



HAL
open science

Contribution de l'approche transcriptomique dans la physiopathologie et le traitement des hémopathies malignes

Yasmine Labiad

► **To cite this version:**

Yasmine Labiad. Contribution de l'approche transcriptomique dans la physiopathologie et le traitement des hémopathies malignes. Sciences du Vivant [q-bio]. Aix-Marseille Université, 2016. Français. NNT : 2016AIXM4068 . tel-04529589

HAL Id: tel-04529589

<https://amu.hal.science/tel-04529589>

Submitted on 2 Apr 2024

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

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

Université d'Aix – Marseille
Faculté des Sciences de Luminy
École Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé ED 62

Thèse pour obtenir le grade de :

Docteur de l'Université d'Aix-Marseille

Spécialité : Génomique et Bioinformatique

Contribution de l'approche transcriptomique dans la physiopathologie et le traitement des hémopathies malignes

Présentée et soutenue publiquement par :

Yasmine LABIAD

Le Mardi 8 novembre 2016

Devant le jury :

Monsieur le professeur Guillaume CARTRON	Rapporteur
Monsieur le professeur Andrea DE MARIA	Rapporteur
Monsieur le professeur Raoul HERBRECHT	Examineur
Monsieur le professeur Pascal RIHET	Président
Madame le docteur Catherine NGUYEN	Directrice de thèse
Monsieur le professeur Régis COSTELLO	Directeur de thèse

Résumé

À la fin du 20^e siècle, la première étude utilisant les microarrays pour étudier la leucémie aiguë a démontré l'utilité de cette technologie dans la mise en évidence de l'expression des gènes. La décennie suivante a montré que l'étude de l'expression des gènes est devenue un outil précieux dans la recherche en hémopathies malignes. De nos jours, il a été établi que l'expression des gènes est devenue un outil indispensable en recherche dans le domaine de la cancérologie et en particulier en onco-hématologie.

L'objectif général de cette thèse a été de mettre en évidence la contribution de l'approche transcriptomique dans la physiopathologie et le traitement des hémopathies malignes. En particulier, comment la technologie des microarrays nous a aidée à étudier diverses problématiques en onco-hématologie ; notamment : le décès lié aux complications infectieuses, l'incapacité à obtenir la rémission et le décès lié aux rechutes.

Dans la première partie, notre objectif était d'étudier les cellules *Natural killer* (Nk) chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM). Nous avons comparé la signature transcriptomique des cellules Nk de patients LAM à celle des cellules Nk de sujet sains et suggéré que le facteur de transcription ETS-1 est un bon candidat capable de réguler les récepteurs activateurs NCR (natural cytotoxicity receptors) dont les gènes sont situés sur deux chromosomes différents, même si leur expression reste fortement coordonnée.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la prédiction du sepsis en utilisant une approche transcriptomique dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (auto-CSH). En utilisant le même modèle, dans la troisième partie, nous avons mis en évidence l'effet du melphalan en tant que chimiothérapie de conditionnement sur les cellules mononuclées du sang périphérique et identifié un marqueur potentiel de rechute précoce chez les patients atteints de myélome dans le cas de l'auto-CSH.

Enfin, dans la dernière partie, notre objectif a été d'analyser le profil d'expression génique des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection par le VIH afin de vérifier ou pas l'existence des sous-types décrits chez les patients immunocompétents

Abstract

At the end of the 20th century, the first study of human acute leukemia demonstrated the usefulness of the microarray-based technology for gene expression profiling. The following decade demonstrated that gene expression profiling became an invaluable tool for hematological malignancies research. Nowadays, it has been established that gene expression profiling became an available tool for study cancers and more peculiarly hematological malignancies.

The aim of this research is to demonstrate transcriptomic approach contribution in the physiopathology and treatment of hematological malignancies. In particular, how microarrays technology is used to study several oncohematology difficulties; which remain deaths-related infection, as well as the failure to obtain remission and death related relapse.

In the first part, our focus was to study natural killer cells (Nks) in patients affected with acute myeloid leukemia (AML). We compared transcriptomic AML-NKs signature with healthy donors-NKs signature and suggested that ETS-1 transcription factor is a good candidate able to regulate the natural cytotoxicity receptors (NCRs), whose coding genes, are located on two different chromosomes even if their expression remain strongly coordinated.

Our second part, aimed to predict sepsis using a transcriptomic approach in the case of autologous stem cell transplantation (auto-HSCT). Using the same model, in the third part, we highlighted the melphalan high-dose chemotherapy effect on peripheral blood mononuclear cells and identified a potential good biomarker of early relapse in patients affected by myeloma in the case of auto-HSCT.

Our final focus was to analyze gene expression profile of HIV-related large diffuse B-cell lymphoma type in order to verify the existence of subgroups described in immune-competent patients.

Parce que sans les autres, rien n'est possible...

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, *Monsieur le professeur Raoul HERBRECH, Monsieur le professeur Andrea DEMARIA, Monsieur le professeur Guillaume CARTRON, et Monsieur le professeur Pascal RIHET* d'avoir acceptés d'évaluer mon travail de thèse.

« Le meilleur ami de “merci” est “beaucoup” ». Michel Bouthot

Un immense merci à *Régis* et *Cathy* pour m'avoir donné la possibilité de travailler sur les différents projets, merci aussi pour votre soutien et encadrement ainsi que pour ces 5 années passées ensemble. Je vous remercie d'avoir cru en moi, m'avoir poussée vers le haut et surtout de m'avoir fait confiance.

Je tiens aussi à remercier ma marraine de thèse *Laurence* pour son soutien et son aide ainsi pour ses conseils.

Je voudrais remercier : Aix-Marseille université, l'AP-HM, l'INSERM, l'ANRS ainsi *Advanced BioDesign* pour les différents financements. Un merci tout particulier à *Ismail Ceylan* et *Guillaume Martin* qui m'ont permis de finir ma thèse en 4 ans.

Merci à tout le personnel de l'hôpital de la conception qui a fait que ces études existent : infirmiers, internes, médecins, secrétaires... Merci à *Corinne Brunet*, pour toutes les fois où elle a dû nous dépanner pour stocker les cellules, merci à *Julien Colle*, ainsi qu'à tout le service d'hématologie 3^e Ouest. Un merci tout particulier à *Laure Farnault* pour son investissement dans les différents projets, pour son aide, sa disponibilité et sa gentillesse. Enfin, je remercie les patients d'avoir donné leur consentement pour les différents projets.

Je tiens à remercier aussi : *Christophe Avignon, Michèle Genin, Pr Sophie Prévot, Pr Michielis, Caroline Besson* et le *Pr Lépidi* pour nous avoir permis de mettre en place le projet lymphome et pour l'intérêt qu'ils ont porté au projet.

Béatrice, Nicolas ; je vous remercie votre aide et pour m'avoir aussi bien formée sur la partie expérimentale du transcriptome. *Geneviève*, merci pour ton aide diverse et variée au quotidien. Merci à *Pascal* pour son soutien sur la partie statistique et merci de m'avoir initiée à tout ce que je déteste : R ; SPSS... Merci à *Auréli* pour son aide en bioinformatique. Je tiens aussi à remercier *Magali* et *Soline* pour l'aide apportée sur la partie q-PCR. Un grand merci à tous les membres des réunions AXE 1 des différentes années en particulier : *Nathalie, Lydie, Sabrina, Michel, Florian...*

À toutes les personnes du laboratoire TAGC qui ont participé de près ou de loin aux différents projets et qu'ils les ont rendus possibles... Merci.

Je tiens à remercier également *Noushine Mossadegh-Keller* du laboratoire CIML pour son assistance technique en q-PCR à haut débit.

Céline, Audrey, Sabrina, Aurélien, je vous remercie pour votre aide ainsi que pour tous les bons moments passés ensemble (congrès, soirées, pauses -matin, midi et soir...). *Céline*, merci de m'avoir formée à mon arrivée ou j'ai dû couler des litres de sang artificiel et surtout merci pour « *Flux* » qui m'a donné le sourire durant l'écriture de ma thèse. *Aurélien*, je te remercie pour les longues discussions et pour avoir promis de me trainer par les cheveux s'il fallait, pour que je soutienne ma thèse.

Geoffroy, Céline merci pour les fous rires quotidiens, les débats farfelus et les discussions animées, merci pour votre grande aide tout le long de mon parcours.

Et enfin, je tiens à remercier tous les membres du TAGC en particulier les étudiants pour votre bonne humeur et pour tous les excellents moments passés ensemble (Journées des thésards, repas, LME,...)

Merci beaucoup à tous...

« L'amitié double les joies et réduit de moitié les peines » Francis Bacon, Essais, 1625.

À mes amis, qu'ils soient ici ou ailleurs...

Je tenais à vous remercier pour votre soutien sur tous les plans, merci d'être vous ; des personnes qui comptent pour moi. *Les Cuicuis : Melissa, Hanane, Fairouz, Mimi, Amira et Dina, Maroua ; Les laisse-moi tranquillandiens : Ayoub, Lyes et Houssem ; Les cuisinières d'enfer ; Ikram et Lamia ; ainsi qu'à : Chahra, Louisa, Miya, Ahlem, Lila, Nassim, Yacine, Zeryab... MERCI*

« Nos meilleurs amis sont ceux qui nous rattachent à la vie, qui veulent multiplier nos points d'appui, élargir notre cercle d'affection et d'activité, qui tentent de peupler et non de dépeupler notre âme » Henri-Frédéric Amiel, Journal intime, 1870.

Louiza (alias Cousine) Sarah, Melissa et Hanane, que dire... La vie a fait que chacune d'entre nous soit quelque part, mais moi je dis que : « *La distance est à l'amitié ce qu'est le feu au vent. Il éteint le petit, et il allume le grand* » (adapté de Roger de Rabutin). Un très grand merci pour votre soutien tout particulier, merci pour ces belles années passées ensemble et pour celles qui arrivent. Merci pour tous les bons moments, mais aussi pour les mauvaises passes, celles qui ont renforcé nos liens. Je vous remercie pour les heures passées au téléphone, et ces centaines et centaines de messages et photos.

Sam, mon manager ; un énorme merci pour tes conseils très avisés, pour ton soutien, ta disponibilité, ainsi que pour ta générosité. Merci pour tout ce temps que tu m'as consacré, et surtout de croire en moi et en mes capacités.

« Qu'est-ce donc qu'une famille ? C'est le lieu du don et de la réception incalculable d'une vie qui se déploie avec nous, mais aussi malgré nous, et qui nous jette toujours plus avant dans le mystère d'exister. » Fabrice Hadjadj, Qu'est-ce qu'une famille, 2014

Les Labiad... Oncles et leurs femmes, cousins et cousines, je vous remercie pour votre soutien et affection... Un merci assez spécial à *Yahia*, mon oncle pour toutes les longues discussions que nous avons eu, pour tes conseils et surtout pour la grande confiance que tu m'as toujours témoignée. Je te dois beaucoup...

Les Molinari... Je vous remercie pour tous les vendredis, ainsi que pour tous les moments passés ensemble, mais aussi votre dévouement et bienveillance. Merci à *Tonton Kamal* pour les questions existentielles que tu m'as posées pendant 4 ans : Alors tu en es où ? As-tu commencé la rédaction ? Tes publications avancent ? Et merci à tous les cousins qui volaient à me secours : « Papa... qu'est-ce qu'on a dit... »

Je remercie tout particulièrement : *Yousra, Chiraz, Houda, Ryad, Neïla, Mus et Omar* ; qui me font sentir près des miens malgré la distance. Merci pour toutes ces photos, vidéos et surtout comptes rendus qui m'ont toujours fait pleurer de rire.

Merci à mes deux grands-parents, *Mémé et Pépère* pour leur amabilité.

À ma sœur et mon petit frère, merci d'être là pour moi. Je ne suis peut-être pas la meilleure grande sœur qu'il existe ; mais cachez que vous pourrez toujours compter sur moi, quelle que soit la situation. J'espère que j'ai été et serais à la hauteur à vos yeux.

Et comme on dit, le meilleur pour la fin... Un immense merci à mes parents, sans qui je ne serai pas là où je suis aujourd'hui. Je vous remercie de m'avoir supporté toutes ces années et spécialement ces dernières. Tous les mots du monde ne suffiront pas pour vous témoigner ma gratitude et l'amour que je vous porte. *Maman, Papa* ; un grand merci de m'avoir élevée, responsabilisée, et surtout inculquée les vraies valeurs de la vie, merci de m'avoir toujours fait confiance (confiance aveugle) et m'avoir toujours poussé vers le haut. En résumé, merci d'avoir fait de moi ce que je suis aujourd'hui. Je vous aime.

À la mémoire de mes deux grands-parents : Mima et Pépé ; même si vous nous avez quittés il y a déjà quelques années, je suis certaine que vous aurez été fières de moi.

Et enfin, à la mémoire de mon arrière-grand-père G.A. Molinari pour cet héritage inestimable et sans qui je ne suis pas là où je suis aujourd'hui.

**« Chaque fois que la science avance d'un pas, c'est
qu'un imbécile la pousse, sans faire exprès »**

Emile Zola, La joie de vivre, 1884

Table des matières

Résumé.....	1
Abstract:.....	3
Remerciements	7
Liste des publications.....	15
Liste des figures et des tables	16
Liste des abréviations.....	17
L'approche transcriptomique	21
Définition du transcriptome	23
Il était une fois ... L'ARN	23
La naissance des méthodes d'analyses transcriptomiques.....	24
Les différents types d'ARN	26
La quantification des transcrits.....	29
Le métabolisme de l'ARN	29
Les puces à ADN	29
La variabilité des résultats et les difficultés d'analyse :	38
Apport de l'analyse transcriptomique dans les hémopathies malignes :	39
Introduction du travail de thèse et objectifs	43
Chapitre 1 : L'étude des cellules Naturel killer chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde : de l'étude phénotypique à l'analyse transcriptomique.....	43
Introduction et justificatifs du travail	47
Discussion :	61
Conclusion et perspectives :	62
Chapitre 2 : Identification de la signature transcriptomique prédictive de la survenue du sepsis et/ou de SIRS.....	61
Introduction	65
Justificatifs du travail	79

Patients, matériels et méthodes	79
La validation de la signature transcriptomique dans une cohorte de validation indépendante.....	95
Discussion	96
Conclusion et perspectives.....	101
Chapitre 3: Interleukine -1 β : marqueur potentiel de rechute précoce chez les patients autogreffés recevant le melphalan comme chimiothérapie de conditionnement	123
Introduction et justificatifs du travail	127
Matériels et Méthodes.....	127
Résultats	129
Discussion	132
Conclusion	136
Chapitre 4: Etude transcriptomique des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection par HIV	147
Introduction et justificatif du travail.....	151
Matériels et méthodes.....	153
Résultats préliminaires.....	154
Conclusion générale.....	157
Annexes:.....	173

Liste des publications

Articles originaux acceptés

- **Micafungin as primary antifungal prophylaxis in patients presenting with acute myeloid leukemia** : G Venton ; H Adam ; J Colle ; **Y Labiad** ; C Mercier ; V Ivanov ; P Suchon ; R Fanciullino ; L Farnault et R Costello : Médecine et maladies infectieuses
- **Natural killer cells in Acute Myeloid Leukemia Patients: From Phenotype to Transcriptomic Analysis: **Y Labiad** *** ; G Venton * ; J Colle ; A Fino ; S Afridi ; M Torres ; S Monteuil ; B Loriod ; N Fernandez-Nunez ; L Farnault ; P Suchon ; JC Mattei ; P Rihet ; A Bergon ; C Nguyen ; C Baier et R Costello
- **Aldehyde dehydrogenases inhibition eradicates leukemia stem cells while sparing normal progenitors** : G Venton ; M Pérez-Alea ; C Baier ; G Fournet ; G Quash ; **Y Labiad** ; G Martin ; F Sanderson ; P Poullin ; P Suchon ; L Farnault ; C Nguyen ; C Brunet ; I Ceylan et R Costello

Chapitre de livre accepté

- **Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques** : R Costello ; G Venton ; J Colle ; **Y Labiad** ; P Poullin : Chapitre EMC

Articles originaux en préparation

- **SIRS and SEPSIS following autologous hematopoietic stem cell transplantation: a predictive transcriptomic signature: **Y Labiad** *** ; G Venton * ; C Baier ; J Colle ; L Farnault ; C Brunet ; B Loriod ; N Fernandez-Nunez ; P Suchon ; JC Mattei ; P Rihet ; C Nguyen et R Costello et R Costello et R Costello
- **Interleukin-1 β : early relapse marker in autograft patients receiving melphalan as conditioning chemotherapy: **Y Labiad**** ; G Venton ; L Farnault ; B Loriod ; N Fernandez-Nunez ; C Nguyen et R Costello
- **Aldehyde dehydrogenases inhibition as unconventional therapeutic approach in acute myeloid leukemia: from the biological rational to the transcriptomic analysis:** G Venton ; **Y Labiad** ; G Martin ; M Pérez-Alea ; G Quash ; G Fournet ; M Torres ; A Bergon ; C Baier ; I Ceylan et R Costello
- **Large scale transcriptomic characterization of mice blood ; lung and brain inflammation during Acute Lung Injury** : S Garnier ; I Lesur ; E Yasmine ; **Y Labiad** ; L Pradel ; B Loriod ; N Lalevée ; P Rihet et C Nguyen
- **Transcriptomic analysis of Diffuse Large B-Cell Lymphoma related to HIV infection: **Y Labiad**** ; G Venton ; C Besson ; M Genin ; C Avignon ; JF Michiels ; P Mounier ; C Nguyen ; S Prévot et R Costello

Abstract publié

- **Sepsis and neutropenia in hematological malignancies** : **Y Labiad** ; L Farnault ; B Loriod ; R Costello et C Nguyen : Critical Care 18(Suppl 2):P47-P47

* Co-premiers auteurs | et Co-derniers auteurs

Liste des figures et des tables

Liste des figures

Figure 1 : Les différents types d'ARN

Figure 2 : Pipeline classique d'une expérience de puces à ADN

Figure 3 : Schéma récapitulatif du protocole simple marquage d'Agilent

Figure 4 : Schéma récapitulatif du protocole double marquage d'Agilent

Figure 5 : Principe de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Figure 6 : Illustration de la relation entre de SIRS et le sepsis et les autres infections

Figures 7 : Le sepsis en deux phases

Figure 8 : Aperçu des changements cellulaires au cours du sepsis

Figure 9 : La réponse inflammatoire et infectieuse

Figure 10 : Schéma récapitulatif du modèle expérimental

Figure 11 : Modèle de calcul des données ajustées sur l'effet des cofacteurs

Figure 12 : Pipeline d'analyse de l'expression des gènes

Figure 13 : Un exemple de calcul des données d'expression ajustées sur l'effet des cofacteurs

Figure 14 : Profile d'expression des gènes ajustée sur l'effet des cofacteurs

Figure 15 : Validation de la signature transcriptomique par RT-qPCR

Figure 16 : Niveau d'expression des gènes composant la signature transcriptomique dans une cohorte de validation indépendante

Figure 17 : Résumé schématique de la voie EDA/EDAR

Figure 18 : Pipeline d'analyse de l'expression des gènes

Figure 19 : Profil d'expression de l'effet du melphalan

Figure 20 : Enrichissement en termes fonctionnels du cluster I

Figure 21 : Enrichissement en termes fonctionnels du cluster II

Figure 22 : Schéma montrant l'implication de l'IL-1 β et l'IL-6 dans la résistance à la chimiothérapie et la rechute précoce

Figure 23 : Caractéristiques et profils d'expression des sous-types GC et ABC

Figure 24 : Profil d'expression des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection au VIH

Liste des tables

Table 1 : Les caractéristiques et données cliniques des patients

Table 2 : Résultats de l'analyse ANOVA globale

Table 3 : Caractéristiques des gènes différentiellement exprimés

Table 4 : Identification des groupes de patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules selon l'index de pronostique international IPI

Liste des abréviations

°C	Degrés Celsius
µg	Microgramme
ABC	Activated B cell
ACSH	Autogreffe de cellules souches hématopoïétiques
ADCC	Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity
ADN	Acide désoxyribonucléique (DNA en anglais)
ADNc	Acide désoxyribonucléique complémentaire
ALK	Anaplastic lymphoma kinase
ANOVA	Analyse de variance
ANRS	Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales
APACHE	Acute Physiology And Chronic Health Evaluation
ARN	Acide ribonucléique (RNA en anglais)
ARNg	ARN guide
ARNi	ARN interférent
ARNnc	ARN non codant
ARNpi	ARN piwi
ARNr	ARN ribosomique
ARNt	ARN de transfert
BCL	B-cell lymphoma
BEAM	Carmustine, etoposide, cytarabine and melphalan
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CBF-AML	Core-binding factor AML
CCL	C-C motif chemokine ligand
CCR	C-C motif chemokine receptors
CD	Cluster of designation
ChAT	Choline O-acetyltransferase
CHU	Centre Hospitalo-Universitaire
CIVD	Syndrome de coagulation intravasculaire disséminée
CMH II	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPP	Comité de protection des personnes
CRP	C-Réactive Protéine
CSH	Cellules souches hématopoïétiques
Ct	Cycle Threshold
CTLA4	Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4
CTP	Cytidine triphosphate
CXCL	C-X-C Motif Chemokine Ligand
CXCR4	C-X-C Motif Chemokine récepteur
Cy-3	Cyanine 3

Cy-5	Cyanine 5
dsARN	Double strand ARN
EBMT	European Society for Blood and Marrow Transplantation
EDA	Ectodysplasine A
EDAR	Ectodysplasine A recepteur
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
FDR	False discovery rate
FFPE	Formalin-Fixed Paraffin Embedded
FOXP3	Forkead box p3
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GATA3	GATA Binding Protein 3
GC	Germinal cell
G-CSF	Granulocyte-colony-stimulating factor
GITR	Glucocorticoid-induced tumour-necrosis-factor-receptor-related protein
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GPAM	Glycerol-3-phosphate acyltransferase, mitochondrial
GPAMKD	Glycerol-3-phosphate acyltransferase mitochondrial knock down
HBP	Heparin-binding protein
HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
HMGB	High mobility group box 1
HTLV-1	Human T-cell lymphotropic virus
ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
IPI	Index de pronostic international
kg	Kilogramme
LAI	Lymphome T angio-immunoblastique
LAM	Leucémie aiguë myéloblastique - AML en anglais
LAP	Leucémie aigue promyelocytaire
LBP	Lipopolysaccharide Binding Protein
LDGC	Lymphome B diffus à grandes cellules
LDH	Lactate Deshydrogénase
LH	Lymphome hodgkinien - lymphome de Hodgkin
LIMMA	Linear Models for Microarray Data
LM	Leucémie myéloïde
LncARN	Long non coding RNA
LNH	Lymphome non hodgkinien
LPS	Lipopolysaccharides
MCP	Membrane cofactor protein
mg	Milligramme

MGUS	Monoclonal gammopathy of undetermined significance
MIAME	Minimum information about a microarray experiment
miARN	Micro ARN
NCR	Natural cytotoxicity receptors
NF-KB	Nuclear factor-kappa B
NGS	Next-generation sequencing
NK	Natural killer
NKp46-44-30	Natural Killer Cell P46/44/30-Related Protein
nm	Nanomètre
NPM	Nucleophosmin
OMS	Organisation mondiale de la santé
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PCR	Polymerase chain reaction
PCT	Procalcitonine
PD-1	Programmed cell death 1
PDL-1	Programmed death-ligand 1
PMN	Polymorphonuclear leukocytes
pmol	Picomole
PPRAR-γ	Peroxisome proliferator-activated receptor gamma
PRR	Pattern Recognition Receptor
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
RIN	RNA Integrity number
RNS	Reactive nitrogen specie
ROS	Reactive oxygen species
RT-PCR	Reverse transcription polymerase chain reaction
RT-qPCR	Real-Time Quantitative Reverse Transcription PCR
SDF	Stromal cell-derived factor
siRNA	Small interfering ARN
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
snoRNA	Small nucleolar RNA
SOFA	Sepsis-related Organ Failure Assessment
SVM	Support Vector Machine
T reg	T regulateurs
TAGC	Technologies Avancées pour le Génome et la Clinique
TCR	T cell receptor
TdT	Terminal Deoxynucleotidyl Transferase
TE	Tris-EDTA
TGF	Transforming growth factor
Th1	T helper 1
TIA	T-cell-restricted intracellular antigen

TLR	Toll-like receptors
TNF	Tumor necrosis factor
TNFR	Tumor necrosis factor receptor
TREM-1	Triggering receptor expressed on myeloid cells 1
Tris-HCl	Tri-hydrochloride
U	Unité
UPN	Unique Patient number
VCAM	Vascular cell adhesion protein 1
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
VLA	Very Late Antigen

L'approche transcriptomique

L'analyse moléculaire de la physiopathologie d'un organe ou d'un tissu a été longtemps limitée à l'étude de quelques gènes candidats. Depuis le milieu des années 90, les outils moléculaires développés permettent de mesurer l'expression de plusieurs milliers de gènes en même temps (1). Appliquée à l'étude des tumeurs, cette technologie a pour ambition de préciser les mécanismes physiopathologiques et d'identifier des marqueurs diagnostiques ou pronostiques (1). Le développement des technologies à haut débit a permis de rechercher les altérations globales dans les tumeurs qui sont responsables de leur développement et de leur progression. L'une des principales applications de la connaissance génomique a été la conception des différents types de plates-formes de biopuces pour l'analyse des altérations de l'ADN ainsi que l'analyse de profil d'expression de gènes (2).

L'étude du transcriptome en utilisant les puces à ADN a pour but : l'étude simultanée de l'expression de milliers de gènes ou de leurs ARN simultanément (3). L'analyse bioinformatique des données du transcriptome de plusieurs échantillons permet leur groupement selon la similarité des profils d'expression. Cette analyse donne alors une image de l'expression des gènes d'une cellule, tissu, ou organe à un temps défini (3).

Depuis le séquençage du génome, les analyses transcriptomiques ont permis de comprendre l'expression du génome au niveau transcriptionnel, ce qui a amené à découvrir la structure des gènes plus en détail, la régulation de l'expression génique, la fonction du produit du gène, ainsi que la dynamique du génome. L'analyse du transcriptome permet aussi de comprendre les réseaux de processus biologiques de régulation et, éventuellement, donner des indications dans le diagnostic des maladies et leur thérapeutique, dans une optique de traitement personnalisé en fonction de chaque couple patient/tumeur (4).

Définition du transcriptome

Le transcriptome est l'ensemble des ARN transcrits par le génome d'un tissu ou d'un type cellulaire à un temps donné, à un stade de développement et/ou sous une certaine condition physiologique (5, 6).

Il était une fois ... L'ARN

Le transcriptome est l'étude des ARN : Acides ribonucléiques nucléiques simples brins. L'ARN n'a pas été séparé de l'ADN jusqu'en 1958, suite à la formulation du dogme central par Francis Crick qui est que : « L'information génétique est transcrite de l'ADN en ARN et transcrit de l'ARN en protéine » (7, 8). En 1961, *Jacob* et *Monod* ont proposé que le gène codant pour une protéine soit transcrit à l'aide du ribosome en ce qu'ils ont appelé l'ARN messenger (ARNm) (9). En 1958, en même temps que le dogme central de la biologie

moléculaire, l'hypothèse d'« adaptateur » a été formulée par *Crick* pour expliquer la synthèse des protéines (7, 10). Dans cette hypothèse, *Crick* prédit que chaque acide aminé est attaché à son propre « adaptateur » qui pourrait tenir sur la matrice de l'ARNm par appariement de bases et ainsi transporter l'acide aminé sur le site spécifique de la matrice d'ARN. Un court ARN stable, l'ARN de transfert (ARNt), a été identifié comme étant « l'adaptateur » prédit (11). Peu après, l'ARN ribosomal (ARNr) impliqué dans la synthèse des protéines a été purifié (4, 12).

En 1977, *Sharp* (13) et *Roberts* (14) ont montré que la séquence d'ARNm des adénovirus présente une distribution discontinue dans le génome. Par conséquent, ils ont d'abord suggéré qu'un gène eucaryote typique se compose d'exons (les séquences codantes pour la protéine) et d'introns (séquences non codantes). Au cours de l'épissage de l'ARN, les introns sont découpés dans les transcrits primaires et dégradés, tandis que les exons sont rassemblés dans différents ARN messagers matures (épissage alternatif ou « splicing »). La découverte de la composition d'un gène (introns et exons) a été une surprise et a révolutionné la compréhension de l'architecture des gènes.

Depuis la fin des années 1970, *Cech* et *Altman* (15, 16) ont révélé que l'ARN pouvait fonctionner comme un catalyseur. En 1982, *Kruger* a mis en avant le concept de « ribozyme », ce qui démontre que l'ARN pourrait agir à la fois en tant que du matériel génétique (comme l'ADN) et comme un catalyseur biologique (comme les enzymes protéiques).

Au début des années 1990, il a été observé indépendamment par un certain nombre de scientifiques que l'ARN inhibait l'expression des gènes chez les plantes et les champignons avec un mécanisme inconnu (17, 18). En 1998, *Fire* et *Mello* (19, 20) ont constaté que des ARN doubles brins (dsARN) pourraient reconnaître des séquences d'ARNm spécifiques, puis conduisent à la dégradation des ARNm cibles : les ARN interférents (ARNi). D'autres études ont montré l'existence de petits ARN (de 21 à 25 nucléotides) responsables d'interférence : les petits ARN interférents (siRNA) (21, 22).

Ces dernières années, les différents types d'ARN augmentent rapidement avec le développement des technologies notamment le NGS (Next Generation Sequencing) (23, 24). De nombreux ARN non codants ont été identifiés et caractérisés fonctionnellement, ce qui a permis l'expansion du monde de la transcriptomique.

La naissance des méthodes d'analyses transcriptomiques

Bien que l'analyse de l'expression du gène commence dans les années 1980 avec le développement du *Northern blot* (25), cette méthode n'est évidemment pas à haut débit. Dans les années 1990, le projet de séquençage automatisé de l'ADN avait comme ambition : d'identifier, caractériser et analyser tous les

gènes (26, 27). Cette approche a révolutionné la biologie, et a permis d'ouvrir la porte à l'approche haut débit avec l'apparition du séquençage des marqueurs de séquences exprimées (EST), et l'accumulation de ces données a permis la création de bases de données dbEST (28-30). L'avancée des technologies à haut débit a rendu possible l'analyse simultanée de nombreux gènes dans les cellules et dans les tissus. L'analyse transcriptomique basée sur la détection à grande échelle des ARN est devenue alors une méthode de choix, principalement en raison du fait que cette méthode permet rapidement d'obtenir une vision globale de l'ensemble des gènes exprimés dans une population de cellules (31-33).

Initialement, les premières analyses transcriptomiques ont été réalisées sur membrane de nylon en utilisant de grandes densités d'ADNc ou de produit de PCR, avec évaluation de la quantité de sondes hybridées sur chaque *spot*. Les « macroarray » sont fabriqués sur des membranes de nylon d'une dizaine de centimètres carrés. Cette approche est la plus ancienne, néanmoins elle est efficace pour tester des centaines ou quelques milliers de gènes, et de mesurer quantitativement et simultanément l'expression des ARN messagers dans un échantillon, un type cellulaire ou tissulaire à un temps donné. La technologie est basée sur l'hybridation d'ARN (d'un tissu, cellule ou autre) à un ensemble de fragments d'ADN qui représentent des gènes cibles disposés sur un support. Les ARN hybridés sont marqués et obtenus par rétrotranscription. Ils constituent un mélange complexe qui contient de nombreuses séquences différentes d'ADN complémentaire en diverses quantités, correspondant aux nombres de copies de l'ARN messenger d'origine extrait de l'échantillon (31, 34-36).

Les principaux défis de cette technologie ont été d'augmenter la sensibilité ainsi que de miniaturiser les macroarrays (37, 38). La plateforme de puce à ADN développée par la firme *Affymetrix* a répondu à cette demande, en utilisant comme technologie la synthèse (réactions photochimiques et technique de masque) de centaines de milliers d'oligonucléotides directement *in situ* sur des puces de silicium de quelques centimètres carrés (39). Ces microarrays de par leur miniaturisation ont été le début d'une grande révolution scientifique avec un grand potentiel d'applications dans divers domaines de la biologie et de la santé (40). Les technologies des microarrays les répandues sont à ce jour celles développées par *Agilent* et *Affymetrix*.

En parallèle au développement de l'étude à haut débit de l'expression des gènes s'est effectué l'évolution du séquençage. Le NGS (Next Generation Sequencing) est basé sur le séquençage parallèle massif (4). Le développement des nanotechnologies a permis de séquencer des centaines de milliers de molécules d'ADN simultanément (23, 41). Le prototype de NGS : MSSP (massive parallel signature sequencing) (41) applique quatre cycles de digestion par enzyme de restriction, et des réactions de ligation pour déterminer la séquence nucléotidique des extrémités de l'ADNc, générant des séquences de 17-20 pb, qui correspondent à l'empreinte de l'ARN correspondant. Le MPSS a permis de générer plus de 100 000 signatures simultanément. Toutefois en raison de la nature des réactions de digestion et de la ligation, une fraction

importante des signatures de séquences obtenues ne sont pas assez longues pour être des empreintes uniques des molécules d'ARN (4).

Pour surmonter les limites de MSSP, d'autres sociétés ont développé leurs propres plateformes telles que : *Illumina, Roche, Thermo-Fisher Scientific*, avec une amélioration considérable sur : le débit, la durée de lecture ainsi que sur la précision de séquençage (4, 23). Une partie, ou la totalité de l'ARN est purifiée, rétrotranscrite en ADNc, puis soumise à un séquençage massif. En analysant des millions à des milliards d'étiquettes de séquences de longueur variables (25-200 pb) après séquençage à haut débit, le transcriptome peut être étudié qualitativement et quantitativement (4, 42).

