remissions, irrespective of prior rituximab exposure. *Br J Haematol* 2014;**165**:334–40.
- [68] Metzner B, Pott C, Muller TH, Gebauer W, Casper J, Kraemer D, et al. Long-term clinical and molecular remissions in patients with follicular lymphoma following high-dose therapy and autologous stem cell transplantation. *Ann Oncol* 2013;**24**:1609–15.
- [69] El-Najjar I, Boumendil A, Luan JJ, Bouabdallah R, Thomson K, Mohty M, et al. The impact of total body irradiation on the outcome of patients with follicular lymphoma treated with autologous stem cell transplantation in the modern era. A retrospective study of the EBMT lymphoma working party. *Ann Oncol* 2014;**25**:2224–9.
- [70] Derenzini E, Casadei B, Broccoli A, Gandolfi L, Pellegrini C, Zinzani PL. Sequential therapy with alternating short courses of R-CHOP (rituximab, cyclophosphamide, doxorubicin, vincristine, prednisone) and R-FM (rituximab, fludarabine, mitoxantrone) followed by autologous stem cell transplantation results in long term remission in advanced follicular lymphoma. *Br J Haematol* 2014;**166**:625–8.
- [71] Sebban C, Brice P, Delarue R, Haioun C, Souleau B, Mounier N, et al. Impact of rituximab and/or high-dose therapy with autotransplant at time of relapse in patients with follicular lymphoma: a GELA study. *J Clin Oncol* 2008;**26**:3614–20.
- [72] Alcantara M, Dupuis J, Mareschal S, Julian A, Cottreau AS, Becker S, et al. PET/CT before autologous stem cell transplantation predicts outcome in refractory/relapsed follicular lymphoma. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 2015;**42**:215–21.