Afin d'étudier avec précision le transcriptome de tissu biologique complexe, d'un échantillon précieux avec une faible quantité d'ARN extrait, et même la cellule unique (« single cell technology »), des techniques de séquençage à haut débit ont été développées : comme le séquençage direct de l'ARN, ou en développant des méthodes d'amplification de l'ARN (4, 43, 44).

Les différents types d'ARN

Il existe une grande variété d'ARN qui a en plus de leurs rôles structurels. Ils ont aussi un rôle important dans la régulation de nombreux processus cellulaires ; qui a été sous-estimé auparavant. En fonction de leurs produits, les ARN peuvent être divisés en deux classes : les ARN codants pour des protéines et les ARN qui ne codent pas pour des protéines (ARNnc) (45) **Figure 1**.

Les ARN codants

Ce sont les ARN qui codent pour des protéines, ils sont connus aussi sous le nom de : ARN messagers

Les ARN non codants

Les ARN non codants sont tous les ARN qui ne sont pas traduits en protéines fonctionnelles. Sur la base de leurs fonctions, les ARNnc peuvent être divisés en deux catégories : les ARNnc de ménage (*House-keeping*) et les ARNnc régulateurs.

Les ARN non codants de ménage

Ils jouent généralement un rôle structural et catalytique, comme les ARN de transfert, les ARN ribosomiques impliqués dans la traduction, les petits ARN nucléaires, qui sont impliqués dans l'épissage des ARN messagers, les petits ARN nucléolaires impliqués dans l'épissage des ARN ribosomiques. Et enfin les ARN guides (ARNg) impliqués dans l'édition de l'ARN (12, 45).

Les ARN non codants régulateurs

Ils jouent un rôle de régulation dans beaucoup de processus biologiques. Selon la longueur, ils peuvent être divisés en deux groupes : les petits ARNnc régulateurs et les longs ARNnc régulateurs (lncRNA).

Les petits ARN non codants sont composés de 17-35 nucléotides, comprenant les microARN (miARN) les siARN et les ARN interagissant avec Piwi (ARNpi).

Les miARN sont composés de 22 nucléotides, et résultent des pre-miARN contenant des structures en épingle à cheveux. Les épingles à cheveux sont traitées par la RNase III Drosha et Dicer pour former des miARN matures. En s'hybridant à leurs cibles, les miARN inhibent l'expression des gènes en réprimant la traduction ou en favorisant la dégradation de l'ARNm. Les miARN jouent un rôle crucial dans la régulation de nombreux processus biologiques, tels que le développement ou la réponse au stress biologique (46-48).

Les siARN et ARNpi sont de petits ARN produits par différentes voies, qui agissent principalement dans le blocage génique des transposons et des séquences répétitives pour maintenir la stabilité génomique (49, 50)

Les ARN longs non codants (lncRNA) sont des ARN composés d'environ 200 nucléotides, ils sont transcrits par l'ARN polymérase II. Les lncRNA peuvent être antisens, sens, intergénique, bidirectionnel, et des transcrits introniques (51). Ils peuvent réguler l'expression des gènes codants de différentes manières : la régulation transcriptionnelle peut se produire par interaction du lncRNA avec la protéine pour inhiber l'activité des facteurs de transcription ou de l'ARN polymérase II directement, soit indirectement.

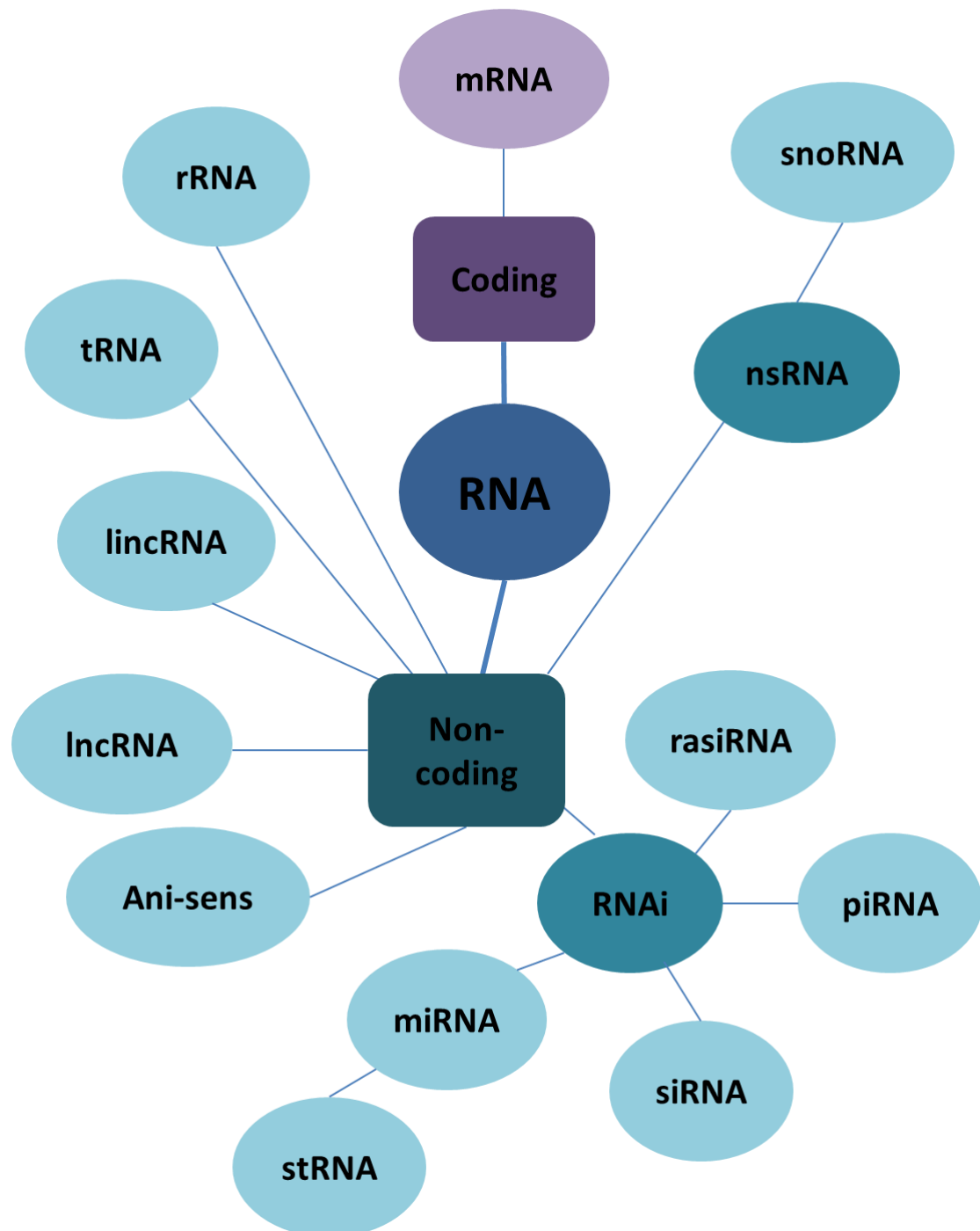


Figure 1 : Les différents types d'ARN

tRNA : transfer RNA, rRNA : ribosomal RNA, mRNA : messenger RNA, snoRNA : Small nucleolar RNA, snRNA : Small nucleolar, lincRNA : long intergenic non-coding RNA, IncRNA : long non coding RNA, RNAi : RNA interference, rasiRNA : Repeat associated small interfering RNA, stRNA : Small temporal RNA, miRNA : micro RNA, siRNA : Small interfering RNA, piRNA : Piwi-interaction RNA

Modifiée de Geospiza, 2009

La quantification des transcrits

Le niveau transcriptionnel du génome peut varier dans les différents tissus, sous des conditions physiologiques ou en réponse à des stimuli environnementaux. Le premier objectif des analyses transcriptomiques a été de définir les gènes exprimés de manière différentielle d'une condition par rapport à une autre (ou plus). Les méthodes d'isolation de séquences spécifiques telles que l'EST et le SAGE, les hybridations sur des puces, et le séquençage à haut débit, sont des technologies qui ont été développées afin de définir les gènes différentiellement exprimés entre les conditions. De nombreux gènes clés de divers processus de développement, physiologiques ou pathologiques ont été identifiés par ces moyens (42, 52)

Le métabolisme de l'ARN

Un gène est une région génomique distincte dont la transcription est régulée par un ou plusieurs promoteurs et des éléments régulateurs distaux ; qui contiennent les informations pour la synthèse des protéines fonctionnelles ou des ARN non codants, associés par le partage d'une partie de l'information génétique au niveau des produits finaux (protéines et ARN). Cette définition est spécifiquement conçue pour les gènes chromosomiques eucaryotes (53). Un gène est généralement défini comme une unité génétique. Quand on parle de la transcription, nous désignons également le gène comme une unité de transcription. Du gène à l'ARN fonctionnellement mature, plusieurs étapes de transcription et de traitement post-transcriptionnel ont lieu dans les cellules (54). Une procédure de transcription se compose de : l'initiation de la transcription (la formation du complexe d'initiation de la transcription), l'élongation, la pause (complexes de transcription arrêtent juste en aval du site d'initiation de la transcription) et la terminaison (12, 54). La combinaison de la technologie traditionnelle biochimique et biologie moléculaire avec le NGS, les événements de transcription ont été observés globalement en débit plus élevé et à niveau plus précis (55).

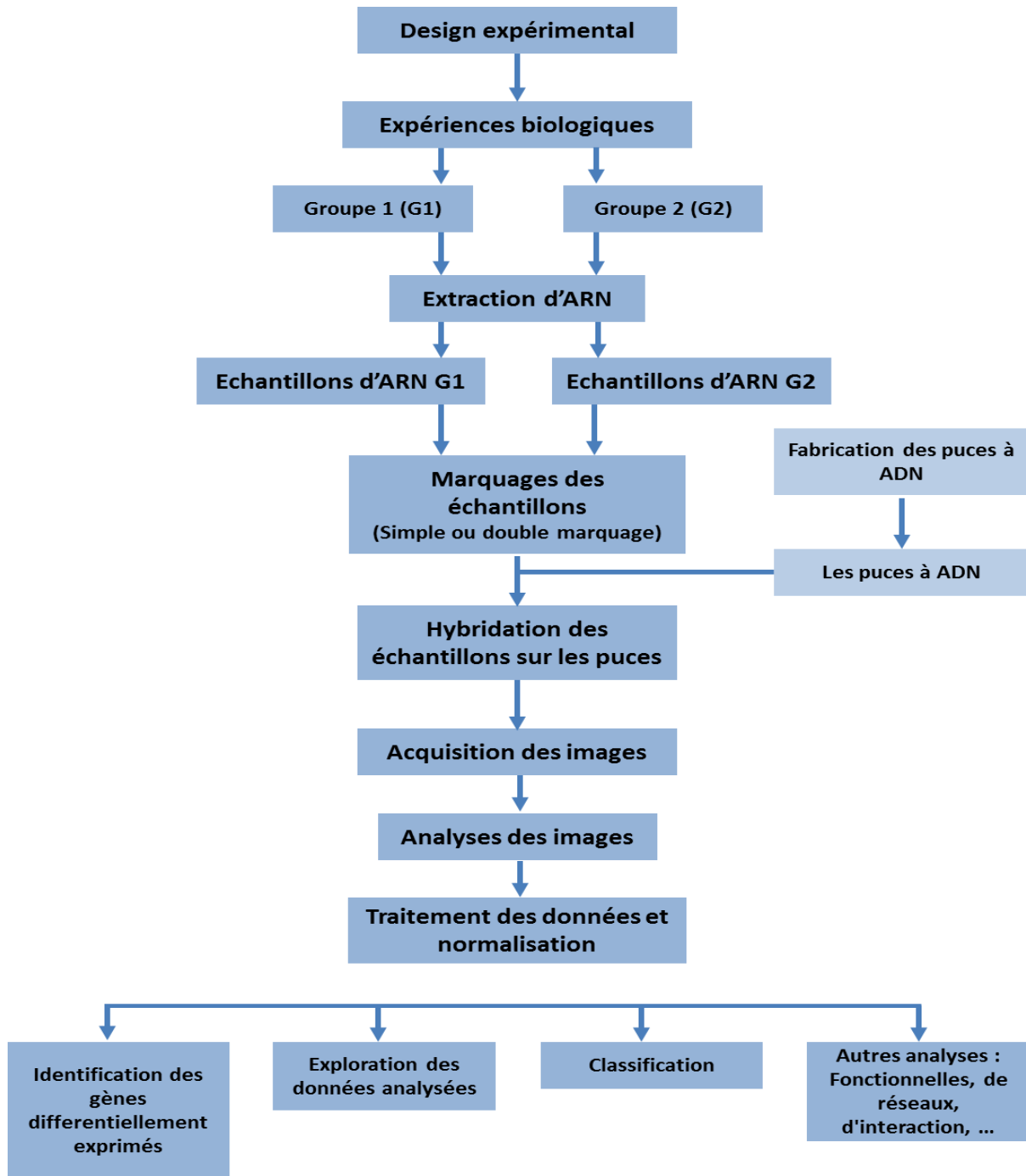
Les puces à ADN

Définition et principe

Les puces à ADN ou microarrays sont une méthode basée sur l'hybridation d'acides nucléiques sur un support. Les ADN complémentaires sont marqués par fluorescence, incubés avec des sondes d'oligonucléotides sur la puce, puis l'abondance de l'ARN est déterminée en mesurant l'intensité de fluorescence (52, 56). Les microarrays ont été développés pour l'étude de l'expression de milliers de gènes simultanément. Différents types de puces à ADN ont été développés. La détection des produits de la

transcription des gènes par hybridation est le principe sous-jacent à toutes ces approches (57). Un grand nombre de séquences (sondes : oligonucléotides) sont synthétisées sur le support, chacune correspond à une partie spécifique du transcrit. Elles sont fixées à un support solide, généralement du verre. De L'ADNc ou de l'ARNc est synthétisé et marqué à partir de l'ARN d'une expérience ou d'échantillons contrôles et d'échantillons test. Il est ensuite hybridé avec des sondes complémentaires présentes sur le support. Les différences d'expression des gènes sont calculées sur la base de la quantification et de l'analyse statistique du signal fluorescent émis par l'ADNc ou ARNc marqué (58), **Figure 2**.

Les puces à ADN permettent l'analyse simultanée du niveau d'expression de l'ensemble des gènes humains connus à ce jour. Elles ont comme objectifs la description moléculaire de l'évaluation des maladies et la réponse aux traitements, l'identification de cibles thérapeutiques ou encore déterminer des biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic (59).



Figures 2 : Pipeline classique d'une expérience de puces à ADN.

Après la réalisation d'un plan expérimental biologique, les échantillons ou tissus (issus d'un modèle animal, d'un patient ou autres) sont récupérés. Les ARN sont alors extraits, marqués (simple — Cy3- ou double marquage — Cy3/Cy5-) puis hybridés sur les puces à ADN. Après des étapes de lavages, les puces sont alors scannées, les images acquises, les données brutes extraites. Les données brutes sont explorées, celles de mauvaise qualité sont mises de côté et le reste des données est normalisé. Selon l'objectif de chaque étude, les gènes différentiellement exprimés sont identifiés entre les groupes d'étude pour classer les échantillons selon leurs sous-types (maladies, traitement, ou autres), réaliser des analyses fonctionnelles (enrichissement en annotations fonctionnelles, études des réseaux, des interactions et autres...). Pour chaque étape de ce pipeline, des normes sont respectées (sur la base d'un accord international le : MIAME – Brazma et coll., 2001).

Le simple marquage ou le double marquage

Deux stratégies d'hybridation de puces à ADN peuvent être distinguées : le simple marquage — **Figure 3** — (une couleur) et le double marquage — **Figure 4** — (deux couleurs). Les microarrays deux couleurs (également appelées les microarrays bicolores ou microarrays doubles étiquettes) permettant à deux échantillons biologiques différents d'être hybridés sur la même zone d'hybridation sur le microarray, deux fluorochromes sont utilisés généralement pour le marquage des échantillons : la cyanine-Cy3, émettant à 570 nm, et la cyanine-Cy5, émettant à 670 nm. Tandis que dans les microarrays « simple marquage », un seul fluorochrome est employé. Habituellement, la Cy3 est utilisée pour marquer un seul échantillon par zone d'hybridation (array) (60).

Une approche deux couleurs a certains avantages par rapport au simple marquage. En effet, elle élimine en partie la variabilité provenant des différences entre les zones d'hybridation (58), comme la qualité de l'hybridation et les variations de la taille ou de la qualité des spots (61). En revanche, les différences d'émission des deux fluorochromes (la cyanine-5 fluoresce plus que la cyanine 3) et la différence d'efficacité d'incorporation (la cyanine-3 s'incorpore mieux que la cyanine-5) introduisent un biais de fluorescence (60).

En résumé, les deux approches présentent des avantages et des inconvénients. Cependant, beaucoup d'études ont comparé les deux méthodes. Celles-ci sont comparables en matière de qualité des données ainsi que de la précision de la mesure des rapports d'expression. Par conséquent, l'utilisation d'un ou deux fluorochromes est principalement déterminée par le coût, les considérations de conception expérimentale et les préférences personnelles (60, 62, 63).

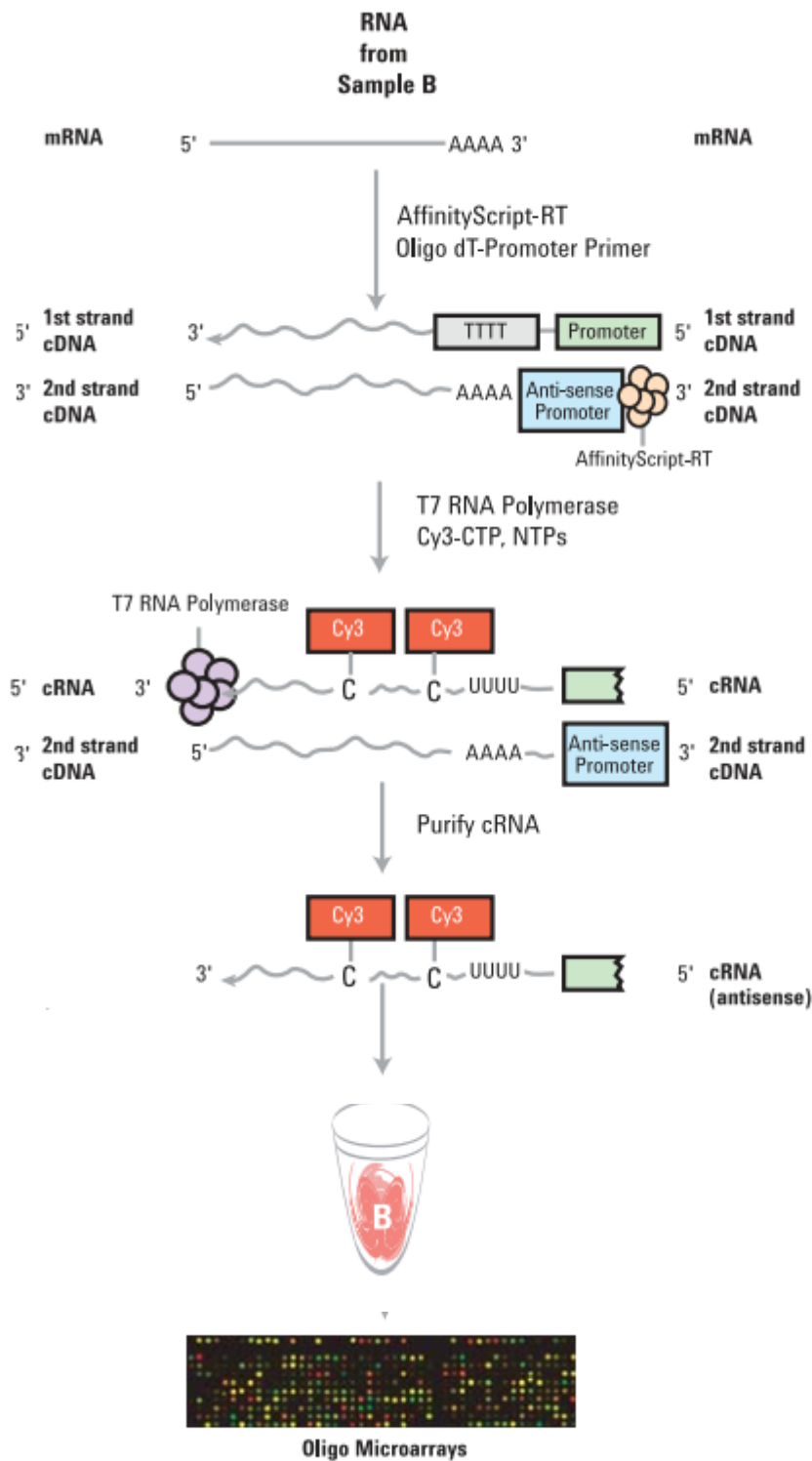
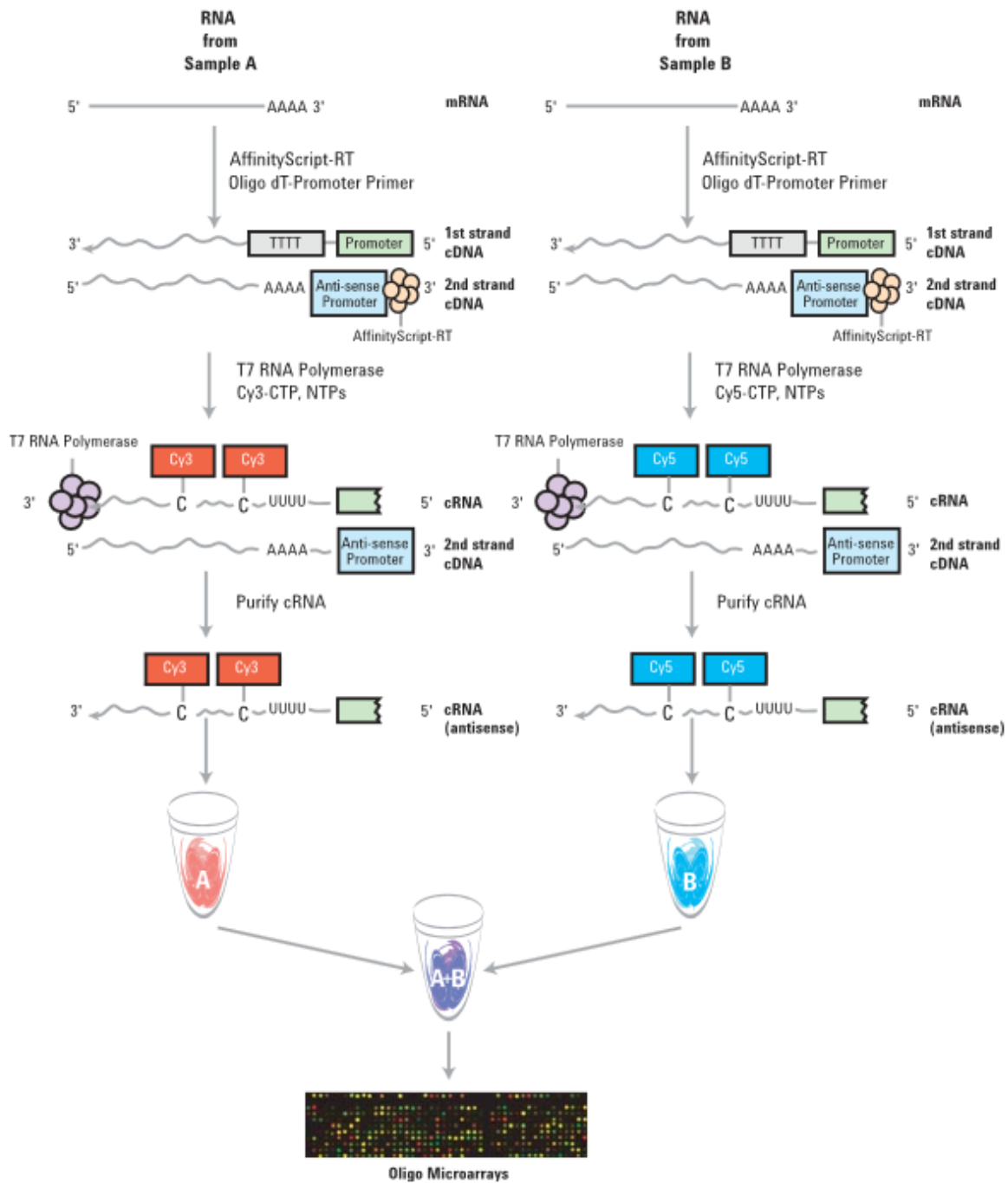


Figure 3 : Schéma récapitulatif du protocole simple marquage d'Agilent

Les ARNm sont retrotranscrits en ADNc, l'ADNc est alors marqué par la Cyanine 3 et transformé en ARNc, puis hybridé sur la puce.

(www.agilent.com)

Amplified cRNA



Figures 4 : Schéma récapitulatif du protocole double marquage d'Agilent

Les ARNm sont retran­scrits en ADNc, l'ADNc d'un échantillon est marqué par la Cyanine 3 et le deuxième par la Cyanine 5 et transformé en ARNc. Les deux échantillons sont mélangés puis hybridés sur la puce.

(www.agilent.com)

La normalisation des données brutes

L'étape de normalisation permet de minorer les variations artéfactuelles inter et intra-puces (64). Il existe différents types de normalisations : la normalisation LOWESS, la régression linéaire, la normalisation par la médiane et autres (65, 66). L'une des normalisations les plus utilisées et la normalisation par les quantiles

La normalisation par les quantiles

La normalisation par les quantiles est l'une des méthodes de normalisation la plus utilisée. L'objectif de cette méthode est de rendre similaires les distributions de l'intensité des puces. Dans un premier temps, les valeurs sont transformées \log_2 afin de rendre les données symétriques et d'obtenir une distribution proche de la loi Normale, qui est un critère indispensable pour un certain nombre de tests statistiques. Pour chaque échantillon, les valeurs d'intensités sont triées, les gènes (lignes) réorganisés, la médiane est calculée par ligne. Les intensités des gènes sont ensuite remplacées par la médiane en gardant le rang, puis les positions initiales sont retrouvées (67).

Les analyses statistiques

Les méthodes statistiques d'analyse de données de puces à ADN peuvent être classées en deux grands groupes : les méthodes qui permettent d'identifier des gènes exprimés de manière différentielle, et les méthodes qui classent la dépendance fonctionnelle des gènes. L'objectif de la première méthode consiste à identifier des gènes qui sont exprimés à différents niveaux dans des conditions différentes en utilisant des tests statistiques classiques (t-test, test ANOVA, Mann-Whitney...). La deuxième méthode permet d'identifier des groupes communs d'expression de gènes, pour classer les nouvelles pathologies, de nouveau sous-type de pathologie, et autres (68).

Le SAM (*Significance Analysis of Microarrays*)

L'analyse SAM permet de mettre en évidence les gènes dont l'expression varie d'une manière significative, en appliquant à chaque gène un test t spécifique. Pour chaque gène, un score est assigné sur la base de sa variation d'expression par rapport à son écart-type pour des mesures répétées pour le même gène. Les gènes avec des scores supérieurs à un seuil sont considérés comme potentiellement significatifs. Le pourcentage de ces gènes identifiés par le hasard est le taux de faux positifs (*False Discovery Rate* – FDR). Pour estimer le FDR, des gènes avec des expressions aléatoires sont identifiés en utilisant les permutations. Le seuil peut être ajusté pour identifier des ensembles plus ou moins grands de gènes et le FDR est alors calculé pour chaque ensemble de gènes (69).

Cette approche est basée sur l'analyse des fluctuations aléatoires des données. D'une manière générale, le rapport « signal sur bruit de fond » diminue avec la diminution de l'expression du gène. Pour un niveau donné d'expression, les fluctuations sont gène spécifique. Pour tenir compte des fluctuations spécifiques

du gène, une statistique basée sur le ratio du changement dans l'expression du gène sur l'écart-type a été définie. La « différence relative » $d(i)$ de l'expression génique est donnée par la formule suivante :

$$d(i) = \frac{\bar{x} I (i) - \bar{x} U (i)}{s(i) + s0}$$

Ou : $\bar{x} I (i)$ et $\bar{x} U (i)$ sont définis comme le niveau d'expression du gène (i) dans l'état I et U respectivement. La dispersion spécifique du gène $s(i)$ est la standard déviation des mesures d'expression répétées :

$$s(i) = \sqrt{a \left\{ \sum_m [x_m (i) - \bar{x}_I(i)]^2 + \sum_m [x_m (i) - \bar{x}_U(i)]^2 \right\}}$$

Ou : \sum_m et \sum_n sont les sommes d'expression dans l'état I et U , respectivement.

$a = (1/n_1 + 1/n_2) / (n_1 + n_2 - 2)$, n_1 et n_2 sont le nombre de mesure dans l'état I et U .

L'analyse LIMMA (*Linear Models for Microarray Data*)

Limma est un package pour l'analyse différentielle des données d'expression issues d'expériences de microarrays. Limma utilise des modèles linéaires pour analyser les microarrays. Le principe général de LIMMA est d'ajuster un modèle linéaire pour les données d'expression de chaque gène (70).

Une fois les puces scannées et les images analysées, des fichiers d'intensités sont alors générés (un fichier pour chaque *array*). Chaque *array* peut être composé d'ARN simple marquage, ou composé d'ARN marqués par deux fluorochromes différents (double marquage). Les données d'expression issues d'expériences utilisant un simple marquage peuvent être représentées dans une matrice dont les lignes correspondent aux sondes (gènes) et les colonnes les *arrays* (échantillons). L'approche requiert deux matrices pour l'analyse. La première est la matrice du modèle (*design*) qui spécifie la représentation des différentes cibles d'ARN qui ont été hybridées sur la puce. La seconde est la matrice de contraste (*contrast matrix*), qui permet aux coefficients définis par la matrice *design* d'être combinés avec la deuxième matrice. Chaque contraste correspond à une comparaison d'intérêt entre les cibles d'ARN. La première étape de l'analyse consiste à ajuster un modèle linéaire en utilisant la fonction *lmFit*, qui modélise la partie systématique des données. Chaque ligne de la matrice *design* correspond à une *array* (échantillon) de l'expérience et chaque colonne correspond à un coefficient. En pratique, on peut être intéressé par plus ou moins de comparaison entre les échantillons qu'il y a de coefficient. L'étape suivante est l'utilisation de la fonction *contrast.fit* qui permet aux coefficients ajustés à être comparés d'autant de façon qu'il y ait de question biologique dont il faut répondre.

Mathématiquement, on suppose un modèle linéaire : $E[y_j] = X\alpha_j$ ou y_j contient les données d'expression du gène j , X est la matrice de *design*, et α_j est le vecteur des coefficients. Là y_j^T est la j unième ligne de la

matrice d'expression et contient soit *log-ratios* ou *log-intensités*. Les contrastes d'intérêt sont donnés par : $\beta_j = C^T \alpha_j$ ou C est la matrice de contraste. Les coefficients du modèle ajusté produit par la fonction *lmFit* contient des valeurs estimées pour α_j . Après avoir appliqué la fonction *contrasts.fit*, la composante des coefficients contient alors les valeurs estimées pour β_j (70).

L'analyse de variance ANOVA (*analysis of variance*)

L'interprétation biologique des données d'expression de gènes est difficile, car l'information peut être masquée par l'effet des facteurs expérimentaux. L'analyse de variance est l'une des méthodes statistiques les plus populaires des analyses de puce à ADN qui tient en compte l'effet des facteurs sur l'expression des gènes. L'utilisation de l'ANOVA pour analyser des données de microarrays a été proposée par Ker et coll. (71) Le modèle de l'ANOVA est appliqué aux données transformées en *log*. L'analyse de variance permet de tenir en compte toutes les sources de variation dans les données qui sont attribuées à des facteurs autres que l'expression des gènes. Elle permet de combiner les informations provenant de tableaux différents en une seule analyse (72). Le modèle de l'ANOVA est donné par la formule suivante :

$$y = \mu + \beta_x X + \beta_z Z + \dots + \beta_n N + \varepsilon$$

Ou :

y : La variable expliquée

μ : La moyenne globale

$\beta_x, \beta_z, \beta_n$: Les coefficients du modèle

X, Z, N : Les variables quantitatives

$\beta_x X, \beta_z Z, \beta_n N$: L'effet des variables quantitatives

ε : L'erreur

Le test t

Les valeurs t sont calculées pour chaque gène, et les p-valeurs sont calculées soit à partir de la distribution t théorique, ou à partir des permutations des données pour chaque gène. Si le niveau d'expression moyen d'un gène est significativement différentiel entre les deux groupes (par exemple) est déterminé par comparaison directe de la p-valeur du gène de la p-valeur seuil choisi ou en ajustant les p-valeurs en utilisant une correction pour les tests multiples et ainsi fixer un seuil de FDR.

Le test t apparié équivaut à une « *two way ANOVA* » dans laquelle les variables indépendantes sont la sonde et de l'échantillon (73). Le test t apparié suppose que le premier échantillon de référence (ou de la condition 1) sera comparé avec le premier échantillon de l'essai (ou de la condition 2), et ainsi de suite (72).

La formule du test t est donnée dans la formule suivante (74) :

$$t = \frac{\bar{x} - \mu_0}{s/\sqrt{n}}$$

Avec :

$$\bar{x} = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n x_i$$

$$s = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$$

Ou :

\bar{x} : La moyenne

s: L'écart-type empirique

μ_0 : La moyenne théorique

Les techniques d'étude du transcriptome ont évolué depuis près de 20 ans, passant par les méthodes d'isolation de séquences spécifiques, les puces à ADN, le RNA-seq et le séquençage de la cellule unique. Les analyses transcriptomiques deviennent alors moins coûteuses, à plus haut débit, avec une meilleure sensibilité et en utilisant moins d'ARN de départ (23, 24).