- [73] Pettengell R, Schmitz N, Gisselbrecht C, Smith G, Patton WN, Metzner B, et al. Rituximab purging and/or maintenance in patients undergoing autologous transplantation for relapsed follicular lymphoma: a prospective randomized trial from the lymphoma working party of the European group for blood and marrow transplantation. *J Clin Oncol* 2013;**31**:1624–30.
- [74] Cohen S, Kiss T, Lachance S, Roy DC, Sauvageau G, Busque L, et al. Tandem autologous-allogeneic nonmyeloablative sibling transplantation in relapsed follicular lymphoma leads to impressive progression-free survival with minimal toxicity. *Biol Blood Marrow Transplant* 2012;**18**:951–7.
- [75] Ban-Hoefen M, Kelly JL, Bernstein SH, Liesveld J, Constine L, Becker M, et al. High-dose therapy and autologous stem cell transplant for transformed non-Hodgkin lymphoma in the rituximab era. *Leuk Lymphoma* 2012;**53**:830–5.
- [76] Villa D, Crump M, Keating A, Panzarella T, Feng B, Kuruvilla J. Outcome of patients with transformed indolent non-Hodgkin lymphoma referred for autologous stem-cell transplantation. *Ann Oncol* 2013;**24**:1603–9.
- [77] Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de WT, Labar B, Resegotti L, et al. Autologous or allogeneic bone marrow transplantation compared with intensive chemotherapy in acute myelogenous leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer (EORTC) and the Gruppo Italiano Malattie Ematologiche Maligne dell'Adulto (GIMEMA) Leukemia Cooperative Groups. *N Engl J Med* 1995;**332**:217–23.
- [78] Thomas X, Suci S, Rio B, Leone G, Brocchia G, Fillet G, et al. Autologous stem cell transplantation after complete remission and first consolidation in acute myeloid leukemia patients aged 61-70 years: results of the prospective EORTC-GIMEMA AML-13 study. *Haematologica* 2007;**92**:389–96.
- [79] Burnett AK, Goldstone AH, Stevens RM, Hann IM, Rees JK, Gray RG, et al. Randomised comparison of addition of autologous bone-marrow transplantation to intensive chemotherapy for acute myeloid leukaemia in first remission: results of MRC AML 10 trial. UK Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Lancet* 1998;**351**:700–8.
- [80] Keating A, DaSilva G, Perez WS, Gupta V, Cutler CS, Ballen KK, et al. Autologous blood cell transplantation versus HLA-identical sibling transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a registry study from the Center for International Blood and Marrow Transplantation Research. *Haematologica* 2013;**98**:185–92.
- [81] Singh H, Werner LL, Asali S, DeAngelo DJ, Ballen KK, Amrein PC, et al. Comparison of autologous stem cell transplantation versus consolidation chemotherapy for patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia (CN-AML) and FLT3ITD. *Am J Hematol* 2011;**86**:625–7.
- [82] Borrello IM, Levitsky HI, Stock W, Sher D, Qin L, DeAngelo DJ, et al. Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF)-secreting cellular immunotherapy in combination with autologous stem cell transplantation (ASCT) as postremission therapy for acute myeloid leukemia (AML). *Blood* 2009;**114**:1736–45.
- [83] Nagler A, Labopin M, Gorin NC, Ferrara F, Sanz MA, Wu D, et al. Intravenous busulfan for autologous stem cell transplantation in adult patients with acute myeloid leukemia: a survey of 952 patients on behalf of the Acute Leukemia Working Party of the European Group for Blood and Marrow Transplantation. *Haematologica* 2014;**99**:1380–6.
- [84] Feller N, van der Pol MA, Waaijman T, Weijers GW, Westra G, Ossenkoppele GJ, et al. Immunologic purging of autologous peripheral blood stem cell products based on CD34 and CD133 expression can be effectively and safely applied in half of the acute myeloid leukemia patients. *Clin Cancer Res* 2005;**11**:4793–801.
- [85] Wang J, Ouyang J, Zhou R, Chen B, Yang Y. Autologous hematopoietic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: a meta-analysis of randomized trials. *Acta Haematol* 2010;**124**:61–71.
- [86] Czerw T, Labopin M, Gorin N, Giebel S, Blaise D, Meloni G. Long-term follow-up of autologous hematopoietic stem cell transplantation (AHSCT) for acute myeloid leukemia (AML): a survey of 3567 patients in CR at 3 years post-transplantation, from the Acute Leukemia Working Party of the EBMT. ASH Annual Meeting 2012; [abstract 3112].
- [87] Gupta V, Richards S, Rowe J. Allogeneic, but not autologous, hematopoietic cell transplantation improves survival only among younger adults with acute lymphoblastic leukemia in first remission: an individual patient data meta-analysis. *Blood* 2013;**121**:339–50.
- [88] Wetzler M, Watson D, Stock W, Koval G, Mulkey FA, Hoke EE, et al. Autologous transplantation for Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia achieves outcomes similar to allogeneic transplantation: results of CALGB Study 10001 (Alliance). *Haematologica* 2014;**99**:111–5.
- [89] Wang J, Zhang Q, Zhou R, Chen B, Ouyang J. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation as a first-line therapy for high-risk primary breast cancer: a meta-analysis. *PLoS One* 2012;**7**:e33388.
- [90] Pedrazzoli P, Martinelli G, Gianni AM, Da Prada GA, Ballestrero A, Rosti G, et al. Adjuvant high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell support for high-risk primary breast cancer: results from the Italian national registry. *Biol Blood Marrow Transplant* 2014;**20**:501–6.
- [91] Lewin J, Dickinson M, Voskoboynik M, Collins M, Ritchie D, Toner G. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in relapsed or refractory germ cell tumours: outcomes and prognostic variables in a case series of 17 patients. *Intern Med J* 2014;**44**:771–8.
- [92] Papadimitriou C, Dafni U, Anagnostopoulos A, Vlachos G, Voulgaris Z, Rodolakis A, et al. High-dose melphalan and autologous stem cell transplantation as consolidation treatment in patients with chemosensitive ovarian cancer: results of a single-institution randomized trial. *Bone Marrow Transplant* 2008;**41**:547–54.
- [93] Litzow MR, Peethambaram PP, Safgren SL, Keeney GL, Ansell SM, Dispenzieri A, et al. Phase I trial of autologous hematopoietic SCT with escalating doses of topotecan combined with CY and carboplatin in patients with relapsed or persistent ovarian or primary peritoneal carcinoma. *Bone Marrow Transplant* 2010;**45**:490–7.
- [94] Gill P, Litzow M, Buckner J, Arndt C, Moynihan T, Christianson T, et al. High-dose chemotherapy with autologous stem cell transplantation in adults with recurrent embryonal tumors of the central nervous system. *Cancer* 2008;**112**:1805–11.
- [95] Wang J, Zhan P, Ouyang J, Chen B, Zhou R, Yang Y. Impact of high-dose chemotherapy with autologous hematopoietic stem cell transplantation on small-cell lung cancer. *Lung Cancer* 2009;**65**:126–7.
- [96] Peinemann F, Smith LA, Bartel C. Autologous hematopoietic stem cell transplantation following high dose chemotherapy for non-rhabdomyosarcoma soft tissue sarcomas. *Cochrane Database Syst Rev* 2013;(8):CD008216.
- [97] Peinemann F, Kroger N, Bartel C, Grouven U, Pittler M, Erttmann R, et al. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for metastatic rhabdomyosarcoma—a systematic review. *PLoS One* 2011;**6**:e17127.
- [98] Curro D, Vuolo L, Gualandi F, Bacigalupo A, Roccatagliata L, Capello E, et al. Low intensity lympho-ablative regimen followed by autologous hematopoietic stem cell transplantation in severe forms of multiple sclerosis: A MRI-based clinical study. *Mult Scler* 2015 [Epub ahead of print].
- [99] Al-toma A, Nijeboer P, Bouma G, Visser O, Mulder CJ. Hematopoietic stem cell transplantation for non-malignant gastrointestinal diseases. *World J Gastroenterol* 2014;**20**:17368–75.
- [100] Collins E, Gilkeson G. Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation in the treatment of refractory systemic lupus erythematosus—where are we now? *Clin Immunol* 2013;**148**:328–34.
- [101] Tyndall A. Application of autologous stem cell transplantation in various adult and pediatric rheumatic diseases. *Pediatr Res* 2012;**71**:433–8.
- [102] van Laar JM, Farge D, Sont JK, Naraghi K, Marjanovic Z, Larghero J, et al. Autologous hematopoietic stem cell transplantation vs intravenous pulse cyclophosphamide in diffuse cutaneous systemic sclerosis: a randomized clinical trial. *JAMA* 2014;**311**:2490–8.
- [103] Passweg JR, Rabusin M. Hematopoietic stem cell transplantation for immune thrombocytopenia and other refractory autoimmune cytopenias. *Autoimmunity* 2008;**41**:660–5.
- [104] Centers for Disease Control and Prevention. Vaccination of Hematopoietic Stem Cell Transplant (HSCT) Recipients. www.cdc.gov/vaccines/pubs/hemato-cell-transplts.htm.

- [105] Sohn BS, Yoon DH, Kim S, Lee K, Kang EH, Park JS, et al. The role of prophylactic antimicrobials during autologous stem cell transplantation: a single-center experience. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2012;**31**:1653–61.
- [106] Afessa B, Abdulai RM, Kremers WK, Hogan WJ, Litzow MR, Peters SG. Risk factors and outcome of pulmonary complications after autologous hematopoietic stem cell transplant. *Chest* 2012;**141**:442–50.
- [107] Majhail NS, Rizzo JD. Surviving the cure: long term follow-up of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone Marrow Transplant* 2013;**48**:1145–51.
- [108] Majhail NS, Rizzo JD, Lee SJ, Aljurf M, Atsuta Y, Bonfim C, et al. Recommended screening and preventive practices for long-term survivors after hematopoietic cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 2012;**47**:337–41.

R. Costello (regis.costello@free.fr).

G. Venton.

J. Colle.

Service d'hématologie et thérapie cellulaire, CHU La Conception, 147, boulevard Baille, 13005 Marseille, France.

Laboratoire Inserm U1090 / Technologies avancées en génomique pour la clinique (TAGC), Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France.

Y. Labiad.

Laboratoire Inserm U1090 / Technologies avancées en génomique pour la clinique (TAGC), Faculté des Sciences de Luminy, Marseille, France.

P. Poullin.

Service d'hémaphèreses, CHU La Conception, 147, boulevard Baille, 13005 Marseille, France.

Toute référence à cet article doit porter la mention : Costello R, Venton G, Colle J, Labiad Y, Poullin P. Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. *EMC - Hématologie* 2016;11(2):1-13 [Article 13-060-A-10].

Disponibles sur www.em-consulte.com



Arbres
décisionnels



Iconographies
supplémentaires



Vidéos/
Animations



Documents
légaux



Information
au patient



Informations
supplémentaires



Auto-
évaluations



Cas
clinique