La variabilité des résultats et les difficultés d'analyse :

L'analyse et l'interprétation des données à haut débit issues d'expériences de microarrays sont plus compliquées que ce qui était prévu à l'origine (75, 76). De plus, les incertitudes associées à la validité et la fiabilité des résultats ont été mises en évidence par des comparaisons entre différentes méthodologies. Les conclusions doivent alors être tirées avec prudence (75, 77). Des études ont relevé des incohérences entre les données provenant de différentes plateformes expérimentales basées sur l'utilisation *in situ* de séquences nucléotidiques courtes *versus* des séquences nucléotidiques plus longues (78). Plus surprenant, des incohérences ont été relevées entre des laboratoires utilisant la même plateforme expérimentale (79). De plus, un jeu de données généré sur une plateforme peut être interprété différemment en utilisant des méthodologies de traitement et d'analyses différentes, menant à des conclusions divergentes (75, 80). Il existe beaucoup d'explications potentielles telles que : la différence des types et de la composition des sondes, l'existence de différents protocoles de dépôts, de marquage et d'hybridation (81). Par conséquent, il est essentiel de valider les résultats obtenus par des technologies telles que : le *Northern blot*, le *Western blot* ou la RT-q-PCR avant de tirer des conclusions (82).

Il existe un manque des normes rigoureuses en matière de collecte de données, d'analyses et de validations (3). La conception expérimentale d'un projet utilisant une technologie comme les microarrays est très importante. La qualité du matériel de départ est cruciale, les échantillons (cellules, tissus...) doivent être traités de la manière la plus reproductible possible. Ceci est dans le but d'éviter l'introduction de variations

artéfactuelles dans l'expression génique des échantillons (211). La plupart des échantillons de tissus humains sont un mélange de types de cellules. Par conséquent, des variations dans les profils d'expression génique sont observées, lors de la comparaison de deux échantillons de biopsie par exemple (en raison de la présence de différents types cellulaires avec une quantité différente dans chaque échantillon). Des méthodes telles que : la microdissection par capture laser, le tri des cellules par cytométrie peuvent être utilisées pour pallier au problème d'hétérogénéité des échantillons. La non-standardisation des données a contribué à la variabilité des résultats issus d'expériences de puce à ADN. De plus, il est très difficile de faire une évaluation critique des différentes plateformes et des différentes méthodes d'analyses de l'ensemble des jeux de données publiés. Le guide *MIAME (The Minimum Information About Microarray Experiments)* décrit des normes requises pour assurer l'interprétation des données d'expression (75, 83).

Avec l'apparition du séquençage à haut débit, la bioinformatique est devenue une partie très importante de l'approche transcriptomique. Le défi auquel doit répondre l'analyse bioinformatique est aussi grand que la procédure expérimentale qui inclut la purification de l'ARN, la préparation des libraires et le séquençage proprement dit. La difficulté d'analyse provient non seulement des quantités massives de données, des erreurs introduites par des expériences de séquençage, mais aussi de la complexité du transcriptome (4). De plus, aucune standardisation dans l'analyse de données de séquençage n'a été établie, chaque utilisateur choisit le programme et les critères et paramètres de chaque étape de l'analyse.

En résumé, l'étude transcriptomique est confrontée à plusieurs défis. Le séquençage de l'ARN doit être amélioré pour surmonter les biais introduits par la préparation des librairies ou par l'amplification de l'ARN. La conception expérimentale et l'analyse bioinformatique doivent encore être optimisées pour caractériser efficacement et avec précision le transcriptome, afin de pouvoir d'acquérir plus d'impact sur la biologie moléculaire et les applications cliniques (4).

Apport de l'analyse transcriptomique dans les hémopathies malignes :

Les analyses à haut débit de l'expression des gènes ont plusieurs avantages dans certaines hémopathies malignes (comme les leucémies) par rapport à d'autres tumeurs. Les échantillons sanguins sont plus faciles à obtenir par rapport à des biopsies de tumeurs solides par exemple. La comparaison d'échantillons de patients atteints de LAM (leucémie aiguë myéloïde) et de LAL (leucémie aiguë lymphoblastique) en utilisant les microarrays a été une analyse précoce pour la classification potentielle des hémopathies basée sur la génomique (84, 85). D'autres études sur des échantillons de patients atteints de leucémie aiguë avec une translocation impliquant le gène MLL (mixed-lineage leukemia) ont été réalisées. Le profil d'expression des échantillons MLL était compatible avec des cellules progénitrices lymphoïdes précoces, suggérant alors un

arrêt de la maturation à un stade précoce dans l'hématopoïèse. Ce profil spécifique inclut une surexpression du gène FLT3.

L'étude d'expression génique sur des groupes hétérogènes d'échantillons de patients atteints de LAM avec des caryotypes aberrants complexes a montré une surexpression des gènes ayant une fonction de réparation de l'ADN tel que : RAD21 (86, 87). L'étude d'expression génique a permis aussi d'identifier de nouveaux biomarqueurs pronostiques, en particulier dans le groupe hétérogène des LAM de caryotype normal. Bullanger et coll. (88) ont été en mesure de subdiviser ce groupe de patients en deux groupes qui ont été caractérisés par la surexpression de plusieurs facteurs de transcription tels que GATA2 ou l'implication des gènes responsables de la différenciation des leucocytes et de la réponse immune. Cette signature pronostique a été validée de façon indépendante par Radmacher et coll. (86, 89).

Depuis l'introduction des études de profil d'expression génique dans la recherche en particulier dans le cas de la leucémie, la majorité des sous-groupes les plus génétiquement et immunologiquement définis chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde et de leucémie aiguë lymphoïdes ont été caractérisés par des signatures transcriptomiques. Ces résultats ont été validés par des groupes d'étude indépendants (84, 90). Les analyses de profil d'expression ont été en mesure de définir de nouveaux paramètres pronostiques comme l'évolution tumorale ou prédire les complications sous-jacentes. Ils permettent aussi d'adapter le traitement selon le profil génique. Dans les LAM, il a été possible de prédire la réponse au tipifarnib inhibiteur de la farnésyl par exemple sur la base du rapport d'expression des gènes RASGRP1 et APTX (91, 92). Chez les patients avec BCR-ABL1 positif, Hofmann et coll. ont été en mesure de prédire la sensibilité à l'inhibition de la tyrosine kinase avec l'imatinib sur la base de l'expression de 95 gènes. Un panel de 56 gènes fortement différenciellement exprimés a été associé au développement d'une résistance secondaire à l'imatinib (93). Holleman et coll. ont développé un score sur la base de l'expression des gènes indiquant les profils de résistance individuels pour les stéroïdes, la vincristine, l'asparaginase et la daunorubicine dans chez les enfants atteints de LAL (86, 94).

La classification des lymphomes B a été confrontée à plusieurs problèmes. Le lymphome B diffus à grandes cellules (LBDGC) présente une évolution clinique variable, corrélée à la diversité morphologique, cytogénétique et immunologique. L'analyse de l'expression des gènes a permis de mettre en évidence trois nouvelles sous-classes pronostiques pertinentes : GC (germinal centre b cell), ABC (activated B cell) et de PM (primary mediastinal B cell). Deux évènements génétiques ont été mis en évidence dans le sous-groupe GC à savoir : la translocation de BCL-2 et une amplification de c-rel. Les patients classés dans ce dernier ont un taux de survie le plus élevé à 5 ans. De même une signature de 17 gènes a été identifiée comme étant

prédictive de la survie globale des patients atteints de LBDGC après chimiothérapie (95, 96). Actuellement les groupes ABC et PM sont regroupé dans la sous-classe : non-GC.

Les puces à ADN ont été utilisées pour étudier les cibles de c-myc, un facteur de transcription et oncogène cellulaire qui est important dans de nombreuses tumeurs malignes. C-myc est impliqué dans une translocation chromosomique dans le lymphome de *Burkitt*. Les cibles génomiques de c-myc telles que : les gènes impliqués dans la croissance cellulaire, le cycle cellulaire, l'adhérence et l'organisation du cytosquelette, illustrent les multiples effets de l'activation de c-myc (97, 98).

D'autres études ont mis en évidence les cibles en aval du répresseur transcriptionnel BCL-6, qui est transloqué dans de nombreux lymphomes (99). Aussi, il a été montré que le répresseur transcriptionnel Blimp-1 est impliqué dans la différenciation plasmocytaire (100).

En conclusion, l'excitation initiale qui entourait l'analyse transcriptomique utilisant les microarrays a cédé place au sentiment que les attentes ont dépassé la réalité. Beaucoup de difficultés ont été rencontrées dans l'application de la technologie pour obtenir des résultats reproductibles ainsi que dans le choix de l'analyse à effectuer. De plus, ces études suggèrent que le taux d'ARN messager ne reflète pas toujours le niveau protéique. Des exemples de validation indépendante sont nécessaires en utilisant d'autres méthodes ou en répliquant les résultats dans des cohortes indépendantes avant l'introduction des ensembles de gènes identifiés comme biomarqueurs pronostiques en clinique, ou avant de proposer une nouvelle classification d'un type (ou sous-type) d'hémopathie maligne.

Introduction du travail de thèse et objectifs

La rechute et les complications dues à une myélosuppression dans le cadre de l'autogreffe, le dysfonctionnement de l'immunité innée ainsi que la mise en évidence de la classification moléculaire des hémopathies sont des problématiques courantes en oncohématologie.

Durant ma thèse, je me suis intéressée à ces différentes problématiques en utilisant une approche transcriptomique. L'étude de l'immunité innée et la classification des hémopathies en étudiant en particulier deux hémopathies malignes qui sont : le lymphome B à grandes cellules liés à l'infection au VIH et la leucémie aiguë myéloïde. L'effet et la rechute suite au conditionnement chimiothérapeutique : le melphalan dans le cadre de l'intensification avant autogreffe, et enfin, je me suis intéressée à la complication redoutée chez les patients en aplasie profonde : le sepsis.

Dans la première partie de mon travail, nous avons étudié les cellules natural killer (Nk) dans la leucémie aiguë myéloïde (LAM) dans le but de comparer la signature transcriptomique des cellules natural killer de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde à des cellules natural killer de donneurs sains, ainsi que d'identifier des facteurs de transcription potentiels ou des voies pouvant être impliquées dans la régulation des NCR. Les chimiothérapies permettent une rémission complète dans plus de 50 % des patients atteints de LAM, mais les rechutes sont fréquentes. Ceci suggère que les cellules leucémiques résiduelles peuvent échapper à la chimiothérapie et au système immunitaire. Les cellules Nk issues de patients atteints de LAM expriment moins les récepteurs activateurs NCR (natural cytotoxicity activating receptors) en comparaison avec les sujets sains. Les gènes codants pour NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 et NCR3/NKp30 sont situés à différents loci, sur deux différents chromosomes. Cependant, leur expression est étroitement coordonnée. La plupart des Nk, expriment les NCR soit fortement (NCR^{bright}) soit faiblement (NCR^{dull}), ce qui suggère l'existence d'un facteur de régulation commun aux trois récepteurs. Afin de trouver le/les facteur(s) de transcription impliqué(s) dans la régulation des NCR, nous avons comparé la signature transcriptomique des cellules NK issues de patients atteints de LAM avec la signature transcriptomique des cellules Nk issues de donneurs sains.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés au sepsis et au syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS). L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (auto-CSH) est un bon modèle pour étudier ces problématiques. Brièvement, l'auto-CSH consiste à collecter par cytophérèse des cellules souches hématopoïétiques suite à un traitement de mobilisation, puis les cellules sont congelées et réservées au patient. Lorsque le patient est en rémission complète ou partielle

de sa maladie, ce dernier reçoit une chimiothérapie de conditionnement à haute dose. Le conditionnement à visée antitumorale déclenche chez le patient un orage cytokinique responsable d'une inflammation. Après la fin de la chimiothérapie, le greffon est décongelé puis infusé au patient. La neutropénie débute environ quatre jours post autogreffe et dure environ 10 jours, temps nécessaire au greffon pour devenir fonctionnel, durant cette neutropénie, 80 % des patients sont fébriles, et un certain nombre développe une infection. Les patients neutropéniques sont sujets à des sepsis à la fois plus fréquents et plus sévères que les autres patients, pouvant aller jusqu'à mettre en jeu le pronostic vital du patient. L'objectif de cette étude a été d'identifier une signature transcriptomique prédictive de la survenue du sepsis/SIRS dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques dans le but d'ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la prophylaxie antibiotique personnalisée et adaptée au profil de risque spécifique de chaque patient.

Dans la troisième partie de ma thèse, j'ai réalisé une étude transcriptomique visant à mettre en évidence l'effet de la chimiothérapie de conditionnement ainsi que d'identifier un marqueur potentiel de rechute chez les patients autogreffés atteints de myélome.

Pour la dernière partie, notre but a été de mettre en évidence des profils géniques permettant de définir des sous-types au sein des lymphomes B diffus à grandes cellules (LBDGC) liés à l'infection au VIH, de façon parallèle aux résultats obtenus dans le cadre du sujet immunocompétent. Aussi de définir la pathophysiologie des différents sous-types et de faire ressortir les voies moléculaires dérégulées qui peuvent avoir une valeur pronostic. Les traitements des lymphomes non hodgkinien (LNH) liés à l'infection au VIH sont calqués sur les patients non immunodéprimés. Les analyses transcriptomiques ont permis des avancées pathophysiologie et thérapeutique concernant les traitements des LNH du patient immunocompétent. Au sein des LBDGC, trois sous-types ont été définis un profil GC (germinal cell) un profil ABC (activated B cell) et un profil PMBL (primary B cell mediastinal lymphoma). Ces analyses ont défini des voies d'activation particulières comme une amplification de REL, les translocations de BCL-2, d'hypermutations des loci des immunoglobulines pour les profils GC, et d'activation de la voie NF- κ B pour les profils ABC. L'objectif de cette étude est donc d'analyser le profil d'expression génique des LBDGC-VIH afin de vérifier l'existence des sous-types décrits chez les patients immunocompétents ou de définir de nouveaux profils.

Chapitre 1 :

**L'étude des cellules *Naturel*
killer chez les patients atteints
de leucémie aiguë myéloïde : de
l'étude phénotypique à
l'analyse transcriptomique**

L'étude des cellules *naturel killer* chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde : de l'étude phénotypique à l'analyse transcriptomique

Introduction et justificatifs du travail

La leucémie myéloïde aiguë (LAM) est caractérisée par une prolifération de leucocytes immatures et anormaux qui entravent l'hématopoïèse normale. Bien que les patients soient souvent en rémission complète après la chimiothérapie, la rechute est fréquemment constatée (101-103). Ceci suggère un échappement des cellules leucémiques résiduelles à la chimiothérapie et à l'immunité innée, qui joue un rôle central dans la réponse antitumorale (104-106).

Les *Natural Killer* sont des effecteurs centraux de l'immunité innée. Dans des conditions physiologiques normales, les cellules dites « normales » sont protégées de la lyse cellulaire médiée par les cellules NK avec l'expression des molécules CMH de classe I (103, 107, 108).

Les NK tuent les cellules tumorales grâce à des récepteurs activateurs qui sont les NCR (*natural cytotoxicity receptors*) : NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 et NCR3/NKp30. Le déficit de fonctions des NK a été décrit dans les hémopathies malignes, y compris dans les LAM (109-113). Plus de 80 % des cellules NK issues de donneurs sains expriment fortement les NCR (NCR^{bright}), quand plus de 80 % des patients LAM expriment faiblement les NCR (NCR^{dull}). L'effet antitumoral de l'expression des NCR est d'autant plus robuste, que les patients présentant un phénotype NCR^{bright} ont un meilleur pronostic que les patients NCR^{dull}. Deux études ont mis en évidence la corrélation entre l'expression des NCR^{bright} et le bon devenir des patients atteints de LAM (114, 115). De plus, le traitement par l'IL-2 + Ceplene © (histamine dichlorhydrate) dans le cas des LAM en consolidation, restaure l'expression normale des NCRs (en particulier l'expression de NCR1/NKp46), et améliore la survie sans progression chez les patients atteints de LAM (109, 111, 116, 117). Les gènes codants pour NCR1/NKp46, NCR2/NKp44 et NCR3/NKp30 sont situés dans des loci différents, et répartis sur deux chromosomes, cependant, leur expression est étroitement coordonnée. Les cellules NK expriment fortement les trois NCR (NCR^{bright}) ou faiblement les trois NCR (NCR^{dull}), suggérant l'existence d'un/des facteur(s) de régulation (positive ou négative) pour les trois NCR.

Pour répondre à cette question, une analyse *in silico* pour l'identification de sites putatifs de fixations de facteurs de transcription a été réalisée dans les promoteurs des NCR ; dans le but de mettre en évidence le régulateur commun capable d'expliquer la coordination de l'expression des trois NCR. Sur la base des

travaux menaient par Ramirez et coll. (118) ; le facteur de transcription ETS-1 serait un candidat potentiel capable à réguler l'expression des NCR. De plus, afin de trouver des facteurs de transcriptions potentiels ou des voies pouvant être impliquées dans la régulation des NCR chez les patients atteints de LAM, la signature transcriptomique des cellules NK de patients atteints de LAM a été comparée à celle de donneurs sains.

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^{high}) or low levels (NCR^{low}) 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
afриди@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 isotypic 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 % ± 2.19 in AML patients versus 7.6 % ± 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 % ± 3.18–46.8 % ± 23.4 ($p < 0.01$). To reach almost the same enrichment values in AML patients (33.45 % ± 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-

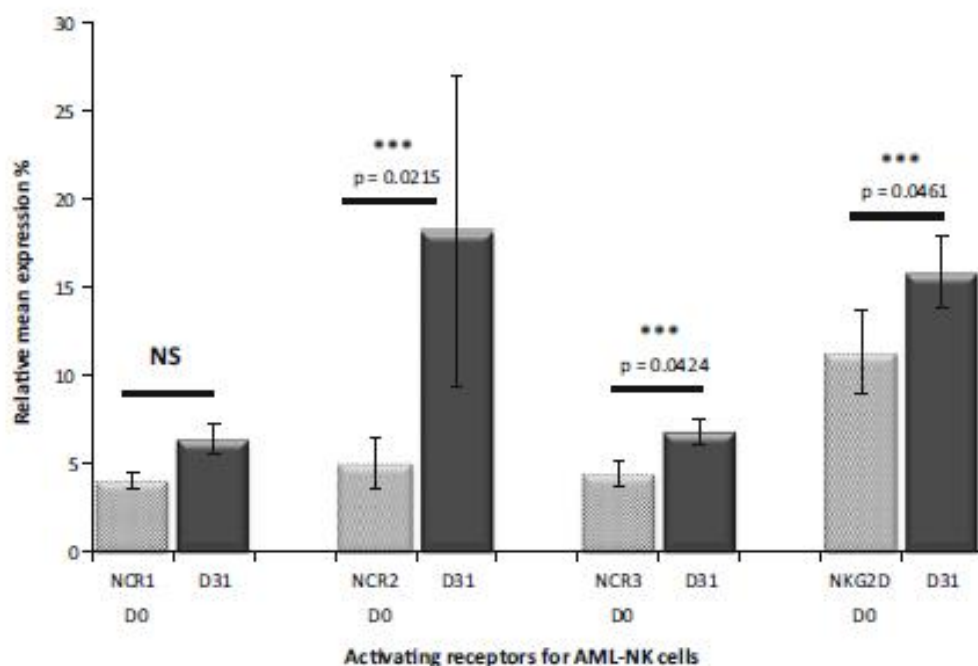


Fig. 1 NCR expression of AML-NK cells after in vitro expansion. Evolution of activating receptors (NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D) expression expressed in mean fluorescence intensity (MFI) compared

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

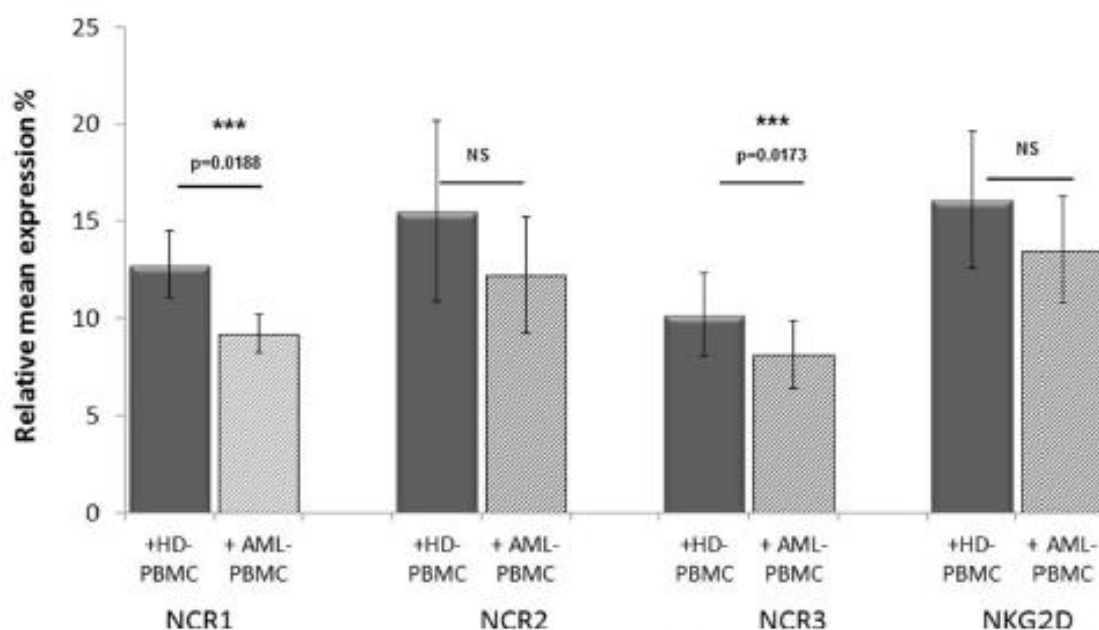


Fig. 2 HD-NK cell activating receptors expression in presence of AML-PBMC. Evolution of NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D expression in mean fluorescence intensity (MFI), background levels were measured using isotypic control, after co-culture of HD-NK

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).

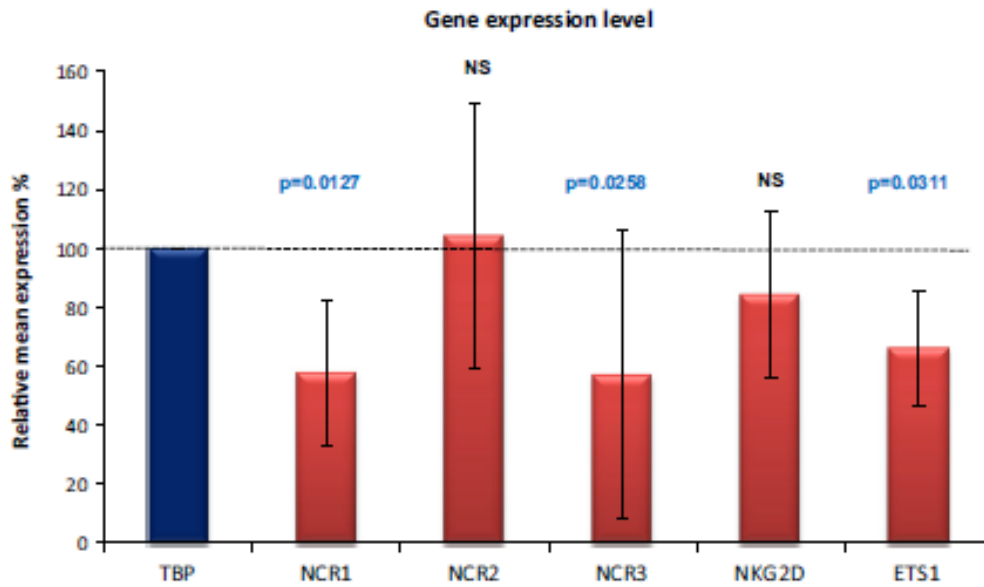


Fig. 3 Gene expression level of activating receptors after co-culture with AML-PBMC. Histograms represent the relative mean expression in percentage of NCR1, NCR2, NCR3 and NKG2D genes when HD-NK cells are co-cultured with PBMC from AML patients, compared

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

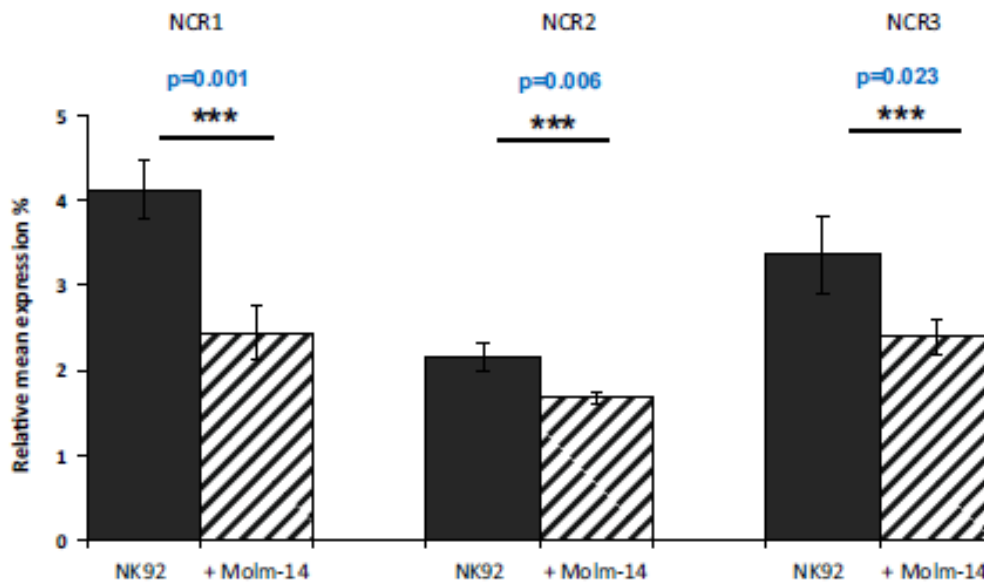


Fig. 4 Activating receptors expression in NK-92 co-cultured with leukemic blasts. Evolution of NCR1, NCR2 and NCR3 expressions, in MFI ratio, after NK-92 co-culture with Molm-14 AML cell line

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

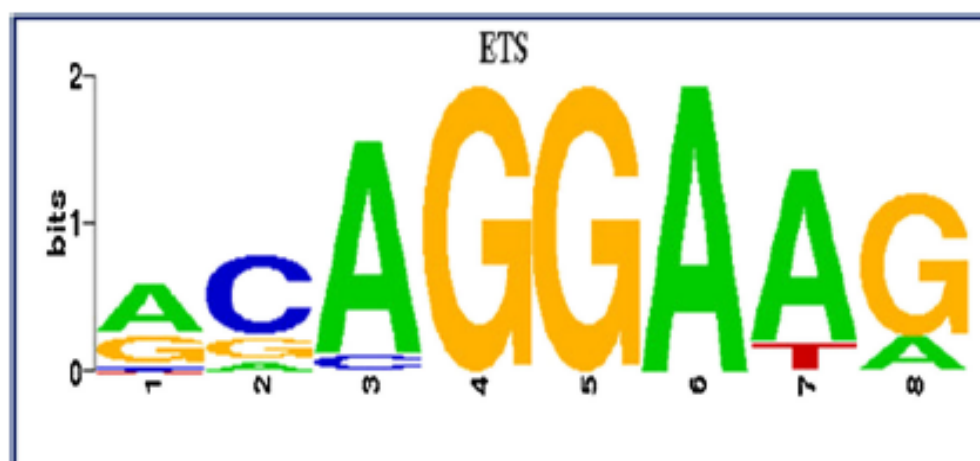
ETS-1 gene expression decreased in presence of AML blasts

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
dI_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
MZFI_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	-16 to 35 -133 to 152
Sp1	-16 to 7	-361 to 353 -477 to 458	-22 to 30 -212 to 231 -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 ± expansion, AML-NK ± 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-

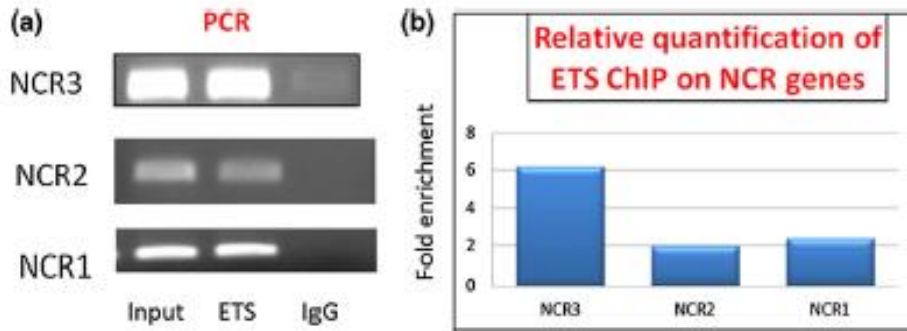


Fig. 6 In vivo recruitment of ETS-1 transcription factor on the human NCR genes promoter. **a** Semi-quantitative PCR results of electrophoresis on an agarose gel. **b** Results of the quantitative

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

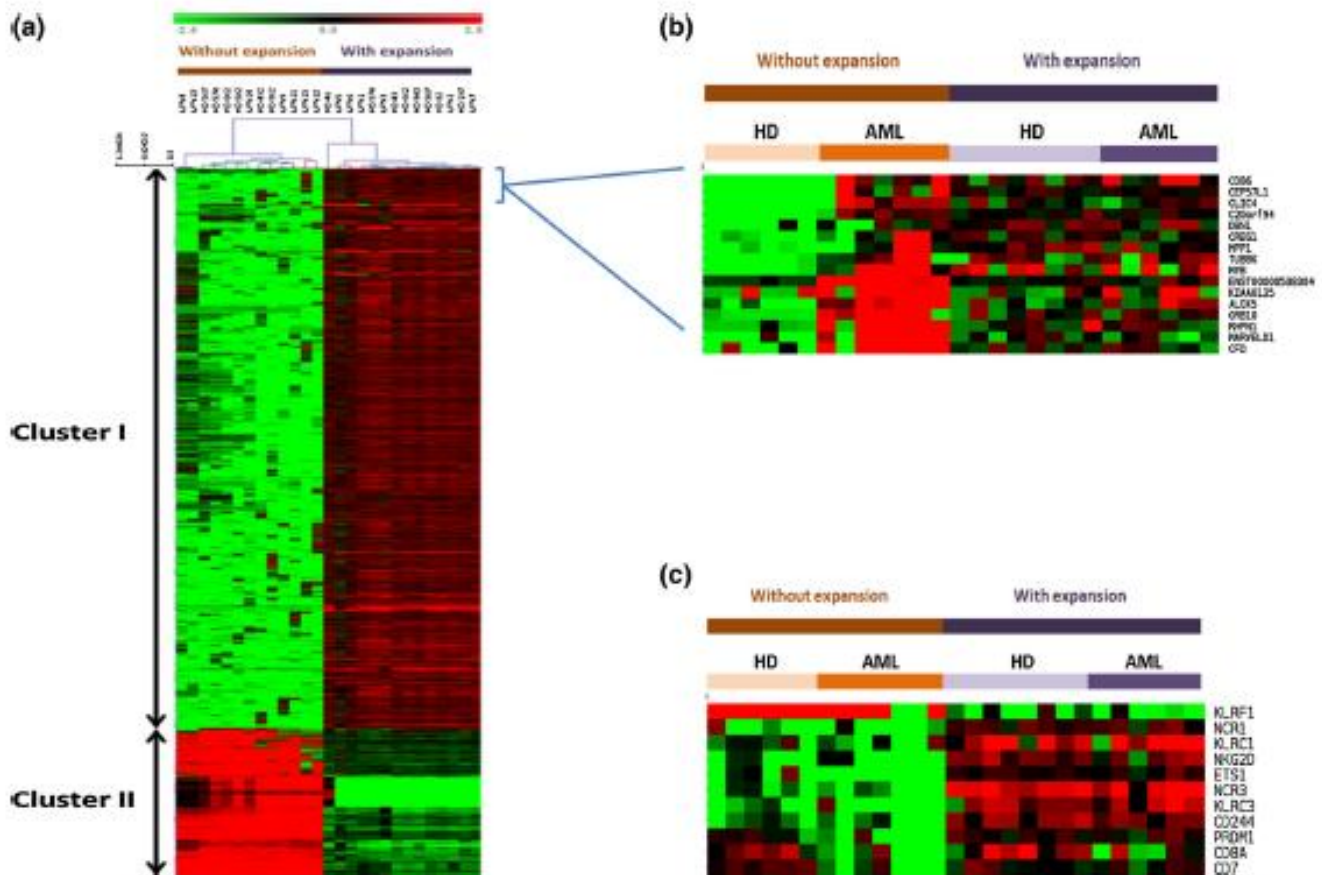


Fig. 7 Heatmap of gene expression changes in AML patients versus donors with and without NK cell expansion. **a** The hierarchical clustering represents overexpressed (red) and underexpressed (green) genes in sorted NK cells from 12 AML patients (UPN) and 14 HD. Normalized signal intensities were treated 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

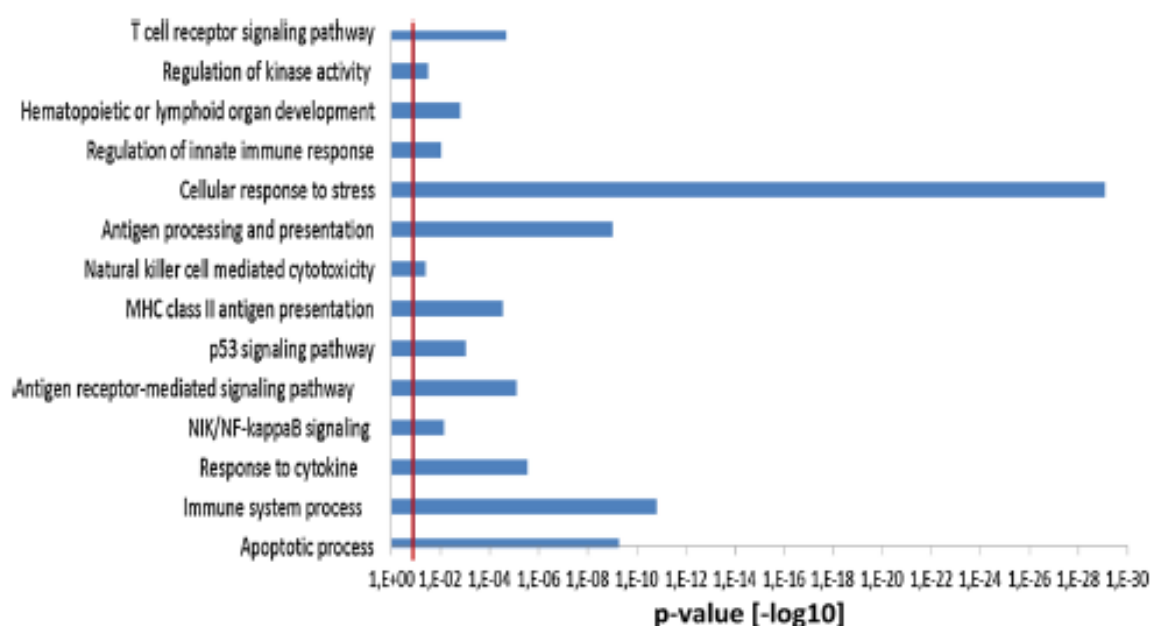


Fig. 8 Functional annotation. Summary of some functional enrichment terms (GO terms) found with g: profiler web server. In ordinate, corrected *p* values (Bonferroni correction) of each Go term and in abscissa, selected Go terms. All the Go terms are statistically

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 Martín 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, Homing 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 Hebdomal 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. *Oncimmunology*. 2016;5:e1041701.
 17. Brune M, Hansson M, Melqvist 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. Ramírez 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, Weimann 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.

Discussion :

Les cellules NK issues de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde *in vitro* ont une prolifération 4 fois plus faible que les cellules NK issues de sujets sains, même après 30 jours d'expansion. Après expansion, nous observons une restauration partielle des récepteurs activateurs des NK en comparaison avec les NK de sujets sains. Cependant, ce protocole pourrait être approprié pour la thérapie cellulaire avec activation des Nk *ex vivo*, car il restaure l'expression de NCR1 et NCR3. Au vu des résultats obtenus, nous avons cherché à mieux comprendre les mécanismes sous-jacents de la régulation des trois NCR. Leurs expressions coordonnées nous ont conduits à la recherche d'un facteur de transcription commun. Le facteur de transcription ETS-1 semblait particulièrement intéressant. Des cellules Nk de souris déficientes pour le facteur de transcription ETS-1 ont montré une diminution de la cytotoxicité. Durant les premiers stades de différenciation des Nk chez la souris, ETS-1 favorise l'expression des récepteurs activateurs tels que Nkp46 (118). Cependant, il est difficile de savoir si ce facteur de transcription joue un rôle dans la cytotoxicité (119-122). Un motif homologue du site de fixation de ETS dans le promoteur de perforine a été identifié dans des cellules cytotoxiques (122, 123). Nous avons démontré que le facteur de transcription ETS-1 se fixe *in vivo* sur la région promotrice prédite *in silico* des NCR dans des cellules Nk-92. De plus, l'expression de ETS-1 est sous-exprimée en présence de blastes leucémiques et suit le même schéma de l'expression des NCR. Cependant, notre étude ne permet pas de conclure la liaison directe de ETS-1 sur la région ciblée. Beaucoup de facteurs de transcription coopèrent afin d'induire la transcription. Des expériences d'ARN interférant devraient étudier cette question.

La comparaison du profil d'expression des NK de patients atteints de LAM avec le profil d'expression de NK de sujets sains, avec et sans expansion, nous a permis de mettre en évidence deux clusters (Cluster I et II) qui différencient dans un premier temps les NK expansés des NK non expansés, en ne tenant pas compte de leurs origines (patients LAM ou sujets sains). Une signature de spécifique des cellules NK—LAM non expansées a été identifiée ; nous ne savons pas dans quelle mesure cette signature pourrait être spécifique d'un défaut de cytotoxicité et conduire à l'échappement au contrôle du système immunitaire inné. Par contre, cette signature transcriptomique est réversible après l'expansion des NK. Sous nos conditions de culture cellulaire, les cellules NK expansées surexpriment des molécules centrales des fonctions cytotoxiques (NCR 1, NCR3, NKG2D) et un facteur de transcription important (ETS-1). Cette surexpression a été identifiée chez les NK de patients ainsi que les NK de sujets sains, ce qui suggère la récupération du phénotype cytotoxique. Nous relevons par contre la différence de la médiane d'âge entre les deux populations de Nk (donneurs sains et patients LAM). Cette différence peut être expliquée par le fait que les échantillons de sang de donneurs sains ont été récupérés de l'établissement français du sang (EFS) et que la médiane des donneurs est beaucoup plus inférieure à la médiane de survenue d'une LAM. Il

aurait été judicieux de faire plus attention à ce paramètre et faire en sorte que les médianes des deux populations soient les plus proches possible.

L'analyse en utilisant les microarrays nous offre une vue générale de la variation de l'expression des gènes incluant les gènes codants pour des facteurs de transcription. L'analyse *in silico* des sites putatifs de fixation de facteurs de transcription en amont des NCR permet d'identifier un certain nombre de facteurs de transcription potentiels régulant les NCR. Cette approche nous a permis d'identifier la signature transcriptomique des cellules NK issues de patients atteints de leucémie aiguë myéloïde, mettre en évidence l'effet de l'expansion ainsi que choisir un facteur de transcription candidat qui pourrait réguler l'expression coordonnée des trois NCR.

L'approche transcriptomique nous a permis d'une part identifier une signature transcriptomique des NK issus de patients LAM et d'autre part, montrer l'effet de restauration partielle des fonctions du NK après expansion. Elle nous a permis aussi de valider partiellement les prédictions bioinformatiques avec la surexpression de ETS-1. Les résultats encourageants sur la restauration *in vitro* des fonctions des NK issus de patients LAM après expansion (expression et phénotype) nous offre un nouveau concept sur en thérapie cellulaire. Cette dernière est basée sur l'expansion *in vitro* des NK avant de les injecter à des patients atteints de LAM.

Conclusion et perspectives :

L'analyse transcriptomique nous a permis d'identifier une signature spécifique des patients atteints de LAM. Cependant, l'expansion des NK gomme cette signature *in vitro* et permet la surexpression des molécules centrales de la fonction du NK (NCR, NKG2D) et de ETS-1, ce dernier étant un bon candidat pour jouer un rôle central dans la régulation d'expression des NCR. ETS-1 se fixe *in vivo* à une région prédite *in silico* sur une région du promoteur des NCR et son expression diminue en présence des blasts leucémiques et suit la même expression que les NCR. Pour valider cette hypothèse, des tests de transfection de la lignée cellulaire Nk-92 avec un siRNA anti-ETS-1 sont en cours de réalisation, cette expérience permettra d'inhiber le facteur de transcription ETS-1 et mettra en évidence l'impact du facteur de transcription ETS-1 sur la transcription et l'expression des NCR à la surface du NK.

Chapitre 2 :

**Identification de la signature
transcriptomique prédictive de
la survenue du sepsis et/ou de
SIRS**

Identification de la signature transcriptomique prédictive de la survenue du sepsis et/ou de SIRS

Introduction

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Définition

L'autogreffe consiste à appliquer une chimiothérapie myéloablatrice à haute dose, ensuite, injecter des cellules souches hématopoïétiques du même patient dans le but d'avoir une rapide reconstitution hématologique (après avoir prélevé des cellules souches hématopoïétiques). L'injection de CSH réduit la durée de la myélosuppression induite par la chimiothérapie à haute dose, avec un taux de mortalité inférieur à 3 % (124-126) **Figure 5**.

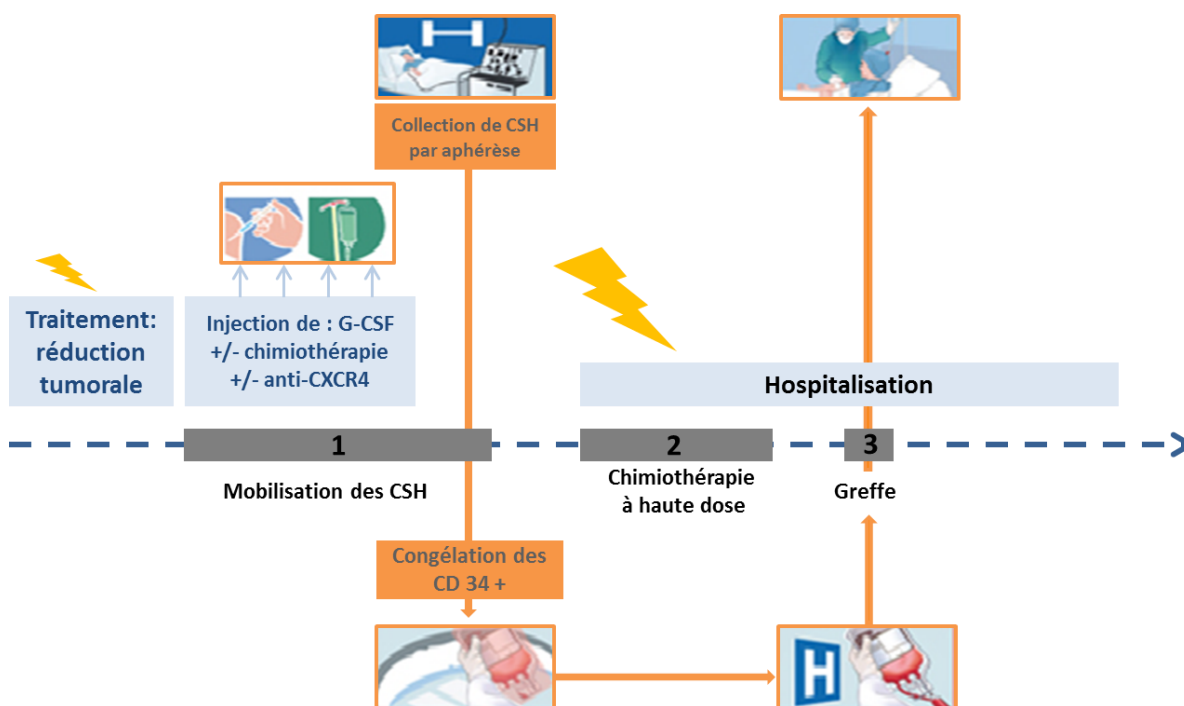


Figure 5 : Le principe de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

Les CSH sont mobilisées par injection de facteurs de croissance et chimiothérapie, puis sont collectées par aphérese et congelées. L'ACSH consiste en à appliquer une chimiothérapie à haute dose et injecter les CSH au préalablement congelées

Épidémiologie

Le nombre d'autogreffes de cellules souches hématopoïétiques réalisé en Europe et déclaré par le groupe EBMT (*European Bone Marrow Transplantation*) (Rapport annuel/14) a considérablement augmenté au

cours des deux dernières décennies. Elles s'élevant de 3 000 en 1990 à près de 23 000 en 2013. Cinq cents ACSH ont été réalisés dans le cadre de leucémies aiguës. 17 774 dans le cadre d'hémopathies malignes lymphoïdes agressives (myélome, lymphome non hodgkinien lymphome hodgkinien), 1 483 dans le cadre de tumeurs solides et 179 dans le cadre de pathologies non tumorales en 2013.

Indications

Cette procédure est indiquée entre autres en première ligne dans le myélome du sujet jeune et en seconde ligne chez les patients atteints de lymphome.

Mobilisation, collection et conservation des cellules souches hématopoïétiques

Les greffons sont actuellement principalement collectés par aphérèse après une mobilisation des cellules souches hématopoïétiques périphériques, plutôt que par prélèvement direct de la moelle osseuse. La collection par aphérèse évite au patient une anesthésie générale, permet de diminuer le temps de récupération hématologique ainsi que diminuer les contaminations potentielles des greffons (127). Cependant, la collection par aphérèse peut entraîner des complications telles que : des troubles ioniques (hypocalcémie, hypomagnésémie, hypokaliémie), la thrombopénie, l'infection sur cathéter ou la thrombose (128).

L'autogreffe et les hémopathies malignes

Le traitement et le pronostic des myélomes multiples ont changé drastiquement durant la dernière décennie. La médiane de survie était inférieure à 1 an avant l'utilisation des agents alkylants (129-131). La mise en place de la greffe de cellules souches représente une avancée dans le traitement du myélome multiple. Cette dernière a permis une nette amélioration de la survie des patients, par rapport à la chimiothérapie conventionnelle (129, 132). L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement de référence pour les patients jeunes (<65 ans) atteints de myélome.

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques est le traitement de référence des lymphomes hodgkiniens réfractaires ou en rechute (133). Elle est aussi le traitement standard en première ligne dans le cas du lymphome du manteau chez les sujets jeunes. Une combinaison de cisplatine et de cytarabine en alternant ou pas avec du R-CHOP est utilisée comme chimiothérapie d'induction, suivie de la réinjection des cellules souches hématopoïétiques (134, 135). Le lymphome folliculaire ne peut pas être guéri par chimiothérapie conventionnelle, d'où l'intérêt de l'intensification thérapeutique. Mais d'un autre côté, l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques en première ligne n'améliore pas la survie globale du patient (136-138).

Les complications de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques

La reconstitution hématologique et les infections sont les deux principales complications chez les patients autogreffés. En plus de la toxicité chimiothérapeutique, un ensemble de facteurs contribue au développement de l'infection. Bien que les dommages directs causés à la peau, aux muqueuses ainsi qu'à la défaillance de la réponse cellulaire et humorale sont importants. La sévérité et la durée de la neutropénie (diminution des polynucléaires neutrophiles circulants) sont les principaux déterminants dans le développement de l'infection (139, 140). Le risque de survenue de l'infection chez les patients avec une neutropénie fébrile est principalement déterminé par la durée et la profondeur de la neutropénie et des maladies sous-jacentes (141).

Les germes responsables du choc septique sont souvent des bacilles endogènes à Gram négatif (comme *Escherichia Coli*). En outre, l'immunosuppression prolongée expose les patients à des infections fongiques. Une prophylaxie antifongique est souvent administrée. L'efficacité de la prophylaxie microbienne n'a pas été clairement établie, c'est pour cela qu'elle est moins souvent administrée (142). Cependant, la prophylaxie antimicrobienne augmente le risque de diarrhée à *Clostridium difficile* (143). L'alopecie, les mucites, les nausées et vomissements ainsi que l'aplasie profonde sont des complications classiques de la chimiothérapie à haute dose. Moins fréquente que dans les allogreffes, la maladie veino-occlusive hépatique peut compliquer l'autogreffe. Elle se manifeste par une hépatomégalie douloureuse, la jaunisse ou de la rétention d'eau (144).

Les patients autogreffés ont des complications pulmonaires dans 25 % des cas, le plus souvent en raison des complications infectieuses. Les complications pulmonaires non infectieuses sont essentiellement : l'œdème pulmonaire aigu (5 %), le syndrome de pneumonie idiopathique (1 %), et l'hémorragie alvéolaire diffuse (2 %) (145)

La toxicité à long terme n'est pas à négliger (144, 145). Tout d'abord, sur la subfertilité ou l'infertilité (chez l'homme et chez la femme) est une conséquence possible de la chimiothérapie à haute dose. Le nombre de grossesses obtenues sans assistance médicale après autogreffe est de 15 %. Par conséquent, une cryoconservation de sperme ou d'ovocytes est préférable. Sur le long terme, les patients transplantés présentent un risque accru de leucémies secondaires, de maladies cardiovasculaires, des troubles endocriniens et métaboliques. Ceci justifie un suivi spécialisé au minimum annuel, même au-delà des 5 ans (qui est considéré comme une période de guérison pour des lymphomes de haut grade par exemple).

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique et le sepsis

Définitions

Syndrome de réponse inflammatoire systémique (SIRS)

Le syndrome de réponse inflammatoire systémique ou SIRS est un syndrome clinique qui se traduit par une réponse systémique due à une infection localisée ou généralisée, un traumatisme, une lésion thermique ou des processus inflammatoires stériles, à savoir la pancréatite aiguë par exemple (146). Le SIRS est caractérisé par la présence d'au moins deux des signes suivants :

- Température corporelle > 38 °C ou < 36 °C
- Fréquence cardiaque > 90 battements par minute
- Fréquence respiratoire > 20/min ou hyperventilation se traduisant par une PaCO₂ < 32 mmHg (< 4,3 kPa) en air ambiant
- Leucocytose > 12.000/mm³ ou < 4.000/mm³ ou > 10 % de cellules matures

Alors que les manifestations cliniques de l'inflammation systémique sont très communes, les caractères biochimiques sont un peu plus spécifiques (147). Dans la littérature, les chercheurs ont décrit des taux élevés d'interleukine 6 (IL-6) (148), d'adrénomédulline (149), de CD 14 soluble (150), de phospholipase extracellulaire A₂ (151), de protéine C réactive (152).

Le sepsis

Le sepsis est défini comme un syndrome clinique avec la coexistence d'une réponse inflammatoire systémique et une infection suspectée ou documentée (146). Par conséquent, le sepsis peut être aussi fortement soupçonné sans être microbiologiquement confirmé. **Figure 6**

L'infection

L'infection est un processus pathologique causé par l'invasion d'un tissu, d'une cavité ou d'un fluide corporel par des micro-organismes pathogènes ou potentiellement pathogènes. Souvent, l'infection est fortement suspectée sans être microbiologiquement confirmée (146).

Le sepsis sévère

Le sepsis sévère est un état pathologique défini comme étant un sepsis compliqué par un dysfonctionnement d'organes. Le sepsis sévère est considéré comme une des causes les plus fréquentes de décès dans les unités de soins intensifs (146).

Le choc septique

Le choc septique est un état d'insuffisance circulatoire aiguë, c'est une aggravation du sepsis sévère qui se caractérise par une hypotension artérielle persistante chez l'adulte. L'hypotension est définie par une

pression artérielle systolique inférieure à 90 mm Hg (chez l'enfant moins de 2 SD - écarts-types - inférieur à la normale par rapport à l'âge) (146).

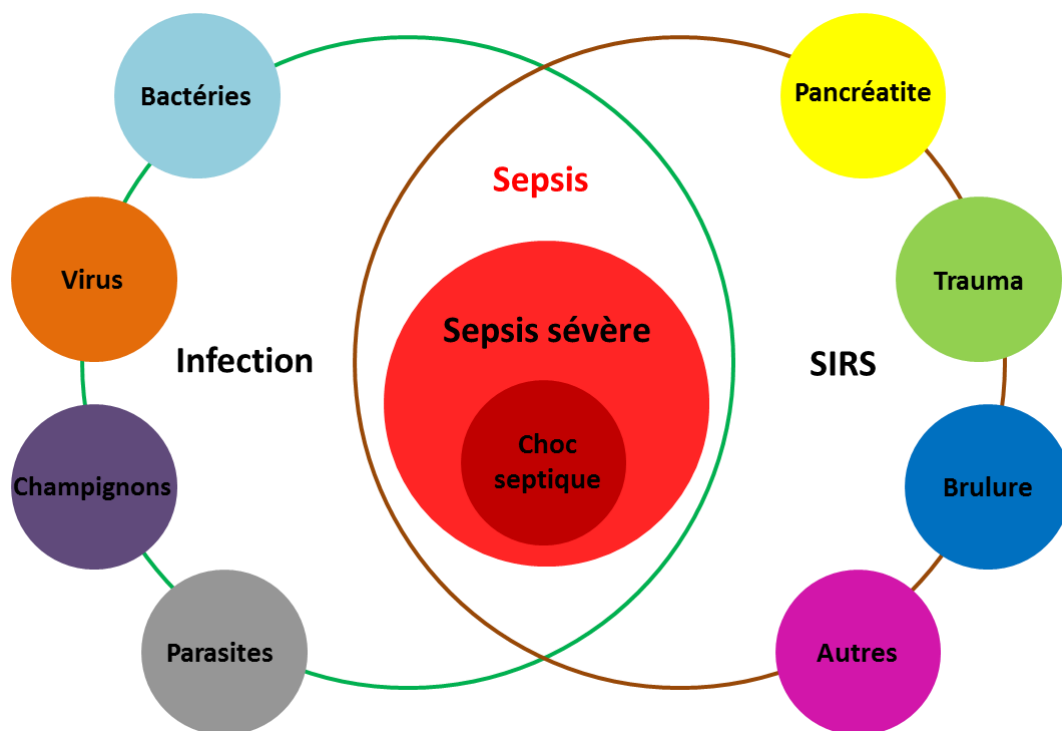


Figure 6 : Illustration de la relation entre SIRS, le sepsis, et les autres infections :

Le SIRS est dû aux traumatismes, aux pancréatites, et aux brûlures. Le sepsis est l'interaction entre l'état d'inflammation systémique, et l'état infectieux. Le sepsis peut aussi se compliquer en sepsis sévère avec des défaillances d'organes.

Adaptée de Chest 1992; 101:1644-55

Épidémiologie du sepsis

Le sepsis affecte 1,8 million de personnes dans le monde chaque année. L'incidence annuelle du sepsis augmente de 8 % chaque année. Ceci peut être expliqué par les différents facteurs de risque comme le vieillissement de la population, l'émergence de pathogènes résistants aux antibiotiques, l'utilisation d'immunosuppresseurs, ainsi que l'augmentation des interventions médicales invasives (153). En France, le choc septique est en augmentation croissante au cours des 20 dernières années (8,2 % en 1993 à 15,4 % en 2010 au sein du service de réanimation). En revanche, on relève une diminution significative de la mortalité en réanimation (60,1 % en 1993 à 39,5 % en 2010). Cette diminution de la mortalité est peut-être liée à l'intérêt porté par les réanimateurs à cette pathologie ces dernières années, ainsi qu'à l'optimisation des prises en charge des patients. Quoiqu'il en soit, les chiffres de mortalité restent très élevés (154).

Physiopathologie du sepsis

Le sepsis, le sepsis sévère et le choc septique ainsi que le dysfonctionnement d'organes sont des processus complexes qui englobent notamment la réponse pro-inflammatoire, anti-inflammatoire, humorale, et cellulaire (155). L'apoptose ou mort cellulaire programmée pourrait avoir un rôle important dans le dysfonctionnement d'organes (156). La pathogenèse du sepsis implique une interaction complexe entre le système immunitaire de l'hôte et les micro-organismes infectieux. Les bactéries et leurs produits déclenchent des cascades de la réponse cellulaire impliquant plusieurs types de cellules (leucocytes, mastocytes, cellules endothéliales et plaquettes), et plusieurs voies moléculaires (pro-inflammatoire, anti-inflammatoire, cascades de coagulation, activation du complément, adhérence et apoptose) (153, 157, 158).

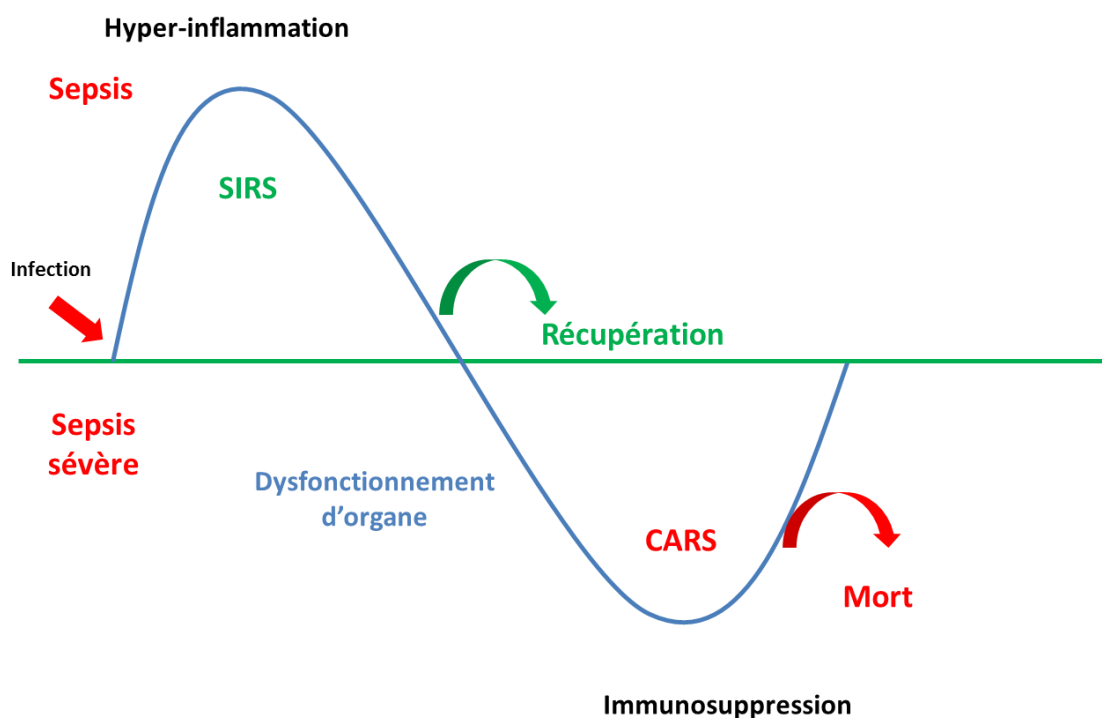


Figure 6 : Le sepsis en deux phases. Après l'infection, une phase d'hyperinflammation est déclenchée caractérisée par le SIRS, celle-ci peut être résolue (phase de récupération) ou peut progresser en sepsis sévère. Durant cette phase, une réponse anti-inflammatoire systémique compensatrice (CARS) est enclenchée avec une immunosuppression et un dysfonctionnement d'organe. Cette phase peut être résolue avec les supports médicaux appropriés, mais souvent mène au décès du patient. (Modifiée de Faix, 2013)

Le rôle des cellules de l'immunité innée et adaptative au cours du sepsis

Le rôle et les changements cellulaires au cours du sepsis sont résumés dans la **figure 8**

Le Rôle des cellules de l'immunité innée au cours du sepsis

Les polynucléaires neutrophiles

Les neutrophiles sont des cellules clés impliquées dans la phagocytose des micro-organismes. Ils constituent une réserve de substances antimicrobiennes puissantes, telles que les enzymes protéolytiques, les ROS (reactive oxygen species), ainsi que les composés réactifs de l'azote (159, 160). Le développement du sepsis favorise des changements dans l'expression des molécules d'adhésion à la surface des cellules endothéliales ainsi qu'à la surface des neutrophiles. Par exemple, il a été observé une augmentation de l'expression des molécules-1 d'adhésion intercellulaires (ICAM-1 — *Intercellular adhesion molecule — 1*) et molécule-1 d'adhésion des cellules vasculaires (VCAM-1 - *Vascular cell adhesion molecule-1*) sur les cellules endothéliales de différents organes (160, 161). En réponse à des médiateurs proinflammatoires, les neutrophiles activés expriment des niveaux élevés d'intégrine $\beta 1$ et $\beta 2$, et de CCR2 qui est spécialement surexprimée durant le sepsis (162, 163). Au stade initial, les neutrophiles sont recrutés au niveau du site de l'infection, en réponse à des chimiokines telles que CXCL1, CXCL2, et CXCL8. Tous ces acteurs renforcent l'adhérence des neutrophiles activés dans les organes viscéraux (164). Lors du sepsis, l'exposition des neutrophiles aux PAMP et la signalisation TLR augmentent l'expression de NF- κ B médiée par la production de cytokines proinflammatoires, entraîne l'accumulation des cytokines dans les vaisseaux sanguins et la coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) provoquant des défaillances d'organes (160, 165). La charge microbienne active aussi les facteurs du complément, comme C5a, C3a et C3b. Outre la régulation de la coagulation du sang, ces facteurs (en particulier C5a) jouent un rôle important dans le contrôle des activités des cellules immunitaires innées au cours de l'infection (160, 166, 167). En plus des fonctions cellulaires, des neutrophiles peuvent combattre les agents infectieux par la formation de pièges extracellulaires (NET – *Neutrophil extracellular traps*). Les NET se composent de chromatine transformée et des protéines granulaires qui jouent un rôle essentiel dans le piégeage et la mise à mort de l'agent pathogène (168).

Les macrophages

Les macrophages sont les sentinelles du système immunitaire. Ils jouent un rôle dans la reconnaissance des produits bactériens via ses récepteurs de reconnaissance des pathogènes (PRR - *Pattern recognition receptors*) durant le sepsis (160, 169). En réponse à cette reconnaissance, les macrophages libèrent des cytokines proinflammatoires telles que TNF- α et l'IL-1, celles-ci agissent sur le macrophage lui-même ainsi que sur d'autres types cellulaires tels que les neutrophiles et les cellules endothéliales. Ce processus d'activation conduit à la libération d'un grand nombre de cytokines proinflammatoires comme : TNF- α , IL-6, IL-1 β , IL-8, IL-12, le facteur d'activation plaquettaire (PAF), les ROS, et les composants microbicides (lysozymes, protéines cationiques, les hydrolases acides, et lactoferrine) qui agissent contre les agents infectieux (170). Les lipopolysaccharides microbiens (LPS) stimulent les macrophages pour la production de MCP-1 qui active NF- κ B. Le récepteur CCR2 de MCP-1 (CCL2) et de CCL7 est impliqué dans l'infiltration des

monocytes sur le site de l'inflammation. Les médiateurs inflammatoires libérés par les macrophages activent également les neutrophiles. Par conséquent, ils contribuent à l'orage cytokinique et à la défaillance d'organes lors du sepsis (160, 171). D'autres facteurs contribuent aussi au recrutement des neutrophiles au site de l'infection (172, 173). Le facteur C5a du complément pourrait induire une hyper production de cytokines proinflammatoires par les macrophages, qui à leur tour, contribuent aux lésions tissulaires et à la défaillance des organes (174).

Quand le macrophage est exposé aux endotoxines telles que le LPS, il peut aussi entrer dans un état non réactif, ne répondant pas aux endotoxines avec la diminution de la production des cytokines ou des chimiokines proinflammatoires. Le macrophage est alors en phase de tolérance aux endotoxines. En conséquence de cette tolérance, il existe une reprogrammation cellulaire (M1-M2), qui régule l'expression des médiateurs immunosuppresseurs. Il est connu que les mécanismes anti-inflammatoires aident à la restauration de l'homéostasie tissulaire suite à une inflammation. Cependant, leur production excessive en phase de tolérance provoque une immunosuppression et favorise le sepsis (160, 175, 176).

Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigène. Ce sont les activatrices majoritaires des cellules T. Elles sécrètent de l'IL-12 et de l'IL-10, expriment le CMH-II et des molécules de costimulation sur leurs surfaces, agissant ainsi comme un pont de liaison entre le système immunitaire inné et l'adaptatif. Au cours du sepsis, les cellules dendritiques sont particulièrement vulnérables à l'apoptose. Les cellules dendritiques chez les patients ayant un sepsis expriment le HLA-DR et produisent plus de IL-10, ce qui enclenche l'immunosuppression. Les cellules dendritiques qui se développent à partir des monocytes, au lieu d'activer les cellules T effectrices, causent notamment la prolifération des cellules T régulatrices qui conduit au stade d'immunosuppression (160, 177, 178).

Les cellules *natural killer* (NK)

Les cellules NK (CD3-, CD56 +) ont des propriétés cytotoxiques et produisent des cytokines, comme l'interféron- γ (IFN- γ). Les NK sont très importants pour se défendre contre diverses bactéries, telles que : *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Toxoplasma gondii*, and *Listeria monocytogenes*. Cependant, dans le sepsis, les cellules NK peuvent avoir des effets protecteurs, mais sont également responsables de conséquences néfastes (160, 179-181).

Le rôle des cellules de l'immunité adaptative au cours du sepsis

Les lymphocytes T

Le développement et la progression du sepsis sont aussi associés au dysfonctionnement de la réponse des cellules T, qui inclut l'activation de l'apoptose, l'inhibition de la fonction des cellules Th1, la dérégulation de

la fonction des récepteurs TCR, et la présence accrue des cellules T régulatrices dans les tissus. Au cours du développement du sepsis, les lymphocytes T jouent un rôle important dans la neutralisation des produits intrinsèques (par exemple, les stéroïdes, NO, les gènes de la famille Bcl-2) ou extrinsèques (par exemple, l'antigène Fas, le ligand Fas, CD95), qui sont responsables du déclenchement de cascades néfastes au cours du sepsis (160, 182-184). Durant le sepsis, l'équilibre entre les cytokines Th1 et Th2 est perturbé, résultant du passage du phénotype Th1 à Th2 menant à l'immunosuppression. Lors de la stimulation du TCR, une absence de production d'IFN- γ , de TNF- α , d'IL-6 et d'IL-10 a été observée dans les échantillons de tissu de rates et de poumons isolés de patients septiques décédés en réanimation, en comparaison avec des échantillons de patients non septiques. Cette constatation suggère l'altération des fonctions des cellules T au cours du sepsis sévère. De même, les lymphocytes de patients septiques ont une diminution de l'expression des facteurs de transcription T-bet, GATA3 et ROR- γ t au cours du sepsis (185-187).

La capacité de l'hôte à éliminer les micro-organismes au cours du sepsis est également liée à l'épuisement des cellules T, comme en témoigne la surexpression de PD-1 dans les lymphocytes T circulants. Cette constatation a été confirmée par des études sur des modèles animaux. L'inhibition de l'interaction PD1-PDL1 pourrait améliorer la survie dans le sepsis en réduisant l'épuisement des cellules T. Diverses études suggèrent que l'apoptose des lymphocytes induite par le sepsis et l'épuisement des cellules T, pourrait affecter la réponse à une infection précocement après le début de l'épisode septique (187-190).

Les lymphocytes *natural killer* T (NKT)

Les cellules NKT ont été dans un premier temps découvertes chez le modèle murin, avec l'expression du TCR dans les thymocytes en même temps que les marqueurs des cellules NK. Contrairement aux cellules T CD4+, T CD8+ ou T $\alpha\beta$, qui reconnaissent les antigènes peptidiques, les cellules NKT peuvent reconnaître et tuer des cellules cibles exprimant des antigènes lipidiques, présentés par les molécules du CMH-I. Les cellules NKT peuvent être activées par des cytokines telles que l'IL-12 ou l'IL-18 à l'aide de présentation de l'antigène par le CD1. Les cellules NKT peuvent exprimer une large gamme de TLR leur permettant de répondre immédiatement à une variété d'agents infectieux. Bien que le rôle des cellules NKT dans le cadre du sepsis associé aux dysfonctionnements immunitaires n'a pas été étudié en profondeur, des données montrent l'importance des cellules NKT dans la modulation des réponses de l'hôte dans le sepsis (160, 191-194). Les cellules NKT produisent à la fois des cytokines pro- et anti-inflammatoires et ont la capacité de promouvoir ou d'inhiber la réponse immunitaire au cours du sepsis (63).

Les lymphocytes T $\gamma\delta$

Les cellules T $\gamma\delta$ sont une sous population des lymphocytes qui expriment la chaîne γ et δ dans leur TCR avec le CD3. Cela peut activer de manière non spécifique et indépendante des antigènes, par les PAMP, les cytokines et les super-antigènes. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ jouent un rôle dans la réponse immunitaire anti-

infectieuse par l'intermédiaire d'une activité cytotoxique et la production de cytokines (160, 195-197). Il a été démontré que les T $\gamma\delta$ peuvent moduler la fonction des macrophages et des neutrophiles. Ils peuvent aussi réguler l'apoptose ainsi que la production de cytokines, contribuant ainsi aux dysfonctionnements immunitaires induits par des blessures (198, 199). Matsushima et coll. ont montré qu'en comparaison avec des témoins, les patients présentant un SIRS et les patients traumatisés, ont des lymphocytes T $\gamma\delta$ activés, mais leur nombre était diminué dans le sang périphérique. Une autre étude a également soutenu la diminution du pourcentage et une altération de la fonction des cellules T $\gamma\delta$ dans le sang périphérique suite à un choc septique (200, 201).

Les lymphocytes T régulateurs (T reg)

Les lymphocytes T régulateurs sont généralement caractérisés par différents récepteurs de surface, comme la chaîne IL-2R α (CD25), le CTLA4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), le GITR (glucocorticoid-induced TNFR) et FOXP3 (forkhead box p3) (202).

Wisnoski et coll. ont montré que la surexpression de FOXP3 dans les T régulateurs serait IL-10 dépendant, suggérant un lien possible avec le développement des cellules Th1 au lieu de T regs au cours du sepsis. La déplétion des T reg restaurerait la production d'INF- γ , et de l'IL-2 par les CD4+, mais n'a aucun effet sur la mortalité globale induite par le sepsis (203). Les données recueillies à partir de plusieurs études montrent que les effets immunosuppresseurs des lymphocytes T régulateurs sont augmentés lors du sepsis et des brûlures. Aussi, les T régulateurs sont non seulement importants pour la diminution de la réponse Th1, mais jouent également un rôle important dans la suppression de la production de cytokines pro-inflammatoires après une blessure grave. Cependant, les mécanismes précis (production d'IL-10/TGF- β , interaction CTLA4 et apoptose) impliqués dans ce processus restent à établir (160).

Les lymphocytes B

Les anticorps (immunoglobulines) produits par des cellules B protègent contre les agents infectieux, par la liaison aux molécules de surface des bactéries et des virus (opsonisation) et en neutralisant les toxines. Les immunoglobulines jouent un rôle vital dans l'activation des facteurs du complément, ainsi que les neutrophiles et les cellules T (204, 205). Le rôle des lymphocytes B dans la pathogenèse du sepsis est mal connu. Cependant, sur la base d'observation dans des modèles de sepsis expérimental, il a été proposé que les cellules B pouvaient contribuer à l'amélioration de la réponse immunitaire innée précoce au cours du sepsis bactérien. Par exemple, la production de GM-CSF (granulocyte macrophage colony-stimulating factor) par les cellules B joue un rôle important dans la préservation des fonctions de l'immunité innée telles que la chimiotaxie et la phagocytose des neutrophiles. Ces dernières sont des fonctions qui se dégradent durant la progression du sepsis (160, 206).

Réponse immunitaire innée			Réponse immunitaire adaptative		
Macrophage	Neutrophile	C. dendritique	Cellule B	Cellule T	
Inflammation et la réponse cellulaire normale					
PPR reconnaissent PAMP TNF- α , IL-1, IL-6, ROS MCP-1 Activation de NF- κ B Phagocytose	PPR reconnaissent PAMP TNF- α , IL-6, INF- γ , RNS, ROS, Pes Activation de NF- κ B Molécules d'adhésion	CMH CD80, CD86 IL-12	Anticorps ADCC GM-CSF	Reconnaissance des antigènes Cytokines Th1 TNF-α, IL-6 Activation de NF-κB	Clairance de pathogène
Propagation de l'infection systémique, et le début du sepsis et de l'hyper-inflammation					
HMGB NF-κB PD-1 TNF-α, IL-6, ROS Apoptose	PSGL-1, CD64, CD14 NF-κB IL-6, RNS, ROS VLA-3 CCR-2 Apoptose	IL-12 Stimulation des cellules T par les cellules dendritiques Fas-L	Anticorps ADCC IRA-B	TNF-α, IL-6 Cytokines Th1 NF-κB Cytokines Th2	Sepsis avec défaillance d'organe
Immunosuppression					
TGF-β, IL-10 ET impliquant IRAK M Wnt5a (M2) P50 réprime NF-κB (M1 \rightarrow M2)	IL-10 Altération du TLR avec PPAR-γ	IL-10 Apoptose via TLR2, TLR4 et autres Bcl-2	Apoptose PDL-1 Caspase 3 Anticorps	Cytokines Th2 IL-7R PD-1 Epusement Treg T-bet, GATA-3, RORγ3	Choc septique et décès

Figures 8 : Aperçu des changements cellulaires au cours du sepsis

La reconnaissance des PAMP se fait par les PRR qui sont exprimés sur les cellules immunitaires innées, induit une cascade de réactions inflammatoires, y compris la régulation positive de molécules d'adhésion, les cytokines et la production de ROS. Ces réponses peuvent dégrader les agents pathogènes, il existe une régulation positive de la réponse anti-inflammatoire et, finalement, la restauration de l'homéostasie tissulaire. Toutefois, si la réponse innée et la réponse adaptative ne parviennent pas à contenir l'infection au niveau local, l'infection se propage déclenchant alors une réponse immunitaire (innée et adaptative) systémique ce qu'il en résulte : une hyperinflammation. La progression de l'infection altère la réponse cellulaire, incluant la modification de l'expression des récepteurs de surface, sécrétion des médiateurs inflammatoires inappropriés et l'apoptose prématurée de certaines cellules immunitaires, conduisant ainsi au développement du sepsis. Pour réguler l'hyperinflammation, les réponses d'immunorégulation sont activées conduisant au stade d'immunosuppression. Ainsi, une réponse de l'hôte qui a pour but de protéger contre les agents infectieux provoque des dommages tissulaires conduisant à des défaillances d'organes.

Code couleur : **rouge** = surexpression, **vert** = sous-expression (Adaptée de Bhan et coll., 2016)

Les biomarqueurs et médiateurs du sepsis

Il est souvent très difficile d'identifier une infection chez les patients en fonction des signes et des symptômes cliniques. Ces derniers sont des symptômes très généraux et partagés par plusieurs pathologies ; **Figure 8** et **Figure 9**.

Les cytokines et chimiokines proinflammatoires

TNF, IL-1 β et IL-6 sont des cytokines qui assurent la réaction initiale de la réponse immunitaire innée en réponse à une blessure, un trauma ou une infection. TNF et l'IL-1 β , activent les cellules endothéliales, et attirent les leucocytes polymorphonucléaires (PMN) au site de la blessure. Leurs taux sont élevés au cours du sepsis. L'IL-6 stimule le foie à produire notamment la CRP, et stimule aussi l'augmentation de la

production des PMN dans la moelle osseuse (207). Plusieurs études ont montré l'association de l'augmentation du taux de l'IL-6 avec la mortalité chez les patients en choc septique. Cependant, ces marqueurs sont exprimés dans beaucoup de pathologies et donc ne sont pas des biomarqueurs spécifiques du sepsis (208, 209).

La chimiokine IL-8 a été proposée comme biomarqueur de diagnostic du sepsis, et la chimiokine MCP-1 a été proposée comme biomarqueur prédictif de la mortalité dans le cadre du sepsis (210, 211). MCP-1 initie l'inflammation en attirant les monocytes au site de la blessure ou de l'infection, mais aussi peut induire la synthèse de la cytokine anti-inflammatoire IL-10. MCP-1 a donc un rôle important dans l'évolution du sepsis de la phase pro-inflammatoire à la phase d'immunosuppression.

La procalcitonine (PCT) et la protéine C réactive (CRP) comme biomarqueurs

La protéine C réactive et la procalcitonine sont deux protéines produites au cours de l'inflammation et/ou de l'infection. Elles sont probablement les protéines les plus utilisées en tant que biomarqueur en clinique dans le cadre du sepsis.

La CRP a bien été établie comme étant un marqueur de l'inflammation et de l'infection. Elle fait partie du groupe de protéines synthétisées dans le foie, son rôle durant la phase aiguë de l'inflammation n'est pas encore très clair. Elle peut se fixer aux composants phospholipides des microorganismes, facilitant ainsi leur suppression par les macrophages (208, 212).

La procalcitonine est une prohormone (précurseur de l'hormone calcitonine), son induction durant l'infection et le sepsis est régulée différemment que celle de l'hormone mature. La PCT est un biomarqueur du sepsis et de l'infection décrite pour la première fois en 1993 (213). Le rôle biologique de PCT n'a pas encore été totalement élucidé, elle est impliquée dans la modulation de l'oxyde nitrique synthétase ainsi que de l'induction des cytokines, en outre, la protéine interfère avec la liaison au récepteur d'autres hormones peptidiques qui jouent un rôle dans la modulation du fluide intravasculaire et du tonus vasculaire. La procalcitonine est produite ubiquitamment en réponse aux endotoxines ou en réponse aux médiateurs sécrétés en réponse aux infections bactériennes (tels que : IL-1 β , TNF- α , et IL-6). Le taux de PCT est corrélé fortement à la sévérité de l'infection bactérienne (208, 214, 215).

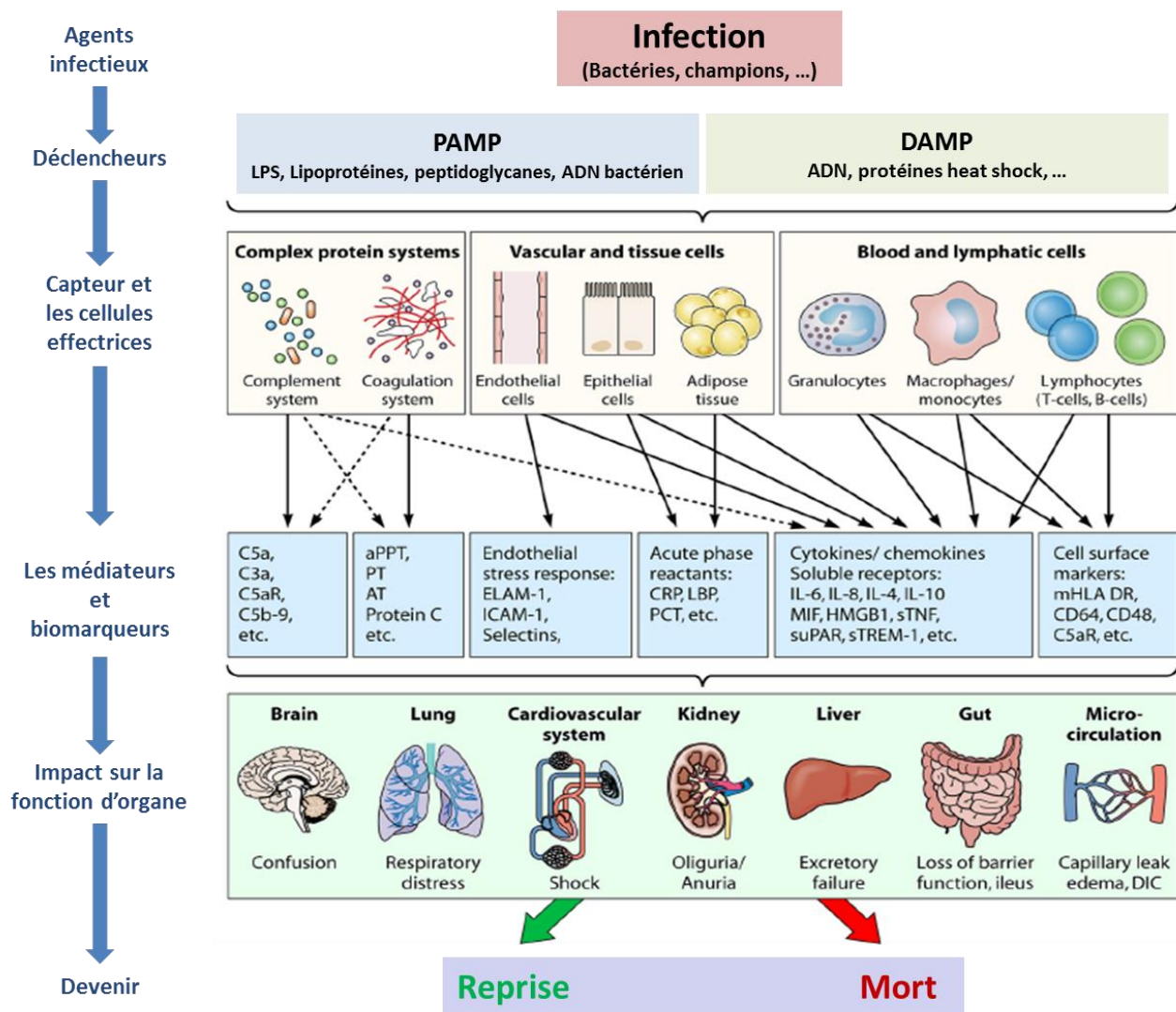


Figure 9 : La réponse inflammatoire et infectieuse

Les agents infectieux déclenchent la libération des PAMP et/ou DAMP, qui sont reconnus par différents mécanismes tels que les PRR, la présentation d'antigène ou autres. Ceux qui réceptionnent les signaux peuvent être différents types de cellules, tissus, ou organes, mais aussi des protéines ou d'autres molécules qui elles-mêmes peuvent fonctionner comme des effecteurs pour moduler la réponse immunitaire par le biais de divers médiateurs et biomarqueurs pro ou anti-inflammatoires. Par conséquent, l'agent infectieux peut être éliminé, et la fonction d'organe peut être altérée temporairement ou définitivement.

PAMP: Pathogen-associated molecular patterns, LPS : Lipopolysaccharides, DAMP : Damage-Associated Molecular Pattern, CRP: C-reactive protein, LBP: Lipopolysaccharide-binding protein, PCT: Procalcitonin, ELAM 1: Endothelial-Leukocyte Adhesion Molecule 1, ICAM-1 : Intercellular Adhesion Molecule 1, IL : Interleukine, TNF : Tumor Necrosis Factor, MIF : Macrophage migration inhibitory factor, HMGB1: High mobility group box 1, HLA: human leukocyte antigen, TREM-1: Triggering Receptor Expressed on Myeloid cells-1

(Modifiée de Rinhart et al . 2012)

Les protéines du complément comme biomarqueurs du sepsis

Les protéines du complément induisent la phagocytose des microorganismes par opsonisation à l'aide du fragment C3 de la protéine 3 du complément appelé C3b. L'activation de la cascade du complément induit aussi la production de peptide pro-inflammatoire (C5a). Le système du complément a un rôle dans l'initiation de l'état inflammatoire durant le sepsis. Le C5a a été considéré comme un biomarqueur

potentiel du sepsis. Le rôle de C5a peut avoir à la fois un rôle pro et anti-inflammatoire durant le développement de l'infection, la liaison de C5a par des PMN activés semble supprimer des fonctions immunitaires innées importantes telles que la phagocytose (208, 216).

Les biomarqueurs des neutrophiles et des monocytes activés dans le sepsis

Une étude sur 47 patients a montré une augmentation de l'expression de CD64, chez les patients atteints de sepsis (217). Aussi, l'expression quantitative du CD64 corrèle avec la progression du sepsis en sepsis sévère (218).

L'expression de l'intégrine CD11b, qui initie la capacité des neutrophiles à adhérer à l'endothélium sur le site de l'inflammation, est aussi augmentée lors d'une infection bactérienne, il a été proposé d'utiliser le CD64 et le CD11b pour diagnostiquer le sepsis.

TREM-1 (*triggering receptor expressed on myeloid cells-1*) est un membre de la superfamille des immunoglobulines qui est comme CD64, surexprimé quand les PMN sont exposés aux bactéries. Le taux de TREM-1 soluble dans le plasma serait un facteur de mauvais pronostic chez les patients septiques (219).

La protéine HBP (*Heparin-binding protein* ou azurocidine) est libérée par les PMN, elle modifie la structure du cytosquelette endothélial, et induit la rupture des jonctions intercellulaires, en améliorant la capacité des PMN à passer à travers la barrière des cellules endothéliales. Une étude a montré que la protéine HBP est un bon biomarqueur de l'œdème et du collapsus vasculaire observés dans le sepsis sévère (220). HBP peut être considéré comme un bon marqueur du sepsis sévère (208).

Le TLR à la surface des macrophages et des monocytes reconnaît les endotoxines à l'aide d'une autre protéine membranaire le CD14. De même, le LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*) de la phase aiguë permet à l'endotoxine de se lier au CD14. À des concentrations élevées, la protéine LBP neutralise efficacement le LPS, et peut même être anti-inflammatoire. Comme un récepteur du complexe LPS-LBP, le CD14 peut activer une série de signaux de voies transductionnelles et des cascades de l'inflammation conduisant à une réponse inflammatoire systémique. Récemment, il y a été montré l'intérêt de la mesure de la forme soluble du CD14 en tant que biomarqueur dans le cadre du sepsis. Ce biomarqueur est comparable à la PCT pour le diagnostic de l'infection bactérienne et son taux est corrélé avec le degré de gravité des patients septiques (208, 221-224).

Les biomarqueurs de la dysfonction d'organe

Les scores, APACHE (*Acute Physiology and Chronic Health Evaluation II*) et SOFA (*Sepsis-related Organ Failure Assessment score*) sont utilisés pour évaluer le degré de gravité de la maladie dans les unités de soins intensifs. Les scores APACHE (I, II, III) sont calculés à partir de l'âge du patient ainsi que d'autres paramètres physiologiques de routine (tels que : la fréquence cardiaque, la fréquence respiratoire, le taux

de sodium, le taux de potassium, la créatinine, l'hématocrite, la numération des cellules sanguines et autres). Le score SOFA est basé sur six différents scores pour le système respiratoire, cardiovasculaire, hépatique, rénal, neurologique et de coagulation. Les taux de bilirubine et de créatinine indiquent le dysfonctionnement du foie et des reins respectivement. Cependant, le marqueur biologique le plus largement utilisé comme marqueur de dysfonction d'organe est le taux de lactate dans le sang (208).

Justificatifs du travail

Dans ce chapitre, je me suis intéressée à l'étude du sepsis et du SIRS dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques en utilisant une approche transcriptomique. Les patients atteints d'hémopathies malignes sont traités principalement par chimiothérapie. Ce traitement a comme principal effet secondaire une toxicité médullaire responsable d'une atteinte des trois lignées hématopoïétiques. Tandis que l'anémie et la thrombopénie peuvent être prises en charge par une thérapie transfusionnelle adaptée, un des effets secondaires les plus redoutés est la neutropénie (baisse du nombre de polynucléaires neutrophiles $< 0,5$ G/L) qui favorise les complications infectieuses pouvant aller jusqu'à mettre en jeu le pronostic vital du patient. L'infection est aussi une cause de morbidité, qui a pour conséquence une hospitalisation prolongée, et la consommation d'anti-infectieux (antibiotiques, antifongiques, antiviraux) qui reste coûteuse et parfois toxique. L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques nous offre un modèle quasi expérimental pour l'étude du SIRS et du sepsis.

L'objectif de cette partie a été d'identifier une signature transcriptomique prédictive de la survenue du sepsis et/ou de SIRS dans le cadre de l'autogreffe. Cette signature prédictive pourrait ouvrir de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la prophylaxie antibiotique personnalisée et adaptée au profil de risque spécifique de chaque patient.

Patients, matériels et méthodes

Echantillons biologiques

Les patients

Les patients ont été admis au service d'hématologie de l'hôpital de la Conception — Marseille — pour une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Tous les patients ont moins de 65 ans et ont été suivis au sein du service d'hématologie pour un myélome multiple ou un lymphome de haut grade. La totalité des patients candidats à une auto-CSH sont informés de l'existence du protocole de recherche, et de la possibilité d'y participer. Il leur a été souligné que la participation à cette étude de recherche ne leur portera aucun bénéfice individuel direct. Avant l'autogreffe de CSH, les patients étaient en rémission

complète ou partielle de leur maladie après une chimiothérapie conventionnelle. Les critères d'inclusion sont les mêmes critères que l'éligibilité à une autogreffe de CSH. Soixante-six patients ont été inclus dans cette étude et les échantillons de vingt et un patients ont été analysés.

Aspects légaux et éthiques

Le projet s'inscrit dans le cadre d'une recherche biomédicale interventionnelle, au sens de l'article L.1121-1 portant sur un produit mentionné à l'article L.5311-0 du code de la santé publique. Il est soumis au nouveau dispositif réglementaire qui s'applique aux recherches « organisées et pratiquées sur l'être humain en vue du développement des connaissances biologiques et médicales », à savoir la loi de santé publique n° 2004-806 du 9 août 2004 relative à la politique de santé publique et ses décrets d'application du 27 août 2006, visant à mettre la réglementation française en conformité avec le droit européen.

L'étude a été approuvée par le comité de protection des personnes de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM), et eut un avis favorable de l'autorité compétente représentée par la direction générale de la santé. Un consentement a été signé par chaque patient. Cette recherche a été conduite selon les bonnes pratiques cliniques, constituant un ensemble d'exigences de qualité dans le domaine éthique et scientifique.

La chimiothérapie de conditionnement

Le conditionnement d'intensification chimiothérapeutique est le melphalan (200 mg/m^2) pour les patients atteints de myélome et BEAM pour les patients atteints de lymphome. Le conditionnement BEAM se compose d'une cure de carmustine à 300 mg/m^2 durant 6 jours, de l'etoposide à 150 mg/m^2 durant 5 jours, deux fois par jour, d'une cure de cytarabine 200 mg/m^2 durant 5 jours, deux fois par jour et une cure de melphalan 140 mg/m^2 durant un jour, suivi une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques.

La collection des cellules souches hématopoïétiques

La mobilisation des cellules souches hématopoïétiques périphériques exige l'administration de facteurs de croissance (G-CSF dans la majorité des cas). Deux procédures ont été utilisées pour mobiliser les CSH, soit par injection de $10 \text{ } \mu\text{g/kg/jour}$ de G-CSF quand la moelle osseuse est dans un état physiologique, ou par mobilisation chimiothérapeutique en injectant une dose de cyclophosphamide (entre $1,5 - 4 \text{ g/m}^2$) associée à $5 \text{ } \mu\text{g/kg/jour}$ de G-CSF. Quand la collection des CSH échoue, une dose de plerixafor – $240 \text{ } \mu\text{g/kg}$ - (SDF-1/CXCR4 interaction inhibitor) peut être utilisée et aide à la collection des CSH chez les patients non mobilisables. Les cellules sont alors congelées à raison de $6 \times 10^6 \text{ CD34}^+/\text{kg}$ de patients.

Le modèle expérimental

Trois échantillons sanguins par patients ont été collectés. Le premier, le jour de l'hospitalisation et avant le conditionnement chimiothérapeutique (T1), le deuxième, après le conditionnement chimiothérapeutique et avant la réinjection de cellules souches (T2), et le dernier, après la sortie d'aplasie (T3). **Figure 10**

La récolte des PBMC

Le plasma est séparé du reste du sang par centrifugation pour de potentielles expériences complémentaires. Le sang concentré est alors dilué et les cellules mononuclées du sang périphérique (PBMC) sont collectées par gradient de densité (*Ficoll-Hystopaque density-gradient*) (225). Les cellules sont congelées à -80°C en culot sec.

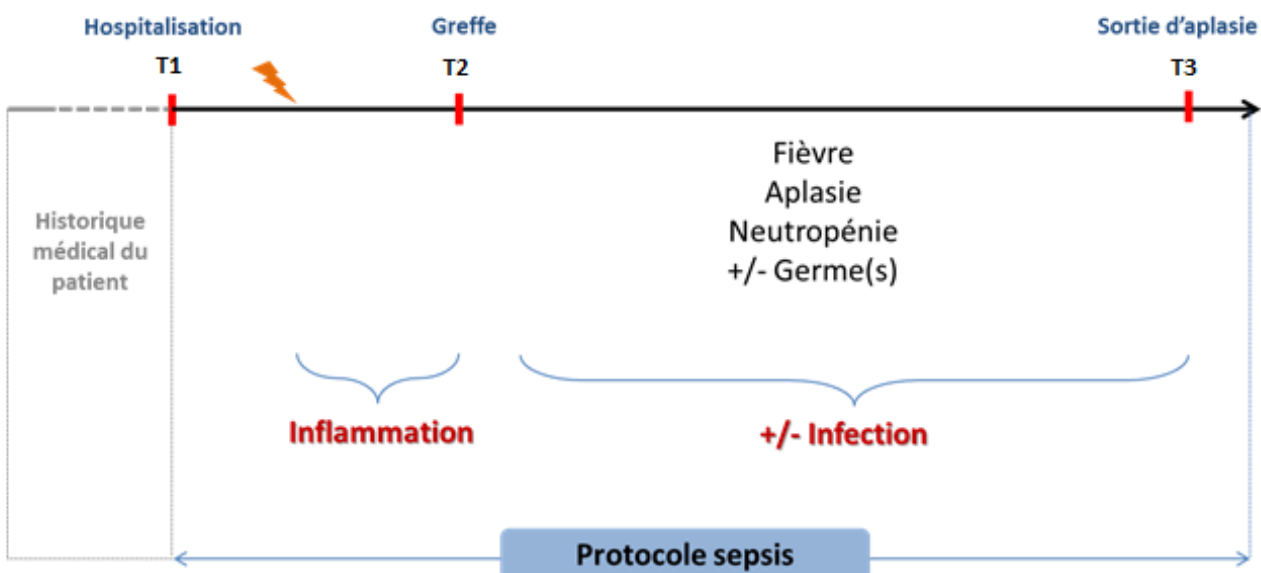


Figure 10 : Schéma récapitulatif du modèle expérimental

Chaque patient a des antécédents médicaux, avant l'autogreffe de cellules souches, le diagnostic de l'hémapathie maligne est posé, un traitement primaire pour la transplantation de cellules souches autologues la réduction de la tumeur est admis. Les patients inclus dans le protocole sont des patients atteints de myélome ou de lymphome. Après aphaérèse qui consiste à prélever des cellules souches du sang périphérique puis la congélation des cellules, les patients sont hospitalisés, ils reçoivent chimiothérapie à haute dose, deux chimiothérapies sont administrées, le Melphalan pour les patients atteints de myélome et le BEAM pour le patient de lymphome, après la chimiothérapie, les cellules souches déjà congelées sont injectées au patient. La chimiothérapie induit une inflammation, cette inflammation induit de la fièvre, alors que la neutropénie peut se compliquer d'infection, infection qui peut être suspectée ou confirmée

Protocole évalué et accepté par le Comité pour la protection des personnes — CPP —

T1 : Avant la chimiothérapie à haute dose, T2 : Après la chimiothérapie à haute dose et avant la réinjection des cellules souches, T3 : Après la sortie d'aplasie

Extraction de l'ARN, quantification et contrôle qualité

Selon le nombre de PBMC, deux kits d'extraction d'ARN ont été utilisés, le RNeasy mini kits de Qiagen (Qiagen, Valencia, California) qui accepte jusqu'à 10 millions de cellules, et le RNeasy midi kit de Qiagen, qui accepte jusqu'à 100 millions de cellules. Les ARN ont été extraits selon le protocole fourni par Qiagen. La lyse et l'homogénéisation complète des cellules sont réalisées par pipetage et seringue à insuline dans un tampon de lyse contenant du β -mercaptoéthanol et de l'isothiocyanate de guanidine, agent dénaturant des protéines et inhibiteur des RNases. Le lysat contenant les ARN a été ensuite mélangé à de l'éthanol 70 % est déposé sur la colonne contenant une membrane de silice, ainsi les ARN se fixent spécifiquement à la membrane après centrifugation. Les ARN ont été ensuite lavés trois fois successivement, par deux tampons différents. Le premier contient un sel de guanidine ainsi que de l'éthanol qui permet de supprimer les molécules telles que les protéines et les glucides. Le second permet d'éliminer les traces de sels. L'élution des ARN a été faite dans de l'eau *RNase free*.

Les ARN ont été quantifiés par mesure de densité optique en utilisant le NanoDrop 1000 (NanoDrop Technologies, San Diego, CA). La densité optique est mesurée à 260 et à 280 nm et les rapports « 260/280 » et « 260/230 » (> 1,8) indiquent la pureté de l'ARN.

La qualité de l'ARN extrait est vérifiée par « Agilent Bioanalyzer 2100 » (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Le principe est de séparer les ARN en fonction de leur taille. Cela permet de détecter d'éventuelles dégradations mais aussi la contamination à l'ADN génomique. Un score sur une échelle de 0 à 10 est calculé automatiquement, il est attribué à chaque échantillon. Cette valeur correspond au score d'intégrité de l'ARN (RIN : *RNA Integrity Number*). En dessous de 7, l'échantillon n'est pas utilisé. Pour les échantillons qui présentent une contamination à l'ADN génomique, un traitement à la *DNase RNase Free* a été réalisé en utilisant le kit : *RNase Free DNase Set kit de Qiagen*.

Etude transcriptomique

Les puces à ADN Agilent

Pour l'analyse transcriptomique, la puce *SurePrint G3 Human GE 8x60K v2* d'Agilent est utilisée. Cette dernière offre une grande couverture des gènes et des transcrits, avec une grande sensibilité. La puce comporte huit zones d'hybridation (array), dont chacune 62 976 sondes. Plusieurs sondes du même transcrit sont synthétisées sur la puce qui ciblent différents endroits du gène, celles-ci ont une taille de 60 nucléotides.

L'étude d'expression pangénomique

Le protocole des puces à ADN comporte plusieurs étapes dont : le marquage, la purification de l'ARN amplifié, la quantification de l'ARNc marqué, l'hybridation et le lavage, et enfin l'acquisition des données brutes.

Le marquage

Cent nanogrammes de l'ARN total contenus dans 1,5 µl d'eau ont été marqués en utilisant le kit et le protocole « *One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis : Low Input Quick Amp (LIQA) labeling* ». Un mélange de *Spike* (composé d'ARN de séquences connues) a été ajouté. Celui-ci est considéré comme des contrôles internes de l'expérience. L'amplification et le marquage des ARN se font en deux étapes, la première est la synthèse du ADNc en ajoutant des amorces promotrices T7 et la deuxième en rajoutant une T7 ARN polymérase et de la cyanine-3 CTP.

La purification de l'ARN amplifié

La purification des ARN a été faite sur colonne « *RNeasy mini kit Qiagen* », les ARN sont fixés sur la colonne puis lavés et élués dans de l'eau *RNase free*

La quantification de l'ARN complémentaire (ARNc) marqué

La concentration et le taux d'incorporation de la cyanine-3 ont été mesurés par NanoDrop. Un rendement minimum de 825 ng et une activité spécifique de 6 pmol de cyanine-3 par microgramme d'ARNc sont indispensables pour la suite du protocole.

$$AES(\mu\text{mol Cy3 par } \mu\text{g d'ARNc}) = \frac{\text{Concentration de Cy3 (pmol}/\mu\text{l)}}{\text{Concentration de ARNc (ng}/\mu\text{l)}} * 1000$$

$$\text{Rendement } (\mu\text{g de ARNc}) = \frac{\text{Concentration de ARNc (ng}/\mu\text{l}) * 30 (\mu\text{l})}{1000}$$

L'hybridation et le lavage

Un total de 600 ng d'ARN marqué a été fragmenté puis hybridé sur les puces en formant un sandwich : puce/*gasket slide*. Celui-ci a été placé dans une chambre d'hybridation puis incubé dans un four d'hybridation pendant 17 h à 65 °C sous rotation. Les lames ont été ensuite lavées puis séchées avant l'acquisition des données.

L'acquisition des données

Les lames sont scannées par *Agilent Microarray Scanner*, la fluorescence est mesurée après excitation à des longueurs d'onde allant de 550 à 610 nm. La visualisation des images et les intensités mesurées sont récupérées à l'aide du logiciel *Feature Extraction*.

Analyses bioinformatique

La normalisation des données

La librairie *AgiND* qui est implémentée dans le logiciel *R* a été utilisée pour la normalisation. Elle a été développée pour le diagnostic et la normalisation des puces à ADN du type *Agilent* (tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/AgiND). La normalisation par les quantiles a été utilisée, avec l'objectif d'homogénéiser la distribution des données ainsi que de minorer les variations artéfactuelles inter et intra-puces (64).

Le traitement des données normalisées

Un premier filtre qui sert à supprimer les contrôles a été appliqué. Le deuxième avait pour but de supprimer les gènes qui sont exprimés autour du bruit de fond, dans au moins 80 % des échantillons de chaque groupe.

Les analyses statistiques

Afin de tester l'effet des cofacteurs sur l'expression des gènes (*genre, traitement, infection*), le logiciel *GeneANOVA* a été utilisé pour réaliser une analyse de variance (ANOVA) sur les données normalisées dans le but d'estimer la contribution de chaque facteur sur l'expression des gènes (*gène, genre, traitement, infection*) (226). Le modèle de l'ANOVA globale est donné par la formule suivante :

$$Y = \mu + \beta_G G + \beta_T T + \beta_I I + \varepsilon$$

Ou :

Y : est la variable expliquée, μ : est la moyenne globale, $\beta_G, \beta_T, \beta_I$: sont les coefficients du modèle, G, T, I : sont les variables quantitatives, $\beta_G G$: est l'effet du genre, $\beta_T T$: est l'effet du traitement et/ou la pathologie, $\beta_I I$: est l'effet de l'infection, ε : est l'effet de l'infection et est l'erreur.

L'analyse différentielle des gènes a été réalisée en utilisant *Limma*. *Limma* est une analyse multivariée qui prend en compte l'effet des facteurs testés par l'analyse *ANOVA* dans notre cas.

Pour mettre en évidence l'impact de l'« *infection* » sur l'expression des gènes visuellement sur le dendrogramme, des intensités d'expression de gènes ont été calculées en soustrayant l'effet des facteurs « *genre* » et « *traitement* ». Le modèle et un exemple de calcul sont résumés dans la **figure 11**.

Le modèle :

$$Y = \alpha + \beta_T.T + \beta_G.G + \beta_I.I + \varepsilon$$

Y : Variable expliquée

α : Moyenne = constante

β : Coefficient

T | G | I : Facteur Traitement | Genre | Infection

$\beta_x.\theta$: Effet du facteur θ

ε : l'erreur

Calcul de tous les résidus

$$\alpha + \beta_I.I + \varepsilon = Y - (\beta_T.T + \beta_G.G)$$

$$\hat{Y} = Y - (\beta_T.T + \beta_G.G)$$

Figure 11 : Le modèle de calcul des données ajustées sur l'effet des cofacteurs

Un clustering hiérarchique non supervisé a été réalisé sur les données normalisées et ajustées sur la médiane (gènes et échantillons) selon leurs expressions en utilisant *TMeV* (*Tigr MultiExperiment Viewer* <http://www.tm4.org/mev>). La corrélation de *Pearson* a été utilisée, les clusters ont été groupés sur la base de « *linkage average method* ». **Figure 12**

Validation de la signature transcriptomique

Le SVM (*Support Vector Machines*)

Le *SVM* est un ensemble de méthodes d'apprentissage qui nous ont permis de prédire la classification des patients de la cohorte selon la signature transcriptomique prédictive trouvée. Le *SVM* utilise un ensemble d'entraînement dans lequel les gènes sont reliés aux autres par fonction ou des échantillons appartenant à un groupe sont considérés comme un exemple positif et les gènes ou les échantillons n'appartenant pas à cette classe sont considérés comme exemples négatifs. Dans notre cas, nous avons considéré deux groupes d'échantillons, le groupe sepsis/SIRS et le groupe patient qui ne développent pas de fièvre. Ils ont été combinés dans un ensemble d'entraînement pour *SVM* pour distinguer les membres de la classe, des membres n'appartenant pas à la classe (sur la base des données d'expression). Après avoir pris connaissance des caractéristiques d'expression de la classe, *SVM* peut alors identifier et classer chaque échantillon selon son profil d'expression (227, 228). L'outil *SVM* utilisé est implémenté dans le logiciel *TMeV* (*MeV : MultiExperiment Viewer* <http://www.tm4.org/mev/>).

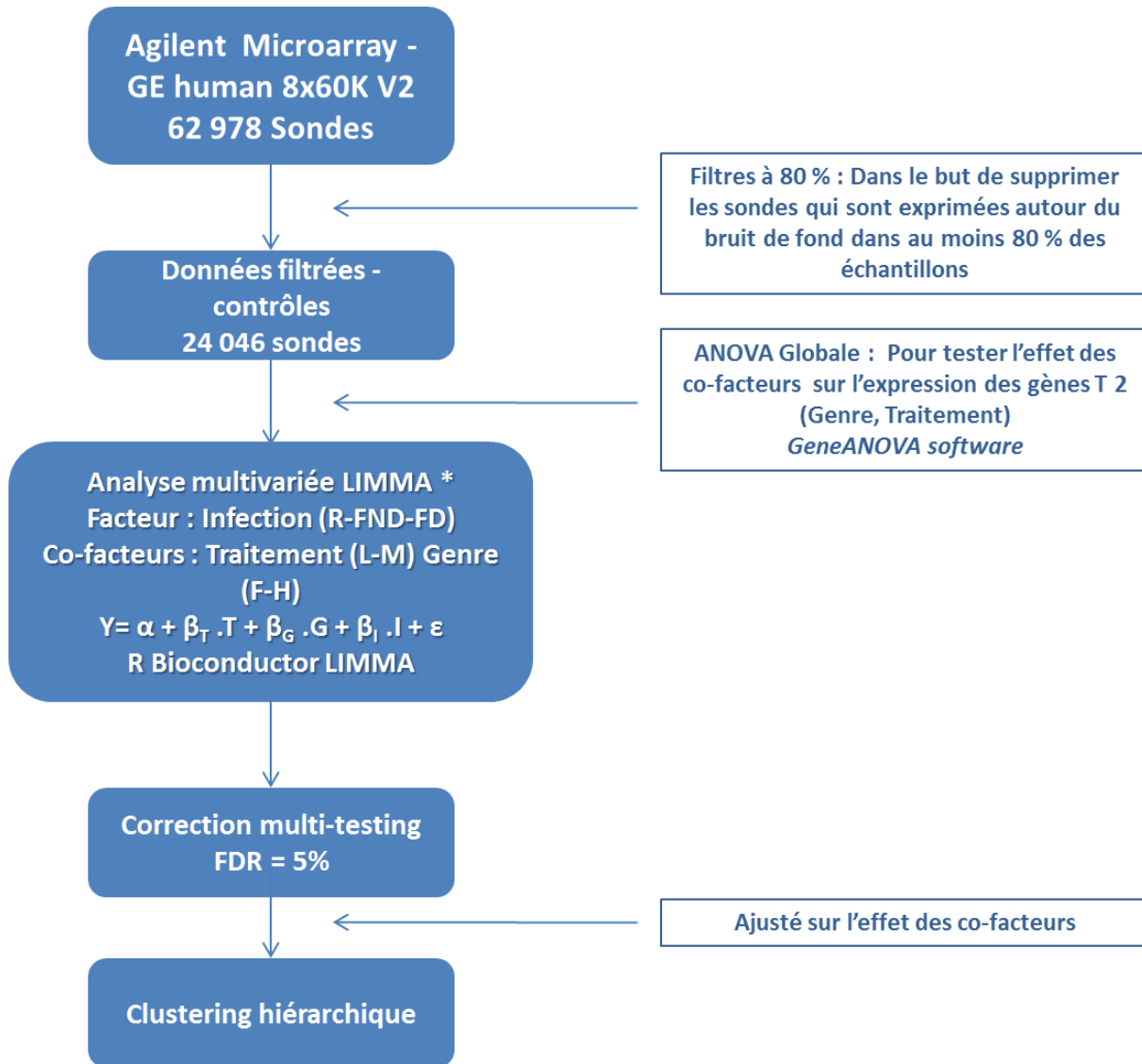


Figure 12 : Pipeline d'analyse de l'expression des gènes

Les données brutes sont filtrées et les contrôles supprimés. Une analyse de variance est réalisée afin de tester l'effet des facteurs sur l'expression des gènes, ces facteurs sont alors intégrés dans une analyse multivariée dans le but de définir des gènes différentiellement exprimés. Une correction des tests multiples est réalisée et un FDR de 5 % a été fixé. Un ajustement de l'effet des cofacteurs sur l'expression des gènes permettra de mettre en évidence uniquement l'effet de l'infection sur le dendogramme, puis un clustering hiérarchique est appliqué sur des données ajustées.

La PCR quantitative à haut débit

Cette partie a pour but de valider la signature transcriptomique trouvée en microarrays.

La RT-PCR a été réalisée en utilisant le protocole du *SuperScript VILO MasterMix*. 60 ng d'ARN de chaque échantillon ont été rétrotranscrit en utilisant 4 µl de *SuperScript VILO MasterMix* et de l'eau *RNase Free* pour un volume final de 20 µl. Le mélange est incubé 10 min à 25 °C, 60 min à 42 °C puis 5 min à 85 °C.

La PCR quantitative a été réalisée à l'aide de la technologie de la q-PCR microfluidique à haut débit en utilisant le *Biomark* (Fluidigm) et la puce *FlexSix*. Une étape de préamplification a été réalisée pour chaque échantillon. Un microlitre de chaque *primer* 100 µM est ajouté à 176 µL d'eau (12 couples de *primers*) pour une concentration finale de 500 nM. 0,5 µL du mélange de primer est ajouté à 1 µL du *PreAplification mix* et 1,25 µL de l'ADNc ainsi que de l'eau pour un volume final de 5 µL. Une étape de *holding* est réalisée durant 2 min à 95 °C, suivi par 20 cycles d'amplification : 15 s à 95 °C et 4 min à 60 °C. L'étape de préamplification est suivie par une étape de traitement à l'exonucléase. 2 µL d'exonucléase I (4 U/µL) ont été ajoutés à chaque échantillon préamplifié. La digestion a été réalisée durant 30 min à 37 °C et l'inactivation durant 15 min à 80 °C. Le produit final est dilué 5 fois en rajoutant 18 µL de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). Dans un deuxième temps une RT-qPCT 12 x 12 (12 échantillons x 12 couples *primers*) a été réalisée pour chaque couple de primer et pour chaque échantillon en utilisant la puce *FlexSix*. De l'*EvaGreen* a été utilisé en suivant le protocole fourni par *Fluidigm*. Les valeurs de Ct ont été calculées à l'aide du logiciel *Biomark Real-Time PCR Analysis* (*Fluidigm*). Les séquences des *primers* utilisés sont résumées dans le tableau suivant :

Gene	R	F
SLC18B1 - C6orf192	5'-GCAGGACAGCTTTTCAGTATCAC-3'	5'-CCTGGCCTTAAACATCACCG-3'
CNN3	5'-GGCTGGCTCCTTTATTAGTGC-3'	5'-AAGCTGGCCAAAGTGTAATTG-3'
MTMR8	5'-ACTTAAGTGGGGAGAGGGGT-3'	5'-GAGGCAGACTACTCCAAGCA-3'
GPAT2	5'-GCCAGAGAAGCCTACATCA-3'	5'-CATCAGAAGCTCCTGGGGGA-3'
PLCG1	5'-ACAGGAATCTTGGTGCTTCAGT-3'	5'-CAGGGAGGTACATGGCCAAT-3'
ANKRD42	5'-CGCCATGAAAAGCTGCATA-3'	5'-GGAGCAAATCTGACAGCCCA-3'
ATC B	5'-ATGGCATGGGGAGGGCATA-3'	5'-GCCGTACCACTGGCATCGTGA-3'
GAPDH	5'-CCACCACCTGTTGCTGTGA-3'	5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
EDAR	5'-ACATGAGCTGACACTGGCTG-3'	5'-TGAGTGTGCCATTCCAGGAT-3'
TRAV3	5'-GCCTCGGTTGGGGTATTGAA-3'	5'-CTCAGCCGGAAGATCAGGTC-3'
CHAT	5'-CAGCAGAACATCTCCGTCGT-3'	5'-ATGGCCATTGACAACCACCT-3'
LOC100289230	5'-GTGCTTCCGGAAAACGTAAA-3'	5'-TCCTGTGCCCGTAATTTCTC-3'

Résultats

Analyse des patients et sélection des échantillons

Soixante-six patients ont été inclus dans le protocole, parmi ces patients, seuls les échantillons de 21 patients validaient les critères moléculaires pour l'analyse transcriptomique. 6 patients ont très bien répondu à leur conditionnement chimiothérapeutique et n'ont pas développé d'inflammation ni de fièvre et donc pas de sepsis, 14 patients ont développé au moins un SIRS, dont 5 ont développé un sepsis avec une infection documentée, et 1 patient a développé un choc septique. Les données cliniques des patients sont résumées dans la **table 1**.

Identification de la signature transcriptomique

Au total, les échantillons de 21 patients ont été analysés sur des puces *Agilent SurePrint Human GE 8 x 60K v2*. Après 17 h d'hybridation, les puces ont été lavées, scannées, et les images ont été alors récupérées afin d'avoir une première idée de la qualité des expériences (saturation, absence de signal...). Les comptes rendus de contrôle qualité ont été analysés afin de vérifier la qualité de chaque zone d'hybridation. Tous les échantillons ont passé cette seconde vague de critères de qualité. Les données brutes ont été ensuite transformées en *log2* et normalisées par la méthode des quantiles. Un total de 24 046 sondes a une expression supérieure au bruit de fond.

Le « *traitement* » et la « *pathologie* » sont des facteurs confondants. En effet, les patients atteints de lymphomes sont traités par BEAM et les patients atteints de myélomes sont traités par melphalan. Afin de savoir si c'est le facteur « *pathologie* » ou le facteur « *traitement* » qui a un effet sur l'expression des gènes, une analyse ANOVA deux facteurs (Facteur 1 : myélome/melphalan ; Facteur 2 : lymphome/BEAM) a été réalisée, sur les données normalisées du T1 (les échantillons de patients le jour de l'hospitalisation et avant chimiothérapie) **Figure 12**. Cette analyse a pour but de voir un profil d'expression différentielle entre les patients atteints de myélome et traités par melphalan et les patients atteints de lymphome et traités par BEAM. Une deuxième analyse statistique a été réalisée, une analyse SAM deux classes (Classe 1 : myélome/melphalan ; Classe 2 : lymphome/BEAM) sur les données normalisées du temps T1. 10 000 permutations ont été générées au hasard afin de calculer le FDR. Que ce soit pour l'analyse ANOVA ou pour l'analyse SAM, aucun gène différentiellement exprimé n'a été retrouvé.

Références de base et caractéristiques démographiques		n = 21
Age médian des patients		58 ans Intervalle [32-68]
Le genre		
Homme		14 (67%)
Femme		7 (33%)
Hémopathie maligne		
Lymphome		2
Myélome multiple		19
Conditionnement chimiothérapeutique		
BEAM		2
Melphalan à haute dose		19
Nombre de CD 34⁺ injectés (x 10⁶ / kg)		2,82 Intervalle [0,751-3,64]
Durée moyenne de la fièvre		3 jours Ecart type [-4,30 - 4,30]
Durée moyenne de la neutropénie		3 jours Ecart type [-2,90 - 2,90]
Les infections bactériennes documentées		
Bactéries Gram-positive		6 (30%)
<i>Staphylococcus hominis</i>		75%
<i>Staphylococcus epidermidis</i>		1
<i>Staphylococcus aureus</i>		2
<i>Streptococcus mitis</i>		1
<i>Clostridium difficile</i>		1
Bactéries Gram-negative		25%
<i>Escherichia coli</i>		1
<i>Klebsiella pneumonia</i>		1
Les infections fongiques documentées		0 (0%)
Classification des patients		
Pas de fièvre		6 (29%)
SIRS		9 (42%)
Sepsis avec documentation +		5 (24%)
Sepsis sévère		1 (5%)
Choc septique		0 (0%)

Table 1 : Les caractéristiques et données cliniques des patients

Afin de mesurer l'impact de chaque cofacteur (*genre, traitement, infection*) sur la variation de l'expression des gènes, une analyse de variance dite : globale a été réalisée. À partir du score F de l'ANOVA, une p-valeur a été calculée pour chaque facteur. Pour chacun des facteurs testés, les p-valeurs sont inférieurs à 0,000 1 (**Table 2**). Le score F du facteur « *infection* » étant le plus élevé (F = 890,96). Le facteur « *Gène* » a un score de 115,45 et une p-valeur <0,000 1. Le facteur « *traitement* » et le facteur « *genre* » ont un impact sur la variation de l'expression des gènes avec un score F de 176,21 et 156,07, respectivement.

Facteur	Somme des carrés	DF	Variance	Score F	p-valeur
Gène	3476905,49	28114	123,67	115,45	< 10 ⁻⁴
Infection	954,39	1	954,39	890,96	< 10 ⁻⁴
Traitement	188,75	1	188,75	176,21	< 10 ⁻⁴
Genre	167,18	1	167,18	156,07	< 10 ⁻⁴
Résidu	602328,16	562297	1,07	-	-
Total	4080543,97	590414	6,91	-	-

Table 2 : Résultats de l'analyse ANOVA globale

DF : Degrees of Freedom

Dans le but de définir les gènes différentiellement exprimés entre les groupes d'échantillons de patients qui ont développé sepsis et/ou un SIRS et les patients qui n'ont pas développé de fièvre, une analyse LIMMA est réalisée en incluant les cofacteurs identifiés dans l'analyse ANOVA : le « *genre* » et le « *traitement* ». 11 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés avec un FDR fixé à 5 % : CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, LOC10289230, XLOC-005643 (**Table 3**).

Gène	Nom complet	Id Ensembl	Coordonnées chromosomiques	Sens
SLC18B1 / C6ORF192	solute carrier family 18 member B1	ENSG00000146409	Chr 6: 132,769,370-132,798,553	-1
CNN3	calponin 3	ENSG00000117519	Chr 1: 94,896,949-94,927,278	-1
MTMR8	myotubularin related protein 8	ENSG00000102043	Chr X: 64,268,081-64,395,431	-1
PLCG1-AS1-001 (miscRNA) / TOP1-AS1	PLCG1 antisense RNA 1	ENSG00000226648	Chr 20: 41,098,329-41,138,003	-1
CHAT	choline O-acetyltransferase	ENSG00000070748	Chr 10: 49,609,095-49,665,104	+1
EDAR	ectodysplasin A receptor	ENSG00000135960	Chr 2: 108,894,471-108,989,372	-1
ANKRD42	ankyrin repeat domain 42	ENSG00000137494	Chr 11: 83,193,739-83,260,694	+1
GPAT2	glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial	ENSG00000186281	Chr 2: 96,021,946-96,039,451	-1
ENST0000039042 5/ TRAV3	T cell receptor alpha variable 3 (gene/pseudogene)	ENSG00000211777	Chr 14: 21,723,713-21,724,321	+1
LOC100289230	NS	NS	Chr 5: 98,929,134-98,931,009	+1
XLOC_005643 LNC RNA	linc-CMAHP-1:1 / linc- FAM65B-1/RP3-425P12.2	ENSG00000230372	Chr 6: 25,061,853-25,063,735	-1

Table 3 : Les caractéristiques des gènes différentiellement exprimés
Ch : Chromosome ; +1 : sens positif, de 3' à 5' ; -1 : sens négatif, de 5' à 3'

Pour mettre en évidence sur le dendrogramme (**Figure 14**), l'effet de l'infection (facteur *infection*), des données d'expression ont été calculées, à partir du modèle de la **figure 10**. Un exemple de calcul des données ajustées sur l'effet des cofacteurs est présenté dans la **figure 13**.

Données de patient :

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Traitement	L	M	M	L
Genre	F	H	F	H
Infection	R	FND	FD	FND
Traitement	1	0	0	1
Genre	1	0	1	0

Données analyse LIMMA

Genès	coefficients.Traitement	coefficients.Genre
Gene A	0,588814164	0,712441085
Gene B	0,005665503	0,796616578
Gene C	-0,016956126	0,298016651
Gene D	-0,083627727	0,866600131

Données d'expression

Genès	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Gene A	5,90682654	6,15627768	6,3156864	6,80658488
Gene B	6,34615061	5,17558444	5,16617428	5,58088832
Gene C	5,42306608	5,15317858	5,17664915	5,54012846
Gene D	5,7882734	5,16705647	5,15417065	6,37423868

Exemple : pour le Patient 1 | Gene A :

$$\hat{Y} = Y - (\beta_T \cdot T + \beta_G \cdot G)$$

$$\hat{Y} = 5,90682654 - (0,588814164 * 1 + 0,712441085 * 1)$$

$$\hat{Y} = 4,605571291$$

Figure 13 : Un exemple de calcul des données d'expression ajustées sur l'effet des cofacteurs

Avec : L = lymphome, M=myélome, F=femme, H=homme, R=pas de fièvre, FND=fièvre non documentée, FD=fièvre documentée, T=traitement, G=genre.

Un clustering hiérarchique non supervisé a été réalisé en utilisant les expressions ajustées sur l'effet des cofacteurs, des 11 gènes identifiés par l'analyse statistique, afin de construire le dendrogramme. Les échantillons sont alors groupés par la similarité de leur profil d'expression. Les profils d'expression des gènes sont groupés sur l'axe horizontal et les échantillons sur l'axe vertical. Sur le dendrogramme (**Figure 16**), le clustering hiérarchique sépare en deux groupes distincts, les patients atteints de sepsis et/ou de SIRS et les patients qui ne développent pas de fièvre. Sur les 11 gènes identifiés, 10 gènes sont sous exprimés chez les patients qui ne développent pas de fièvre par rapport à ceux qui développent un sepsis et/ou de SIRS (CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, LOC10289230) et un gène surexprimé (XLOC-005643) chez les patients qui ne développent pas de fièvre par rapport à ceux qui développent un sepsis et/ou de SIRS.

Nous n'avons pas eu de résultats pour les enrichissements en termes fonctionnels et cela est dû au petit nombre de gènes différentiellement exprimés identifiés. Une recherche bibliographique gène par gène a été réalisée afin d'assimiler une fonction aux gènes retrouvés, identifier le lien possible avec l'infection ainsi que potentiellement le lien entre eux.

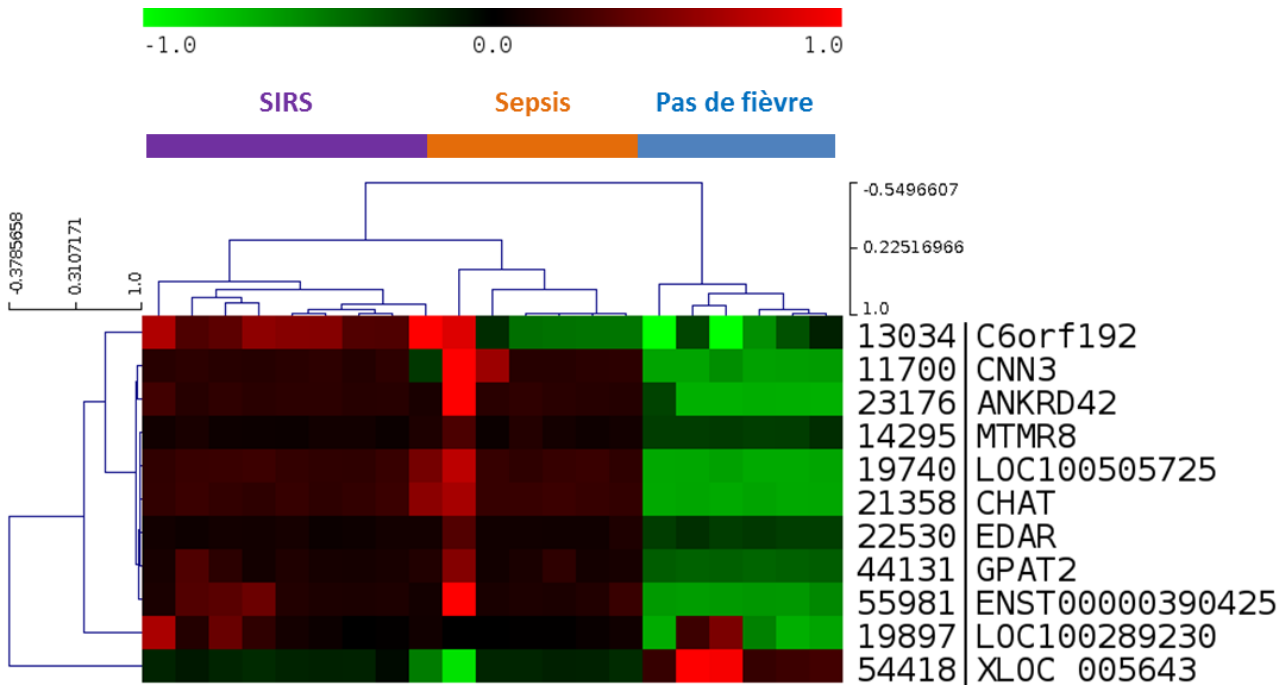


Figure 14 : Profil d'expression des gènes ajustés sur l'effet des cofacteurs

Chaque ligne représente un gène et chaque colonne un échantillon

Rouge : Gène surexprimé

Vert : Gène sous exprimé

La validation de la classification des échantillons selon leur profil d'expression

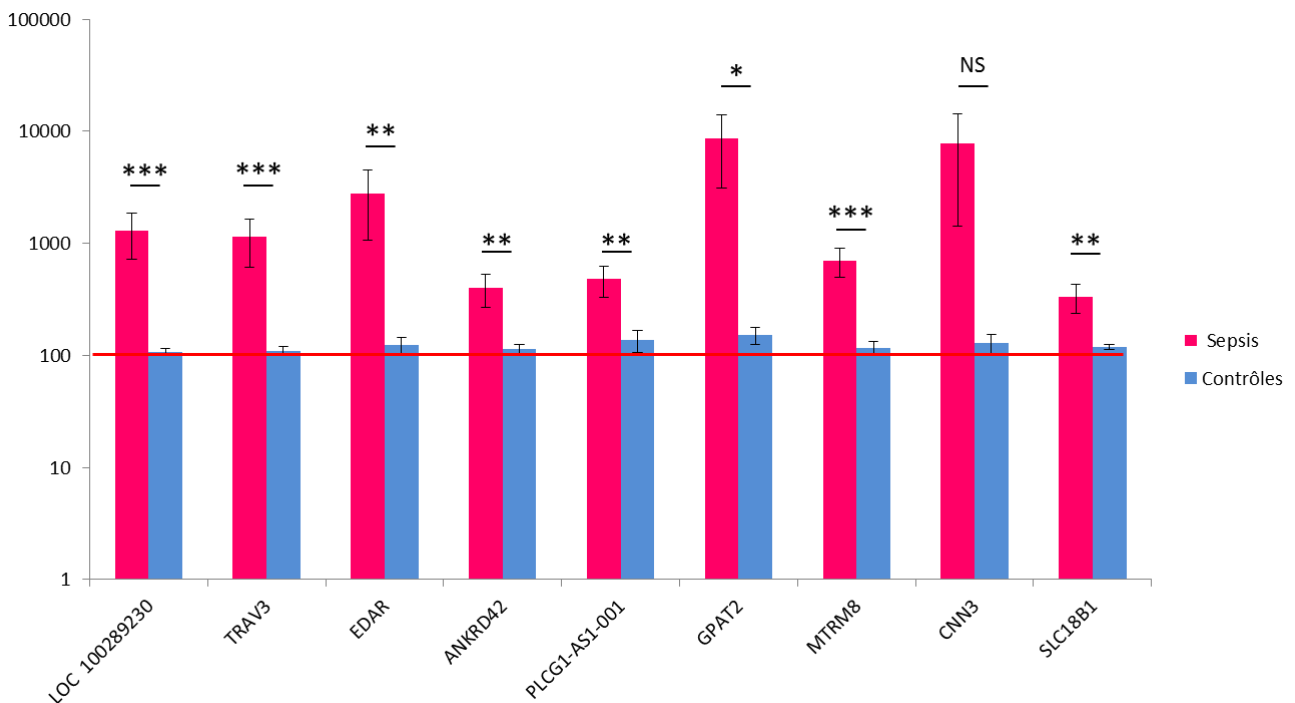
SVM et la cross validation one -leave-one out ont été utilisés pour valider la classification des patients selon leurs profils d'expression. Les 21 échantillons ont été divisés en deux groupes, le premier contenait 15 échantillons : l'ensemble des patients atteints de sepsis et/ou de SIRS, le second contenait 6 échantillons : l'ensemble des patients qui n'ont pas développé de fièvre. Le groupe de patients atteints de sepsis et/ou de SIRS est considéré comme le groupe positif et le second comme étant le groupe négatif. La totalité des 15 patients atteints de sepsis/SIRS (du groupe positif), ont été classés dans le groupe positif (Vrais positifs = 15) et aucun échantillon du groupe négatif (échantillons de patients qui ne développent pas de fièvre) n'a été classé dans le groupe positif (Faux négatifs = 0). Les 6 échantillons du groupe négatif (patients qui ne

développent pas de fièvre) ont été classés dans le groupe négatif (Vrais négatifs = 0) et aucun des échantillons négatifs n'a été classé dans le groupe positif (Faux positifs = 0).

La validation de la signature transcriptomique par RT-qPCR

Dans le but de confirmer les résultats d'expression par microarray, une RTq-PCR de neuf gènes composant la signature transcriptomique a été réalisée. L'expression de LOC 100289230 chez les patients atteints de sepsis et/ou de SIRS par rapport à ceux qui ne développent pas de fièvre est différentielle avec un p-valeur de 0,003 ; celle de TRAV 3 avec une p-valeur de 0,004 ; celles de EDAR, PLCG1-AS1-001, GPAT2, MTRM8, CNN3 et de SLC18B1 avec des p-valeurs de : 0,01 ; 0,01 ; 0,01 ; 0,05 ; 0,009, 0,09 et 0,01, respectivement.

Figure 15.



Figures 15 : Validation de la signature transcriptomique par RT-qPCR

Expression relative des gènes composant la signature transcriptomique par rapport aux à l'expression des gènes de patients qui ne développent pas de fièvre (contrôles)

** = 0,05, ** = 0,01, *** ≤0,01, NS = non significatif*

La validation de la signature transcriptomique dans une cohorte de validation indépendante

Afin de valider, la robustesse de la signature transcriptomique prédictive trouvée, une RT-q-PCR a été réalisée sur les échantillons de 10 patients atteints d'hémopathies malignes dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (cohorte indépendante). Les Ct ont été normalisés sur l'expression de la GAPDH, puis les $\Delta\Delta Ct$ ont été calculés par rapport à une moyenne théorique calculée à partir de données d'expression de patients qui n'ont pas développé de fièvre (pas d'infection) dans le même cadre. Les données d'expression relative sont ensuite calculées. L'expression relative des échantillons : de UPN1 à UPN9 sont au-dessus de seuil 100 %. Ce seuil a été délimité en fonction de l'expression des gènes des échantillons de référence (patients qui n'ont pas développé de fièvre, d'infection dans le cadre des autogreffes). Seule la majorité de l'expression relative des gènes de l'UPN 10 est au niveau d'expression de la moyenne de référence. Aucun test statistique n'a été effectué au vu du nombre faible de replicats techniques (2 replicats par échantillons et par gène), **Figure 16**.

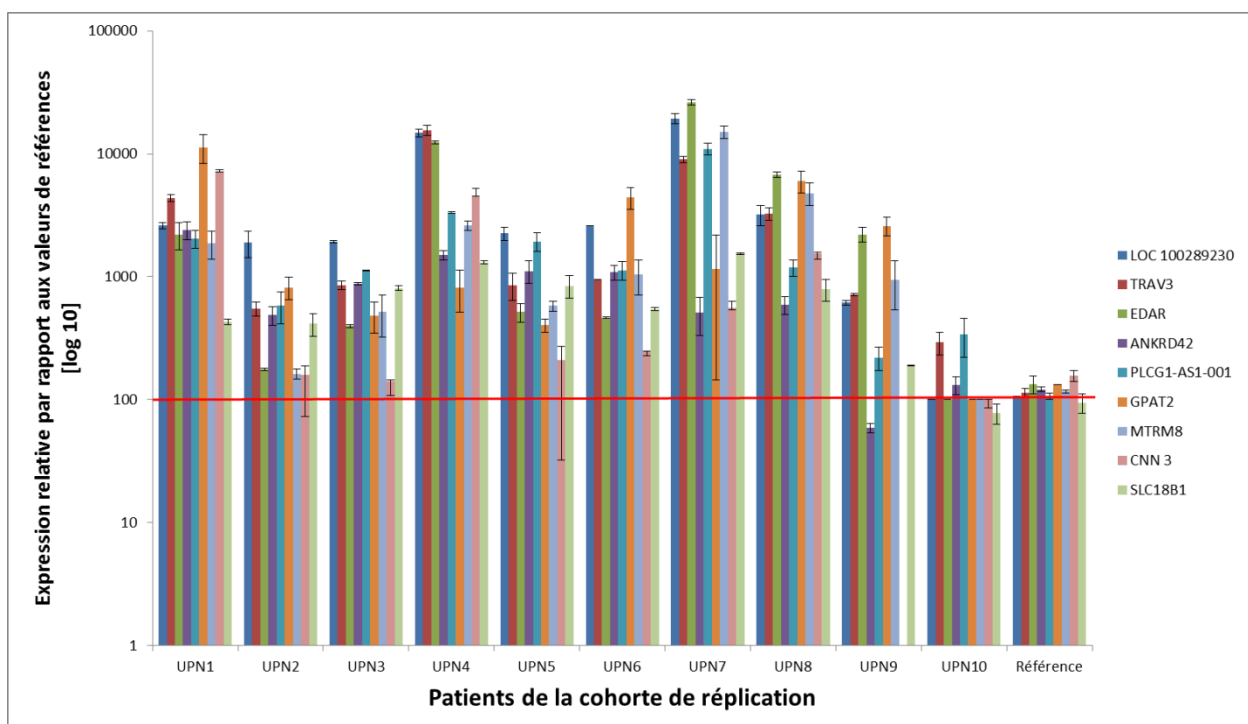


Figure 16 : Niveau d'expression des gènes composant la signature transcriptomique dans une cohorte de validation indépendante

Représentation du niveau d'expression des gènes composant la signature transcriptomique en RT-q-PCR en utilisant les échantillons de 10 patients d'une cohorte de répliation indépendante que celle de l'étude transcriptomique. L'expression est normalisée sur l'expression de la GAPDH (gène de ménage) et celle-ci est relative à une valeur de référence théorique (calculée à partir de la moyenne de l'expression des gènes de la signature transcriptomique d'échantillons de patients qui n'ont pas développé de fièvre)

(UPN : unique patient number).

Discussion

La première difficulté de l'étude a été d'équilibrer les groupes d'étude. En effet 80 % des patients atteints d'hémopathies malignes candidats à l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, développent au moins de la fièvre après intensification chimiothérapeutique. Cela engendre un déséquilibre dans la composition des groupes (entre les patients atteints de sepsis et/ou de SIRS et ceux qui ne développent pas de fièvre). La seconde difficulté a été d'avoir assez d'échantillons de patients pour l'étude transcriptomique. La chimiothérapie à haute dose est une chimiothérapie myéloablative qui a pour but de détruire les cellules de la moelle osseuse ainsi que du sang périphérique. Après intensification chimiothérapeutique, nous récoltons très peu de cellules au moment du prélèvement T2 (après chimiothérapie et avant la greffe) et spécialement dans le cas du lymphome ou la chimiothérapie (BEAM) est plus longue et plus agressive que dans le cas du myélome. Après coloration au bleu de *Trypan*, et observation sous microscope, souvent beaucoup de débris cellulaires et de cellules mortes sont observés.

Le nombre d'échantillons de patients diminué à chaque étape du protocole, en effet le prélèvement du T2 (après chimiothérapie et avant la greffe) est un temps critique et souvent très peu de cellules sont récoltées, et quand une quantité suffisante de cellules est récoltée, très peu d'ARN est extrait, et dans le cas où la quantité d'ARN est suffisante, ce dernier est altéré et donc ne passe les contrôles de qualité requis.

C'est pour cela qu'après 4 ans et demi de récolte d'échantillons, étude a été quand même réalisée sur un petit nombre d'échantillons, cependant, celle-ci nous a quand même permis d'identifier une signature transcriptomique différentielle entre les patients sepsis et/ou de SIRS et les patients ne développant pas de fièvre (contrôles). Dans le protocole hospitalier soumis aux commissions, un 4^e temps de prélèvement a été prévu au moment du pic fébrile, ce temps serait informatif de l'état infectieux du patient. Sauf que, la fièvre se manifeste en moyenne 48h après la greffe, et en 48 h, la reconstitution hématologique n'est pas encore faite, et les patients sont toujours en neutropénie profonde. C'est pour cela que seuls trois prélèvements ont été réalisés (le premier ; avant la chimiothérapie, le second après la chimiothérapie et avant la greffe et le dernier ; à la sortie de l'aplasie).

Dans le protocole, les patients atteints de myélomes reçoivent le melphalan en tant que chimiothérapie de conditionnement et les lymphomes reçoivent le BEAM. Les deux facteurs traitement et pathologie sont liés (un traitement pour une pathologie), ils sont alors considérés comme facteurs confondants. Dans le but d'évaluer l'effet de chacun des facteurs « *traitement* » et « *pathologie* » sur l'expression des gènes, j'ai réalisé deux analyses statistiques, une ANOVA deux facteurs (patients atteints de lymphome vs. patients atteints de myélome) et une analyse SAM deux classes (patients atteints de lymphome vs. patients atteints de myélome) sur les données normalisées du T1 (avant chimiothérapie). À ce temps-là, les patients

n'avaient pas encore reçu de chimiothérapie de conditionnement, et seul l'effet de la pathologie est présent. Pour les deux analyses, aucun gène différentiellement exprimé n'est retrouvé, autrement dit, le profil d'expression des cellules mononuclées circulantes est le même pour les patients atteints de myélome et les patients atteints de lymphome. Nous avons conclu alors que c'est le traitement qui a un effet sur l'expression des gènes et non pas la pathologie.

La diversité des caractéristiques des patients (homme, femme, myélome, lymphome...) dans le modèle de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, nous oblige à tester l'effet de chaque facteur afin de prendre en considération l'effet de tous les cofacteurs et mettre en évidence juste l'effet du facteur voulu, dans notre cas l'effet de l'infection. Les patients atteints de myélome et de lymphomes ne reçoivent pas le même conditionnement chimiothérapeutique, melphalan pour les myélomes et BEAM pour les lymphomes. De plus, la durée des traitements est différente pour les deux chimiothérapies, et le BEAM étant plus agressif et de plus longue durée que le melphalan seul. D'autre part, il a été décrit dans la littérature que le genre était un facteur important dans le cadre des infections. En effet, les hommes ont un risque significativement plus élevé de développer des complications infectieuses que les femmes (229). L'analyse de variance nous a permis de mettre en évidence l'effet de chaque cofacteur (**Table 6**). Le score F du facteur infection étant le plus élevé ($F = 890,96$), cela suggère que le facteur « *infection* » a le plus d'impact sur la variation de l'expression des gènes. Le facteur « *Gène* » a un score de 115,45 et une p-valeur $<0,0001$, cela explique le comportement différent des gènes. Le facteur *traitement* et le facteur *genre* ont un impact sur la variation de l'expression des gènes avec un score F de 176,21 et 156,07, respectivement, et une p-valeur $<0,0001$.

L'analyse statistique *Limma* a mis en évidence, onze gènes significativement différentiels ($FDR=5\%$) prédictifs de la survenue d'un sepsis et/ou de SIRS juste après le conditionnement chimiothérapeutique (et au minimum 48h avant le développement de l'infection). Dix de ces gènes (*CHAT*, *CNN3*, *ANKRD42*, *LOC100505717*, *EDAR*, *GPAT2*, *ENST00000390421*, *MTRM8*, *LOC10289230*) sont surexprimés chez les patients qui développent un sepsis et/ou de SIRS et seulement un gène est sous exprimé (*XLOC-005643*). Au vu du nombre de gènes qui composent la signature prédictive trouvée, nous n'avons eu aucun résultat pour les analyses classiques d'enrichissement en termes fonctionnels (*DAVID*, *KEGG Pathway*, *g : profiler*). C'est pour cela qu'une recherche bibliographique gène par gène a été réalisée afin de comprendre l'implication des gènes de la signature dans les processus inflammatoires et infectieux.

Les mécanismes d'activation des cellules T par les lipoprotéines se produisent *via* l'interaction de l'antigène CD1a qui est un médiateur de la reconnaissance des antigènes du non-soi et le TCR. TRAV3 est impliqué dans le réarrangement des chaînes α du TCR, qui permet la reconnaissance des complexes CMH-

peptides (230, 231). Il se pourrait alors que TRAV3 aurait un rôle important dans la réponse anti-infectieuse.

Faris et coll. ont démontré une très forte diminution de la production d'IL-2 dans une étude *in vitro* de cellule Jurkat déficiente pour la Glycerol-3 phosphate acyltransferase mitochondrial (GPAMKD - Glycerol-3 phosphate acyltransferase mitochondrial knock down) avec une altération de la masse des phospholipides et une augmentation de l'apoptose. Les Jurkat déficientes pour la GPAM (Glycerol-3 phosphate acyltransferase mitochondrial) sécrètent 40 fois moins d'IL-2 en réponse à la stimulation CD3/CD28 par rapport aux contrôles. Dans notre cas, nous avons observé une augmentation significative de la GPAT2 (Glycerol-3 phosphate acyltransferase mitochondrial-3) chez les patients qui développent un sepsis et/ou un SIRS. L'interleukine-2 est une cytokine principalement sécrétée par les cellules Th1 qui sont nécessaires à la maturation des CD4+ et des CD8+ et sert à maintenir une réponse immunitaire en renforçant les voies pro-prolifération (232). Il serait donc possible que GPAT2 ait un rôle dans l'apoptose dans le cadre du sepsis/SIRS.

EDAR est un membre de la superfamille des TNF récepteurs. Comme pour la voie de signalisation TNF/TNFR, la voie de signalisation EDA/EDAR aboutit à la voie canonique NF- κ B (233). L'implication de la voie NF- κ B dans l'inflammation et l'infection a déjà été décrite dans la littérature (234-236). Durant l'infection, les PRR reconnaissent les agents infectieux ou leurs produits (tels que le LPS), ces molécules déclenchent des voies conduisant à l'activation des facteurs de transcriptions, dont NF- κ B qui a un rôle central dans la signalisation. NF- κ B régule des médiateurs essentiels à la réponse inflammatoire ainsi qu'à la défense de l'hôte. Il est impliqué dans la production des cytokines, des chimiokines et de l'oxyde nitrique, il peut aussi inhiber l'apoptose et augmenter la survie cellulaire lors de l'inflammation. L'activation de NF- κ B par l'intermédiaire de la voie classique est dépendante d'IKK β et IKK γ et de la dégradation d'IKB α . L'activation est aussi associée à la translocation de l'hétérodimère p50/p65 ; qui est très importante dans la coordination de la réponse immunitaire innée et dans l'inflammation, et qui serait très importante lors du sepsis précoce (236) **Figure 17**.

Les lymphocytes T peuvent exprimer la choline transférase (ChAT), l'enzyme qui catalyse la biosynthèse de l'acétylcholine et produit et libère l'acétylcholine. L'expression de ChAT dans les cellules T activées par un anti-CD3, permet la sécrétion de l'IL-10, IL-17 et INF- γ ainsi que de l'IL-2 (237). Il serait donc probable que ChAT joue un rôle dans la réponse aux infections et aux inflammations systémiques.

En 2011, l'équipe de Vanska décrit l'élévation de la *pentraxin 3* comme étant prédictive du choc septique et de la bactériémie durant l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques au début de la neutropénie fébrile et après intensification chimiothérapeutique des patients atteints d'hémopathies malignes (238). Cette dernière n'est pas une étude pangénomique, mais elle se base sur un dosage protéique ciblé.

L'augmentation de la concentration de la *pentaxin 3* chez les patients autogreffés prédit le choc septique et la survenue de la bactériémie chez les patients qui sont déjà en neutropénie fébrile.

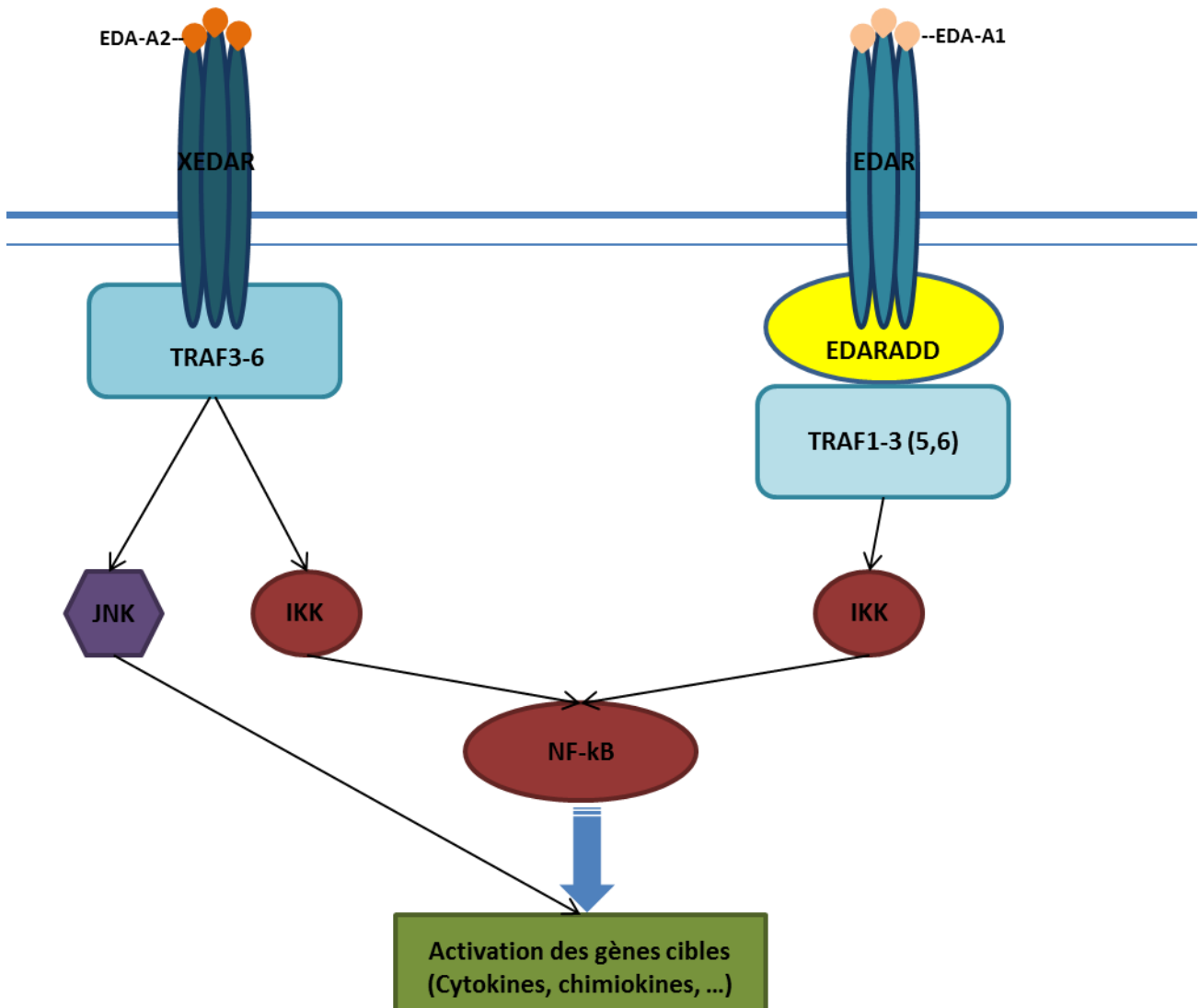


Figure 17 : Résumé schématique de la voie EDA/EDAR

(Adaptée de Mikkola et Thesleff, 2013)

Beaucoup de biomarqueurs prédictifs sont utilisés en routine en clinique tels que : le dosage de la CRP, la procalcitonine, ou récemment la *presepsin* (CD14 soluble) et autres. Mais, aucun de ces biomarqueurs ne permet de prédire assez précocement la survenue d'une infection avant le déclenchement des cascades moléculaires.

Tous les patients exprimant cette signature transcriptomique développent un sepsis ou un SIRS dans les 48 h après le conditionnement chimiothérapeutique (avec un intervalle de 24 h à 7 jours). Tous les patients ont été bien classés selon leur profil d'expression dans le bon groupe sur la base de l'analyse SVM, ce qui suggère une robustesse des résultats. La signature transcriptomique trouvée prédit la survenue le profil sepsis/SIRS et elle est d'autant plus robuste par le fait que l'effet du genre et de la chimiothérapie à haute

dose sont pris en compte et exclus dans l'analyse statistique. Cette étude expose une approche originale de l'étude de la survenue du sepsis dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques avec aucune analyse similaire dans la littérature.

Dans le but de confirmer la signature transcriptomique, une validation par RT-qPCR d'échantillons de patients une cohorte indépendante a été réalisée. En effet, Les ARN de 10 patients autogreffés ont été extraits à l'aveugle (sans connaître le devenir du patient sepsis/SIRS/pas de fièvre) à partir de PBMC de patients autogreffés après la chimiothérapie et avant la réinjection des cellules souches. Neuf gènes de la signature transcriptomique ont été mesurés par RT-qPCR, puis les résultats ont été comparés au devenir septique des patients. Nous avons alors pu séparer les patients qui ont développé un sepsis ou un SIRS des patients qui n'ont pas développé de fièvre. Ces résultats confortent l'hypothèse de la signature transcriptomique prédictive de la survenue du sepsis et/ou de SIRS. Ce qui pourrait ouvrir la perspective du traitement antibiotique et antifongique en prophylaxie chez les patients identifiés à haut risque de développer un sepsis ou un SIRS selon leur profil d'expression.

Des analyses complémentaires sont en cours de réalisation au laboratoire. Le dosage des protéines dont les gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés est réalisé par ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay). Cette expérience permettra de vérifier la corrélation entre le niveau d'expression des gènes et la quantité de protéine dans le plasma de la même cohorte d'étude.

Cette étude ouvre la possibilité de mettre en place un dépistage clinique en routine chez les patients autogreffés, non pas en utilisant les microarrays (expérimentations trop longues et coûteuses), mais en RT-qPCR. Cette dernière permettra de quantifier l'expression des gènes de la signature transcriptomique identifiée. Selon le profil d'expression, les cliniciens seront aptes en quelques heures après la fin de la chimiothérapie de conditionnement à connaître le devenir du patient et cela minimum 48 h avant le déclenchement de la fièvre. Ainsi, adapter un traitement antibiotique et antifongique en prophylaxie. Bien que les résultats biologiques soient intéressants et pertinents, leurs intérêts cliniques restent encore à démontrer. La prochaine étape serait donc de prouver qu'une prophylaxie antibiotique ou antifongique administrée aux patients dits : « à risque de développer un sepsis et/ou de SIRS » les empêcherait de développer un sepsis dans le cadre de l'autogreffe.

Conclusion et perspectives

Les complications infectieuses sont un problème majeur chez les patients recevant autogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Onze gènes (*CHAT*, *CNN3*, *ANKRD42*, *LOC100505717*, *EDAR*, *GPAT2*, *ENST00000390421*, *MTRM8*, *C6orf192* et *LOC10289230* et *XLOC-005643*) sont nettement différemment exprimés chez les patients qui développent un sepsis et/ou de SIRS dans les 48 heures suivant le conditionnement chimiothérapeutique.

Dans ce contexte, nous collaborons avec *Advanced BioDesign (ABD)* dont le pôle recherche et développement s'intéresse à l'identification de marqueurs spécifiques et prédictifs de la survenue du sepsis dont le but est de développer des kits prédictifs à utiliser en routine dans le milieu hospitalier. ABD a donc émis un intérêt pour les marqueurs que nous avons identifiés (qui codent pour des protéines) pour les rajouter dans le kit qu'ils développent. Ainsi, faire établir un protocole de diagnostic en routine pour les patients autogreffés juste après leurs chimiothérapies de conditionnement.

Cette signature transcriptomique prédictive reste un résultat très intéressant et ouvre des perspectives innovantes dans la prévention du sepsis. De nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur un antibiotique et/ou prophylaxie antifongique adaptée au profil de risque spécifique de chaque patient pourraient être une évolution élégante dans la gestion du risque de sepsis. Une telle approche transcriptomique devrait également être appliquée à des patients recevant une allogreffe ou des patients atteints de leucémies myéloïdes aiguës, qui sont à risque plus élevé de complications septiques.

Publication en cours de rédaction: SIRS and SEPSIS following autologous hematopoietic stem cell transplantation: a predictive transcriptomic signature

SIRS and SEPSIS following autologous hematopoietic stem cell transplantation: a predictive transcriptomic signature

Labiad. Y^{1*}, Venton. G^{1,2*}, Baier. C¹, Colle. J^{1,2}, Farnault. L², Brunet. C², Loriod. B¹, Fernandez-Nunez. N¹, Suchon. P^{3,4}, Mattei JC⁵, Rihet. P², Nguyen. C^{1**} and Costello. R^{1,2**#}

¹ Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France

² Service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, Marseille, 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 UMR-911 INSERM Center for research in onco-biology and onco-pharmacology, faculté de médecine, Marseille, France

* Equal contribution

** Equal supervision

Corresponding author

Key words: SRIS; Sepsis, Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation (Auto-HSCT), Transcriptomic Analysis, Treatment related mortality (TRM)

Current address for correspondence: Pr. Régis T Costello, Service d'Hématologie et Thérapie Cellulaire, Centre Hospitalier Universitaire La Conception, 147 boulevard Baille, 13005 Marseille, France. Phone number: (33) 4 91 38 41 50, Fax number: (33) 4 91 36 41 54, E-mail address: regiscostello.taqc@gmail.com

Complete contact informations

Yasmine Labiad : Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France Phone : 04-91-82-87-26 Mail : labiad.yasmine@gmail.com

Venton Geoffroy : Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France. Service d'hématologie et de thérapie cellulaire APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France. Phone : 04-91-38-41-50 Mail : geoffroy.venton@ap-hm.fr

Céline Baier : INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, F_13288, France Phone : 04-91-82-87-26 Mail : celine_baier@yahoo.fr

Julien Colle : Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France. Service d'hématologie et de thérapie cellulaire APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France. Phone : 04-91-38-41-50 Mail : julien.colle@ap-hm.fr

Laure Farnault : Service d'hématologie et de thérapie cellulaire APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France. Phone : 04-91-38-41-50 Mail : laure.farnault@ap-hm.fr

Corinne Brunet : Laboratoire d'hématologie, APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France Phone : 04-91-38-00-00 Mail : corinne.nicolino@ap-hm.fr

Fernandez-Nunez Nicolas : Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France Phone : 04-91-82-87-26 Mail : nicolas.fernandez-nunez@inserm.fr

Pierre Suchon : UMR 1062 NORT, INSERM, Marseille France. Laboratoire d'hématologie, APHM, Hôpital de la Timone, Marseille, France Phone : 04-91-38-00-00 Mail : pierre.suchon@ap-hm.fr

Jean Camille Mattei : UMR-911 INSERM Center for research in onco-biology and onco-pharmacology, faculté de médecine, Marseille, France Phone : 04-91-38-00-00 Mail : jeancamille.mattei@gmail.com

Pascal Rihet : Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France Phone : 04-91-82-87-26 Mail : pascal.rihet@univ-mrs.fr

Catherine Nguyen : INSERM, UMR1090 TAGC, Marseille, F_13288, France Phone : 04-91-82-87-26 Mail : nguyen@tagc.univ-mrs.fr

Régis Costello : Service d'hématologie et de thérapie cellulaire APHM, Hôpital de la Conception, Marseille, France. Phone: 04-91-38-41-50 Mail: regiscostello.tagc@gmail.com

Abstract

Autologous hematopoietic stem cell transplantation (auto-HSCT) is considered as a standard treatment in multiple myeloma in young patients and relapsed or refractory high-grade lymphoma (non Hodgkin and Hodgkin lymphoma). Immediately after auto-HSCT, hematologic reconstitution and infectious complications are the two critical issues to monitor in transplanted patients. Though many patients will develop infectious complications after therapeutic intensification, it remains impossible to predict whether they will or not. Therefore the goal of this work was to determine and identify a SIRS and/or sepsis predictive transcriptomic signature in patients receiving auto-HSCT.

High throughput transcriptomic and bioinformatics analysis were performed to analyze gene expression modulation in peripheral blood mononuclear cells in 21 patients undergoing auto-HSCT for hematological malignancies.

After conditioning regimen, eleven genes CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, C6orf192 and LOC10289230 and XLOC-005643 were significantly differentially expressed in patients who will develop SIRS and/or sepsis within 48 hours. Such predictive transcriptomic signature opens up to new therapeutic strategies based on an antibiotic and/or antifungal prophylaxis adapted to the specific risk profile of each patient.

Introduction

Autologous hematopoietic stem cells transplantation (Auto-HSCT) after therapeutic intensification is based on the administration of myelosuppressive high-dose chemotherapy, followed by infusion of autologous hematopoietic stem cells in order to obtain a faster hematologic reconstitution. Hematopoietic stem cells (HSCs) infusion helps to reduce the duration of chemotherapy-induced myelosuppression and lowers the procedure-related mortality rate below 3% [1] [2] [3]. Over the past two decades, auto-HSCT has shown remarkable development thanks to the use of hematopoietic growth factors. With few exceptions (solid tumors, autoimmune diseases), auto-HSCT is widely indicated for the treatment of hematological malignancies and is considered as a standard treatment in multiple myeloma in young patients and relapsed or refractory high-grade lymphoma (non Hodgkin and Hodgkin lymphoma).

Immediately after auto-HSCT, hematologic reconstitution and infectious complications are the two major issues to monitor in transplanted patients. Besides direct toxicity of conditioning regimens, deep and prolonged neutropenia exposes patients to significant risks of infection. Saprophytic gram-negative bacilli (such as *Escherichia coli*) are the most common cause of septic shock[4] and chronic immunosuppression

exposes to the risk of fungal infection. An anti-fungal prophylaxis is usually administered [5] but antimicrobial prophylaxis is less often given because its effectiveness is not clearly established and increases the risk of *Clostridium difficile* diarrhea [6]. Unfortunately, though many patients will develop a systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and/or a sepsis, it is not possible to foresee which patients will develop a SIRS and/or a sepsis. Therefore, it remains impossible to adjust the antibiotic or antifungal prophylaxis to the specific risk profile of each patient.

The main objective of this work was to determine and identify a predictive transcriptomic signature of the SIRS and/or sepsis in patients receiving auto-HSCT.

Patients, materials and methods

Patients

The study was approved by the institutional review board of the Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (AP-HM). Written informed consent was obtained from each patient. Patients were admitted in the hematology department of the Conception university hospital for undergoing auto-HSCT. All patients were under 65 years and were already followed in the hematology department for multiple myeloma or high-grade lymphoma. Before auto-HSCT, patients were in complete remission (CR) or in partial remission (PR) after conventional chemotherapy. Inclusion criteria were the same as required for being eligible to auto-HSCT. Twenty four patients were included in this study protocol. Twenty one were analyzed. Blood samples were collected for each patient at three moments: before the conditioning regimen (T1), after the conditioning regimen and before the graft infusion (T2) and at the end of the neutropenic phase (T3) (**Figure 1**).

SIRS and sepsis definitions

Systemic Inflammatory Response Syndrome (SIRS) and sepsis definition are based on the American College of Chest Physicians society of Critical Care Medicine consensus. SIRS is defined as the systemic inflammatory response to a variety of severe clinical symptoms with at least two of the following criteria: a) Temperature higher than 38°C or lower than 36°C b) Heart rate higher than 90 beats/min c) Respiratory rate higher than 20 breaths/min or PaCO₂ lower than 32 mmHg d) White blood cell counts higher than 12,000 cells/mm³ or lower than 4,000 cells/mm³, or the presence of more than 10% immature neutrophils. The last criterion cannot be considered in auto-HSCT context because of the long aplasia phase following auto-HSCT [7] [8]. Sepsis is defined as SIRS secondary to documented or suspected infection. Patients with

severe sepsis are patients with sepsis and at least one organ dysfunction. Septic choc is defined by severe sepsis associated with refractory hypotension [8].

Conditioning regimens

Conditioning regimen for therapeutic intensification was high dose of melphalan (200mg/m²) for patients with myeloma and BEAM for patients with lymphoma. BEAM conditioning regimen consisted in carmustin 300 mg/m² (day 6), etoposide 150 mg/m² (days 5 to 2 twice daily), cytarabin 200mg/m² (days 5 to 2 twice daily) and melphalan 140mg/m² (day 1), with auto-HSCT on day 0.

Hematopoietic stem cell collection

Peripheral hematopoietic stem cells (HSCs) mobilization required hematopoietic growth factors (G-CSF in most cases). Two procedures have been used to mobilize HSCs: *steady-state collection*: G-CSF is injected at the dose of 10µg/kg-a-day while bone marrow is in physiological conditions or *mobilization chemotherapy*: high doses of cyclophosphamide (between 1.5 to 4g / m²) associated to 5µg/kg-a-day of G-CSF. When HSCs collection fails with these usual procedures, plerixafor (SDF-1/CXCR4 interaction inhibitor) can be used at the subcutaneous dose of 240 µg / kg and helped to collect HSCs in initially non-mobilizable patients.

PBMCs isolation

Blood samples were centrifuged to separate plasma and other blood components. Concentrate blood was diluted and peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were collected by Ficoll-Hystopaque density-gradient centrifugation.[9] Isolated PBMCs were frozen at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction, quantification quality controls

Depending on cell number, two kits were used for RNA extraction, the RNeasy Mini Kit Qiagen™ (Qiagen, Valencia, California), which accepts 10 million of cells and the RNeasy Midi Kit Qiagen™, which accepts up to 100 million cells. RNAs were extracted according to the Qiagen protocol.

RNAs were quantified by NanoDrop 1000 (Nano Drop Technologies, San Diego, CA). Optical density was measured at 260 and 280 nm and the ratio 260/280 (> 1.8) indicates its purity.

Extracted RNA quality was checked with Agilent 2100 Bioanalyzer™ (Agilent Technologies, Santa Clara, California). A score on a scale of 0 to 10 was automatically attributed to each sample and corresponded to RNA Integrity Number (RIN). Sample with a RIN under 7 was discarded. For samples presenting genomic DNA contamination, DNase treatment was performed using the RNase Free DNase Set kit of Qiagen®

Pangenomic gene expression assay

One hundred nanogram of total RNA was labeled using One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis: Low Input Quick Amp (LIQA) labeling protocol. 0.6 µg of the purified Cy3 labeled cRNA were hybridized for 17h at 65°C, at 60rpm, using the SurePrint G3 human GE 8x60K V2 chips (Agilent Technologies, Santa Clara, California). Microarrays were composed of 62 928 features. Probes synthesized on chips had a size of 60 nucleotides. Microarrays were washed using Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies) and scanned through standard Agilent protocol. Data were processed using Feature Extraction software.

Differential gene expression analysis

The library AgiND is implemented in R software in order to analyze and visualize data. AgiND was developed on Bioconductor library model (tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/AgiND/) and is used to diagnose data quality and data microarrays normalization. Quantile method was used to normalize data; the objective was to homogenize distribution of microarray intensity. [10]

A filter was applied on row data to delete controls, then a second filter was applied to delete genes which were expressed under the background in at least 80% of samples in each group (Sepsis, SIRS, no fever).

To test co-factors effects (gender, treatment, infection) on gene expression, GeneANOVA software was used to perform ANalysis Of Variance (ANOVA) on normalized data to determine an estimation of the contribution of each factor (genes, gender, treatment, infection) in gene expression variation. Global ANOVA model is given in the following formula: $Y = \mu + \beta_G G + \beta_T T + \beta_I I + \epsilon$, where Y is explained variable, μ is global mean, β_G , β_T , β_I , are model coefficients, G, T, I, are the quantitative variables, $\beta_G G$, is the gene effects, $\beta_T T$, is the treatment effects, $\beta_I I$, the infection effects ϵ , is the error term. [11]

Differential gene expression analysis was performed using linear Models for Microarray Data (Limma). Limma is a multivariate analysis and takes into account co-factors-effect tested by ANOVA analysis (treatment and gender) (**Table 2**).

In order to determine infection impact on gene expression and on the heat map, new gene expression was calculated after subtracting gender and treatment co-factors effects.

Unsupervised hierarchical clustering was applied on adjusted gene expression median adjusted data to group genes and samples, according to their expression using « TMeV » (Tigr MultiExperiment Viewer) MeV: MultiExperiment Viewer | Part of the TM4 Microarray Software Suite [<http://www.tm4.org/mev/>]. Pearson correlation was used, and clusters were grouped on basis of average linkage method.

SVM

Support Vector Machines (SVMs) were applied to predict classification of patients according to the predictive signature. SVMs use a training set in which genes known to be related to each other by function or samples related to a group are described as positive examples and genes or samples known not to be members of that class are labeled as negative examples. In this study samples were attributed to two groups: SIRS and Sepsis patients in the first group and patients with no temperature in the second. They were combined into a set of training examples used by SVM to distinguish class members from non-members on the basis of expression data. After learning the class expression features, the SVM can be used to recognize and classify each sample on the basis of their expression [11] [12]. SVMs tool is implemented in TMeV software MeV: MultiExperiment Viewer | Part of the TM4 Microarray Software Suite. [<http://www.tm4.org/mev/>]

High-throughput quantitative PCR

RT-PCR was performed using SuperScript™ VILO™ MasterMix protocol described by Invitrogen. Sixty nanogram of RNA of each sample was retrotranscribed, using 4μL of SuperScript™ VILO™ MasterMix, and RNase DNase Free water for a final volume of 20μL. Mix was incubated 10 min at 25°C, 60min at 42°C and 5min at 85°C.

Quantitative PCR was performed with FlexSix array on BioMark™ HD (Fluidigm). A pre-amplification of each sample was applied according to the protocol provided by Fluidigm. One microliter of 100μM of each primer was added to 176 μL of DNA Suspension Buffer for a final concentration of 500 nM. Then, 0.5μL of the previous mix was added to 1 μL of PreAmplification mix, 1.25μL of cDNA and RNase DNase Free water for a final volume of 5μL. Holding step was done 2min at 95°C followed by 20 cycles of 15s at 95°C and 4 min at 60°C. The pre-amplification step was followed by an Exonuclease I treatment (BioLegend) to remove unincorporated primers. 2μL of diluted Exonuclease at 4 U/μL was added to each pre-amplification reaction. The digestion was performed during 30min at 37°C and the inactivation during 15min at 80°C. The final product was diluted 5-fold using 18μL of TE Buffer (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA). The diluted reaction products were stored at -20°C.

In a second part, 12 x 12 (samples x primers) qRT-PCR reactions are performed for each primer pair on each sample on the 12 x 12 array (FlexSix). We used the EvaGreen detection assay for following standard Fluidigm protocols. Ct values were calculated from the system software Biomark Real-Time PCR Analysis (Fluidigm). The primers used were:

Gene	R	F
SLC18B1 - C6orf192	5'-GCAGGACAGCTTTTCAGTATCAC-3'	5'-CCTGGCCTTAAACATCACCG-3'
CNN3	5'-GGCTGGCTCCTTTATTAGTGC-3'	5'-AAGCTGGCCAAAGTGAATTG-3'
MTMR8	5'-ACTTAAGTGGGGAGAGGGGT-3'	5'-GAGGCAGACTACTCCAAGCA-3'
GPAT2	5'-GCCCAGAGAAGCCTACATCA-3'	5'-CATCAGAAGCTCCTGGGGGA-3'
PLCG1 - LOC100505725	5'-ACAGGAATCTTGGTGCTTCAGT-3'	5'-CAGGGAGGTACATGGCCAAT-3'
ANKRD42	5'-CGCCCATGAAAAGCTGCATA-3'	5'-GGAGCAAATCTGACAGCCCA-3'
GAPDH	5'-CCACCACCCTGTTGCTGTGA-3'	5'-CCCACTCCTCCACCTTTGAC-3'
EDAR	5'-ACATGAGCTGACACTGGCTG-3'	5'-TGAGTGTGCCATTCCAGGAT-3'
TRAV3 - ENST00000320425	5'-GCCTCGGTTGGGGTATTGAA-3'	5'-CTCAGCCGGAAGATCAGGTC-3'
CHAT	5'-CAGCAGAACATCTCCGTCGT-3'	5'-ATGGCCATTGACAACCACCT-3'
LOC100289230	5'-GTGCTTCCGAAAACGTAAA-3'	5'-TCCTGTGCCCGTAATTTCTC-3'

Results

Patients analyze

Twenty four patients were included in the study, among these patients; only 21 validated the molecular criteria for transcriptomic analysis. Among these 21 patients, 6 patients didn't develop a fever or SIRS. Nine patients developed SIRS, 5 a sepsis and 1 a severe sepsis. Patients' clinical data are summarized in the **table 1**.

Pangenomic gene expression

21 samples were analyzed on Agilent microarrays "SurePrint G3 GE 8x60K human." After 17 hours of hybridization, the chips were washed and scanned. Results passed microarrays quality controls. Raw data were transformed into *log2* and normalized with quantile method.

24 046 probes expressing a higher signal than background (in at least one group) have been selected. Two methods were used for statistical analysis: ANOVA analysis to measure the impact of each factor on gene expression variation (infection, gender, treatment) and Limma analysis on three groups (no fever, SIRS, Sepsis) with the following co-factors: gender and treatment, to define differential gene expression (**Figure 2**).

ANOVA analysis was performed on the 24 046 probes to estimate impact of each factor (infection, gender, treatment) in gene expression variation. P-value was calculated for each factor. For all factors (genes, infections, gender, and treatment) p-values were $< 10^{-4}$ (**Table 2**).

Infection F score was the highest, suggesting that "infection" had the greatest impact on gene expression. Genes F score was of 115.45 ($p\text{-value} < 10^{-4}$) and explains genes fluctuation. Treatment and gender had an impact on the variation of gene expression with a F score of respectively 176.21 and 156.07 ($p\text{-value} < 10^{-4}$).

Unsupervised hierarchical clustering method was used to classify the differently expressed genes identified by Limma analysis. Expression similarity profiles of the genes were grouped on the horizontal axis and samples on the vertical axis. Genes expression profiles are shown in heat map (**Figure 3**). With a FDR (False Discovery Rate) fixed to 5 %, 11 genes differentially expressed were identified between the patients who did not have temperature (controls) and the patients who developed SIRS and sepsis (taking account effect of gender and treatment). The eleven differentially expressed genes were: CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, LOC10289230 and XLOC-005643 (Table3). Gene expression profiling distinguished two groups: patients who did not develop temperature on one hand and patients with SIRS or sepsis on the other hand. CHAT, CNN3, C6orf192, ANKRD42, LOC100505717, EDAR,

GPATZ, ENST00000390421, MTRM8, LOC10289230 were over expressed and XLOC-005643 was under-expressed in patient samples with SIRS or Sepsis in contrast to patients who did not develop fever.

SVM

SVM and Leave-one-out cross-validation were used to classify patients according to their gene expression. 21 samples were separated into two groups, the first group was composed of 15 SIRS and septic patients and the second of the 6 patients who didn't have temperature. SIRS and sepsis patients were considered as positive experiments, and the other as negative. All 15 patients of the positive experiments were classified as positive, staying in positive class (True positives =15) and none was transferred from negative class to positive (False negatives = 0). On the 6 patients of the negative experiments, all were classified as negative, all retained in negative class (True negatives =15) and none was recruited into negative class from positives (False positives = 0)

RT-qPCR

In order to confirm the microarray gene expression results, RT-qPCR was performed on 9 genes that composed the transcriptomic signature. The expression of LOC 100289230 in patients who develop SIRS or sepsis compared with patients who do not develop fever is differently expressed with a significant p-value: 0.003. TRAV3, EDAR, PLCG1-AS1-001, GPAT2, MTRM8, CNN3 and SLC18B1 were also differently expressed with p-values: 0.004, 0.01, 0.01, 0.005, 0.009, 0.09 and 0.01, respectively. Figure 4

Discussion

This analysis highlighted eleven genes significantly and differentially expressed in patients who developed SIRS or sepsis after the conditioning regimen. Ten of them were up-regulated (CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPATZ, ENST00000390421, MTRM8, C6orf192 and LOC10289230) while only one were down-regulated (XLOC-005643). All patients with this specific transcriptomic signature have developed a SIRS or a sepsis within 48 hours (range 24 hours-7 days) following conditioning regimen. 100% of patients were classified in the right group according to their gene expression and based on SVMs analysis. Transcriptomic signature may predict SIRS/sepsis profiles and is more robust than the main confounding factors, such as conditioning regimen type or gender, which were therefore excluded from the analysis. BEAM conditioning regimen was more myelosuppressive than melphalan alone and men have had a more significant risk to develop infectious complications than women [13]. Auto-HSCT patients affected by multiple myeloma receive high dose of melphalan and patients with lymphoma high dose of BEAM chemotherapy, meaning that treatment and pathology are confounding factors. A SAM (Significant Analysis

of Microarray) and an ANOVA analyzes were performed on the data of patient samples before chemotherapy, and no differentially-expressed genes were found between patients affected by lymphoma or myeloma. Pathologies (lymphoma vs. myeloma) have no effect on gene expression in this study, in contrast to the treatment (Melphalan vs. BEAM). This work exposes an original approach of the sepsis issue during the auto-HSCT neutropenic phase with no similar analysis in the scientific literature. In 2011, Vanska et al. described that high pentraxin 3 level (protein assay) predicted septic shock and bacteremia at the onset of febrile neutropenia after intensive chemotherapy of hematologic patients [14]. But, this was not a transcriptomic approach and high pentraxin 3 level predicted septic shock in patients who already had a febrile neutropenia. In contrast, our predictive transcriptomic signature identifies patients who have strong chances to develop a SIRS and/or a sepsis, during the 48 hours before onset of fever. In order to confirm our results, our transcriptomic signature has been validated on a 10 patient's prospective validation cohort (Supplementary data). Early identification of patients who will develop SIRS and/or sepsis could provide a further adjustment of antibiotic or antifungal prophylaxis according to the specific risk profile of each patient.

However, gene expression analysis is not possible in clinical routine for time and cost-effective reasons. In contrast RT-PCR analysis on a blood sample (feasible in 2 hours and inexpensive) of the eleven dysregulated genes hereby identified is completely workable in clinical routine. Indeed, RT-PCR analysis is adapted to necessity for clinician to get a fast answer in order to begin or not an adapted antibiotic or antifungal prophylaxis treatment. It is still to be proven if a heavy antibiotic or antifungal prophylaxis in these "septic-risk patients" could prevent them from developing SIRS and/or severe sepsis. While results are biologically relevant, their clinical interests remain to be demonstrated.

In scientific literature, genes composing this predictive signature are not directly involved in sepsis or infection pathways. In this cohort of 21 patients, 9 had developed a SIRS, 5 a sepsis and only one a severe sepsis. None of 21 patients had developed a septic shock. Patient who developed severe sepsis did not have a significantly different transcriptomic signature from the SIRS/sepsis patients. Thanks to supportive care improvement, auto-HSCT-procedure-related mortality rate remains below 3% and severe sepsis/septic shock are less and less frequent [1] [2] [3]. This small cohort did not allow determining a specific transcriptomic signature for the severe sepsis and/or septic shock, which would be clinically more relevant and it would be interesting to reproduce this work with a larger cohort to evaluate this. In addition, since a SIRS/sepsis predictive signature before the conditioning regimen was not identified, the transcriptomic signature seems not to be linked to the patient but depends on conditioning patient's response.

This predictive transcriptomic signature remains an interesting result and opens up to innovative perspectives in the sepsis prevention. New therapeutic strategies based on an antibiotic and/or antifungal

prophylaxis adapted to the specific risk profile of each patient could be an elegant evolution in the sepsis risk management. Such a transcriptomic approach should also be applied to patients receiving allogeneic stem transplantation or to acute myeloid leukemia patients, which are at high-risk for septic complications.

Conclusion

Infectious complications are a major issue in patients receiving auto-HSCT. Eleven genes (CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, C6orf192 and LOC10289230 and XLOC-005643) are significantly differentially expressed in patients who will develop SIRS and/or sepsis within 48 hours following the conditioning regimen. Such predictive transcriptomic signature opens up to new therapeutic strategies based on antibiotic and/or antifungal prophylaxis adapted to the specific risk profile of each patient.

Conflict of interest

All authors declare no financial conflict of interest

Funding

This work was supported by grants from AP-HM, Assistance Publique – Hôpitaux de Marseille, (AORC APHM Junior), and Aix-Marseille Université, Advanced Biodesign. TGML platform supported by the France Génomique

Acknowledgment

We would like to thank INSERM, Aix-Marseille Université and Advanced Biodesign (Parc Technologique de Lyon Bâtiment Cèdre 1, 97 Allée Alexandre Borodine, 69800 Saint-Priest -Lyon) for grants.

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 was 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.

References

1. Kurnick NB. Autologous and isologous bone marrow storage and infusion in the treatment of myelo-suppression. *Transfusion (Paris)* 1962;2:178–87.
2. McFARLAND W, Granville NB, Dameshek W. Autologous bone marrow infusion as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood* 1959;14:503–21.
3. Clifford P, Clift RA, Duff JK. Nitrogen-mustard therapy combined with autologous marrow infusion. *Lancet Lond. Engl.* 1961 1;1:687–90.
4. Veeraputhiran M, Jain T, Deol A, Ayash L, Kim S, Dyson G, et al. BEAM Conditioning Regimen Has Higher Toxicity Compared With High-Dose Melphalan for Salvage Autologous Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma Leuk.* 2015;15:531–5. doi: 10.1016/j.clml.2015.05.008
5. 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. doi: 10.1038/bmt.2010.175
6. 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. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol.* 2012;31:1653–61. doi: 10.1007/s10096-011-1489-2
7. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine Consensus Conference: definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Crit. Care Med.* 1992;20:864–74.
8. Robertson CM, Coopersmith CM. The systemic inflammatory response syndrome. *Microbes Infect. Inst. Pasteur* 2006;8:1382–9. doi: 10.1016/j.micinf.2005.12.016
9. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J. Immunol. Methods* 1974;5:249–52.
10. Bolstad BM, Irizarry RA, Astrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 2003 22;19:185–93.
11. Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, et al. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000 4;97:262–7.
12. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat. Rev. Genet.* 2001;2:418–27. doi: 10.1038/35076576
13. Adrie C, Azoulay E, Francais A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, et al. Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *Chest* 2007;132:1786–93. doi: 10.1378/chest.07-0420
14. Vänskä M, Koivula I, Hämäläinen S, Pulkki K, Nousiainen T, Jantunen E, et al. High pentraxin 3 level predicts septic shock and bacteremia at the onset of febrile neutropenia after intensive chemotherapy of hematologic patients. *Haematologica* 2011;96:1385–9. doi: 10.3324/haematol.2011.044925
15. Lin J, Zhang X, Xue C, Zhang H, Shashaty MGS, Gosai SJ, et al. The long noncoding RNA landscape in hypoxic and inflammatory renal epithelial injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015 1;309:F901–13. doi: 10.1152/ajprenal.00290.2015
16. Fang Y, Fullwood MJ. Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2016 12;doi: 10.1016/j.gpb.2015.09.006

Table 1: Patients, pathologies and auto-HSCT characteristics

Baseline and Demographic Characteristics	n = 21
Patients age (median)	58 years Range [32-68]
Patient gender	
Male	14 (67%)
Female	7 (33%)
Hematologic malignancy	
Lymphoma	2
Multiple Myeloma	19
Conditioning Regimen	
BEAM	2
Melphalan high dose	19
Injected CD 34⁺ (x 10⁶ / kg)	2,82 Range [0,751-3,64]
Mean duration of fever	3 days SEM [-4,30 - 4,30]
Mean duration of neutropenia	9 days SEM [-2,90 - 2,90]
Documented bacterial infections	6 (30%)
Gram-positive bacteria	75%
<i>Staphylococcus hominis</i>	1
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Staphylococcus aureus</i>	1
<i>Streptococcus mitis</i>	1
<i>Clostridium difficile</i>	1
Gram-negative bacteria	25%
<i>Escherichia coli</i>	1
<i>Klebsiella pneumonia</i>	1
Documented fungal infections	0 (0%)
Patient classification	
No fever	6 (29%)
SIRS	9 (42%)
Sepsis	5 (24%)
Severe sepsis	1 (5%)
Septic shock	0 (0%)

Table 2: co-factors effect on gene expression.

ANOVA analysis was performed to test the co-factors impact (infection, treatment and gender) on genes expression for samples taken at T2 (after chemotherapy). With p-values < 0,05 infection, treatment and gender have a significant effect on gene expression. DF: Degrees of Freedom

Factors	Sum of squares	DF	Variance	F score	P-value
Genes	3476905,49	28114	123,67	115,45	< 10 ⁻⁴
Infection	954,39	1	954,39	890,96	< 10 ⁻⁴
Treatment	188,75	1	188,75	176,21	< 10 ⁻⁴
Gender	167,18	1	167,18	156,07	< 10 ⁻⁴
Residual	602328,16	562297	1,07	-	-
Total	4080543,97	590414	6,91	-	-

Table 3: Differentially expressed gene characteristics

Ch : Chromosom, +1 : Forward strand, from 3' to 5', -1 : Reverse strand, from 5' to 3'

Gene	Complete name	Ensembl ID	Location	Sens
SLC18B1 / C6ORF192	solute carrier family 18 member B1	ENSG00000146409	Chr 6: 132,769,370-132,798,553	-1
CNN3	calponin 3	ENSG00000117519	Chr 1: 94,896,949-94,927,278	-1
MTMR8	myotubularin related protein 8	ENSG00000102043	Chr X: 64,268,081-64,395,431	-1
PLCG1-AS1-001 (miscRNA) / TOP1- AS1	PLCG1 antisense RNA 1	ENSG00000226648	Chr 20: 41,098,329-41,138,003	-1
CHAT	choline O- acetyltransferase	ENSG00000070748	Chr 10: 49,609,095-49,665,104	+1
EDAR	ectodysplasin A receptor	ENSG00000135960	Chr 2: 108,894,471-108,989,372	-1
ANKRD42	ankyrin repeat domain 42	ENSG00000137494	Chr 11: 83,193,739-83,260,694	+1
GPAT2	glycerol-3-phosphate acyltransferase 2, mitochondrial	ENSG00000186281	Chr 2: 96,021,946-96,039,451	-1
ENST00000390425/ TRAV3	T cell receptor alpha variable 3 (gene/pseudogene)	ENSG00000211777	Chr 14: 21,723,713-21,724,321	+1
LOC100289230 /	NS	NS	Chr 5: 98,929,134-98,931,009	+1
XLOC_005643 LNC RNA	linc-CMAHP-1:1 / linc- FAM65B-1/RP3- 425P12.2	ENSG00000230372	Chr 6: 25,061,853-25,063,735	-1

Figure 1: Autologous stem cell transplantation protocol.

Three blood samples were collected for each patient, first sample (T1) were collected before conditioning regimen. The second (T2) were collected after high dose chemotherapy and before the autologous stem cells transplantation and the last (T3) were collected at the end of the neutropenic phase.

Abbreviation: G-CSF: Granulocyte-Colony Stimulating Factor, HSC: Hematopoietic Stem Cells, CXCR4: chemokine receptor type 4

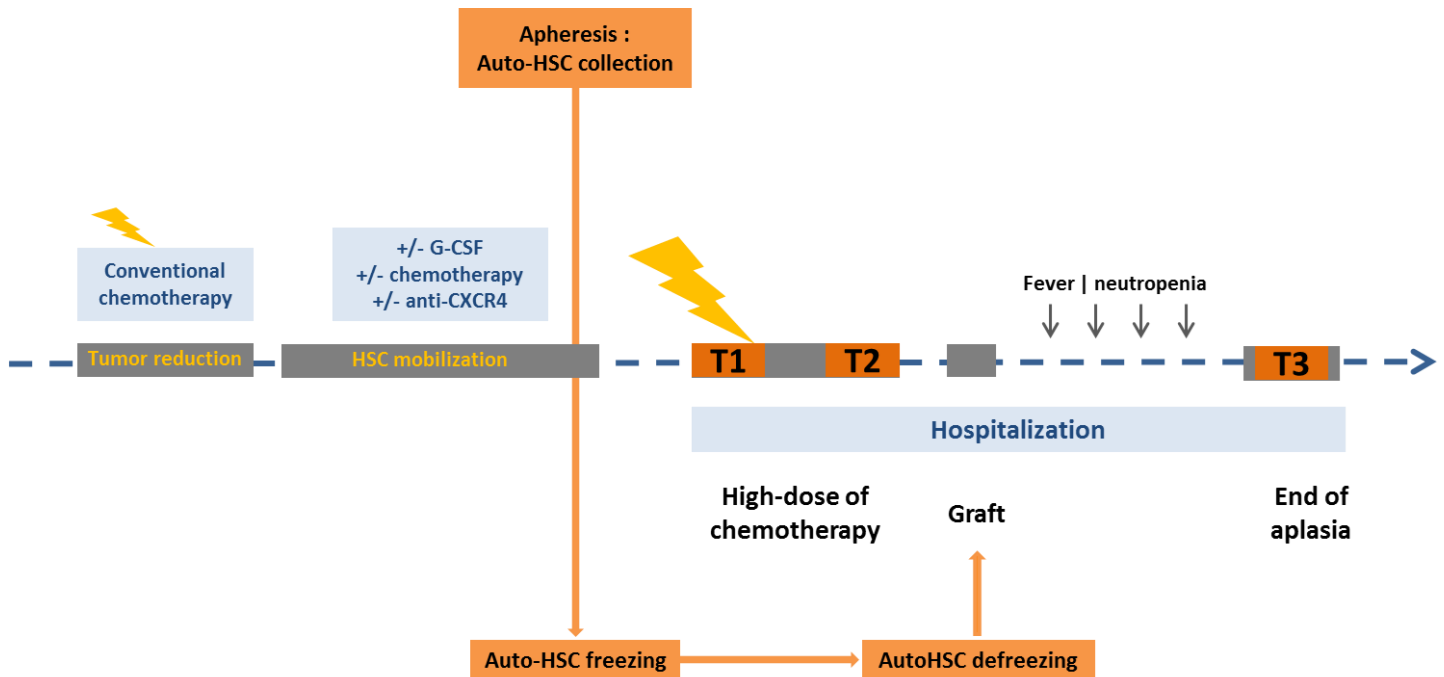


Figure 2: Differential genes expression flow-chart.

Pangenomic array for the transcriptomic analysis have been used, data were filtered and the controls were suppressed, cofactors effects were tested based on their implication on variation of gene expression. A multivariate analysis – LIMMA - using the cofactors already tested was performed to define the gene differentially expressed using Bioconductor library. The LIMMA model is given in the following formula: $Y = \alpha + \beta_1.T + \beta_2.G + \beta_3.I + \epsilon$, where Y is the explained variable, α is the global mean, $\beta_1.T$, $\beta_2.G$, $\beta_3.I$, are the model coefficients, T, G, I, are the quantitative variables, $\beta_1.T$, is the treatment, $\beta_2.G$, is the gene effects, $\beta_3.I$ is the infection effects and ϵ is the error term. Then we performed multi-testing correction by fixing the threshold to 5 %, we adjusted the expression data based on the cofactors before to perform the hierarchical clustering

*: Linear Models for Microarray data

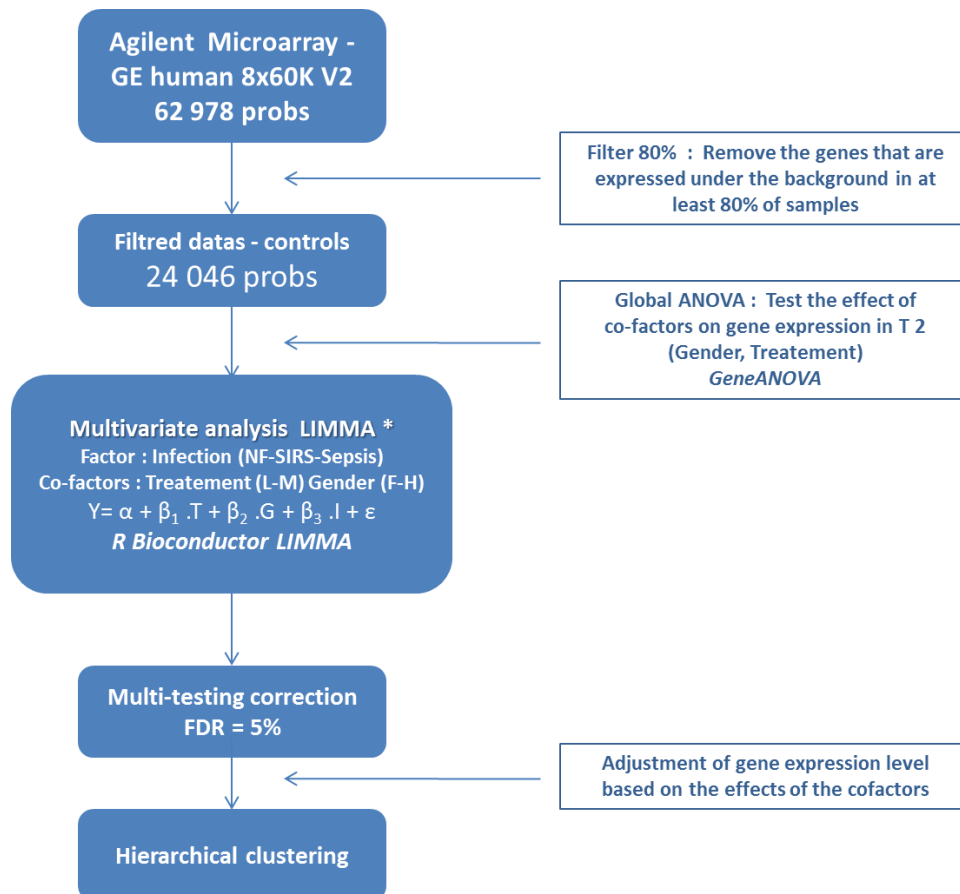


Figure 3: Gene expression profile adjusted on the effects of the cofactors.

Microarray analysis revealed 11 genes differentially expressed. This genes cluster distinguished SIRS or sepsis patients from patients who didn't develop any fever.

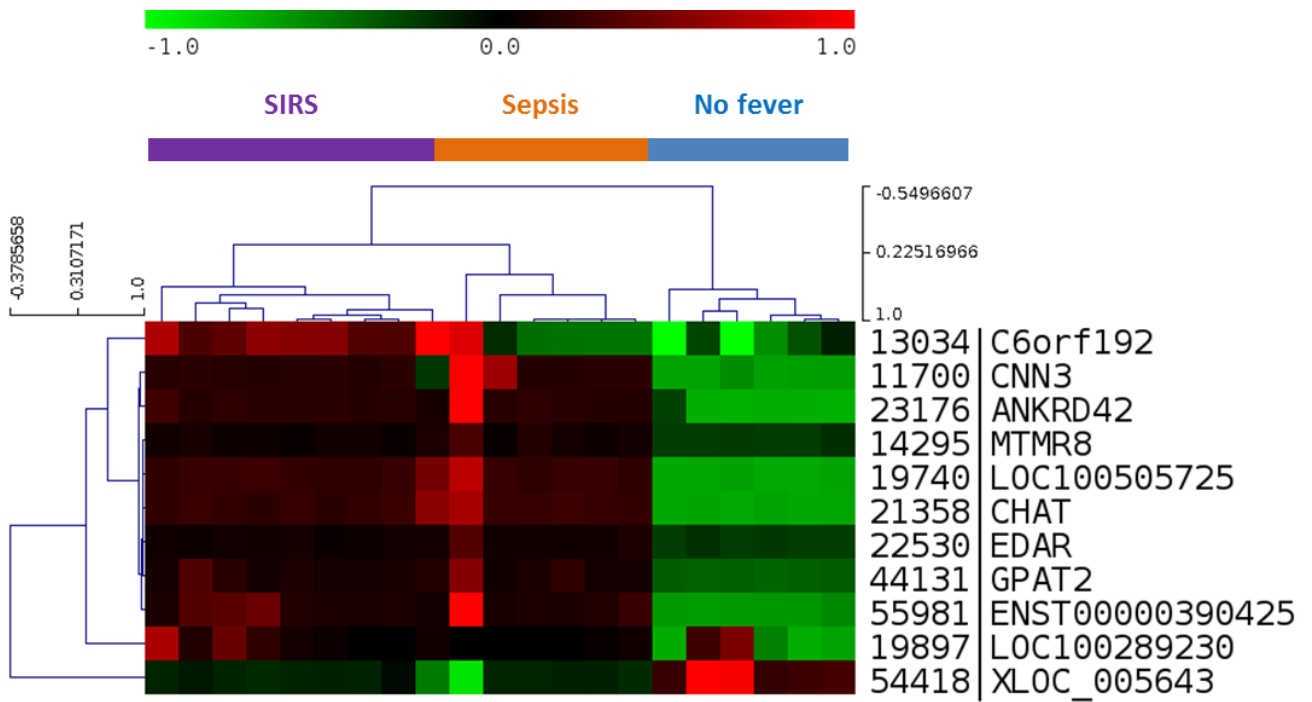
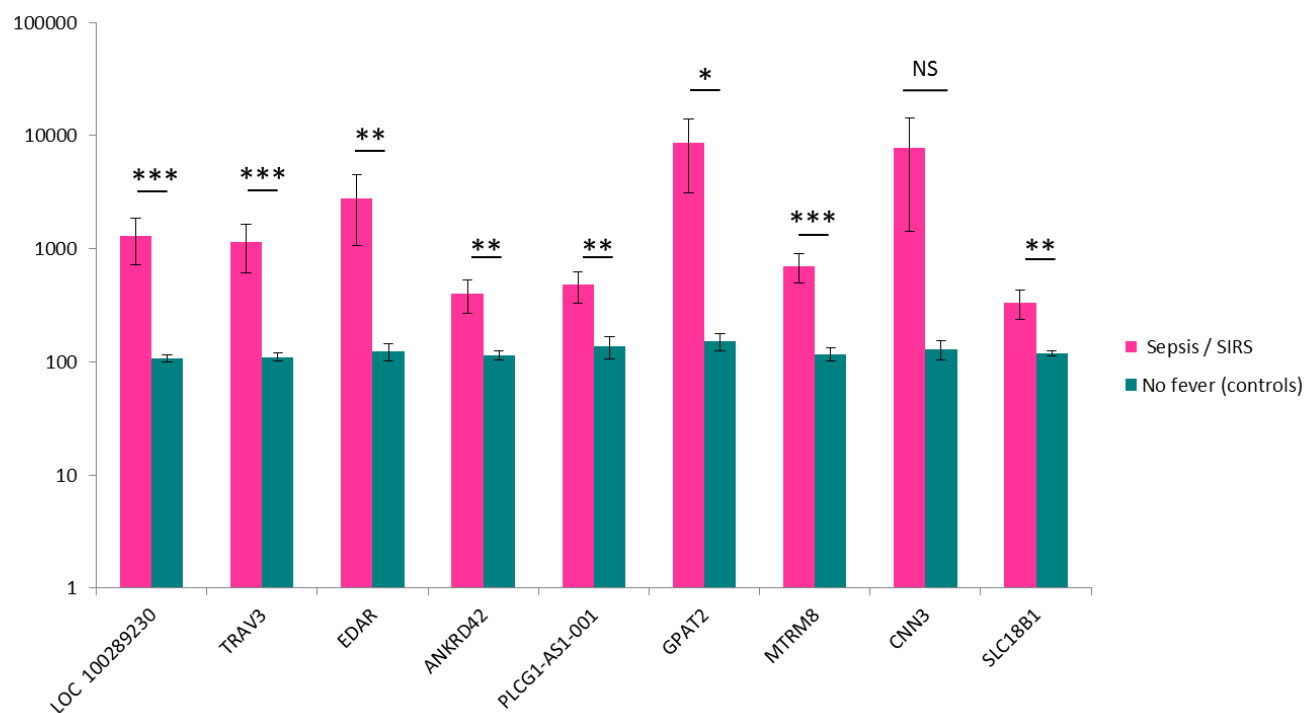


Figure 4: Transcriptomic validation signature by RT-qPCR

Relative gene expression composed the transcriptomic signature of patients who develop SIRS or sepsis compared to patients who do not develop fever (controls)

* = 0.05; ** = 0.01; *** ≤0.01, NS = not significant

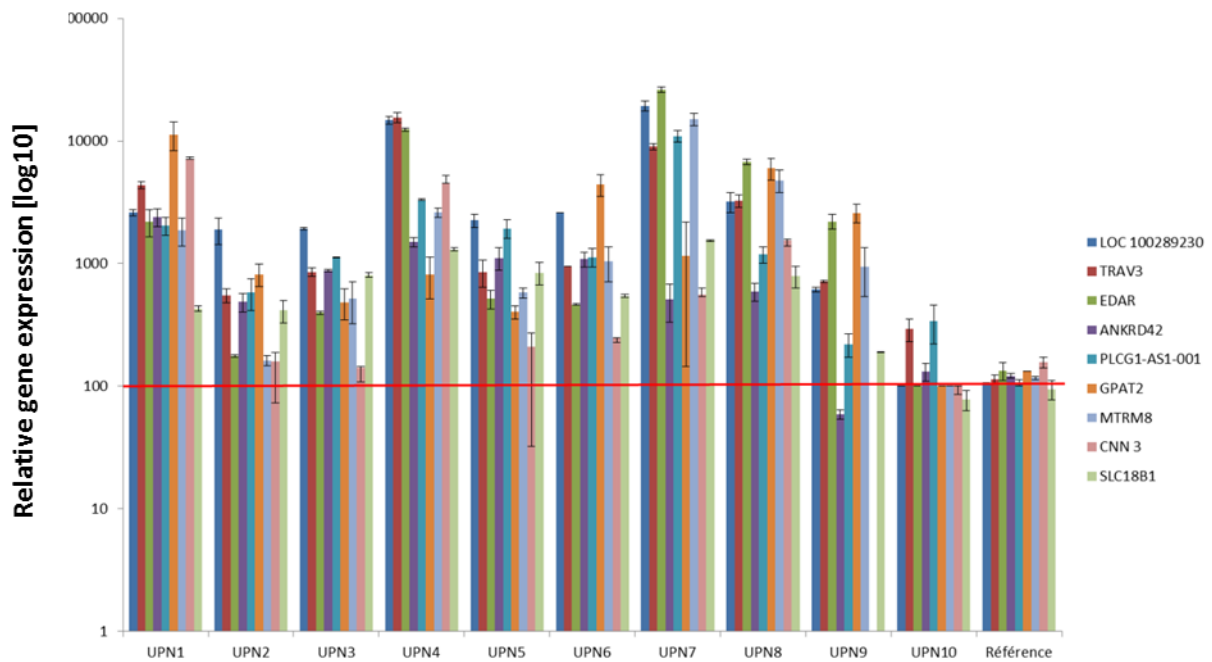


Supplementary data:

Figure 1: Gene expression level of the transcriptomic signature in an independent validation cohort

Gene expression level of the transcriptomic signature using RT-q-PCR in 10 patient samples of an independent replication cohort. Expression level was normalized on GAPDH gene (Housekeeping gene) and a theoretical value (calculated from average gene expression of patient sample who did not develop fever –controls)

UPN: Unique patient number



Chapitre 3 :

**Interleukine -1 β : marqueur
potentiel de rechute précoce
chez les patients autogreffés
recevant le melphalan comme
chimiothérapie de
conditionnement**

Interleukine -1 β : marqueur potentiel de rechute précoce chez les patients autogreffés recevant le melphalan comme chimiothérapie de conditionnement

Introduction et justificatifs du travail

La rechute précoce des patients atteints de myélome ayant reçu une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques en raison du *rush* cytokinique est un problème en hématologie et le besoin d'identifier un marqueur de rechute précoce est nécessaire. Dans cette partie de ma thèse, nous avons eu comme objectif : d'identifier l'effet de du conditionnement chimiothérapeutique du melphalan sur les PBMCs en utilisant une approche transcriptomique, ainsi que d'identifier un marqueur potentiel de rechute précoce chez ces patients autogreffés.

Matériels et Méthodes

Cette partie de l'étude a été réalisée en utilisant le même matériel et les mêmes données biologiques que l'étude précédente (identification de la signature transcriptomique de la survenue du sepsis et et/ou de SIRS) pour cela les parties : échantillons biologiques, aspects légaux et éthiques, chimiothérapies de conditionnement, modèle expérimental, récolte des PBMC, extraction des ARN, quantification et contrôle de qualité, l'étude transcriptomique (les puces à ADN Agilent, l'étude d'expression pangénomique) la normalisation des données, et traitement des données normalisées, de la partie : matériels et méthodes restent identiques. Seule la partie : analyse statistique diffère et sera expliquée en détail ci-dessous.

L'analyse statistique

Dans le but d'identifier les gènes différentiellement exprimés chez les patients qui ont reçu le melphalan en tant que conditionnement chimiothérapeutique entre le T1 (temps d'hospitalisation et avant chimiothérapie) et le T2 (après chimiothérapie et avant la greffe), un test-t apparié a été appliqué sur les données normalisées après filtre (24 046 sondes). Le principe du test-t apparié est de comparer le T1 du patient 1 au T2 du patient 2, ainsi de suite. Au total, les échantillons de 15 patients ont été analysés (15 échantillons du T1 et 15 échantillons du T2). Une correction des tests multiples a été effectuée et un FDR de 5 % a été fixé. (**Figure 18**)

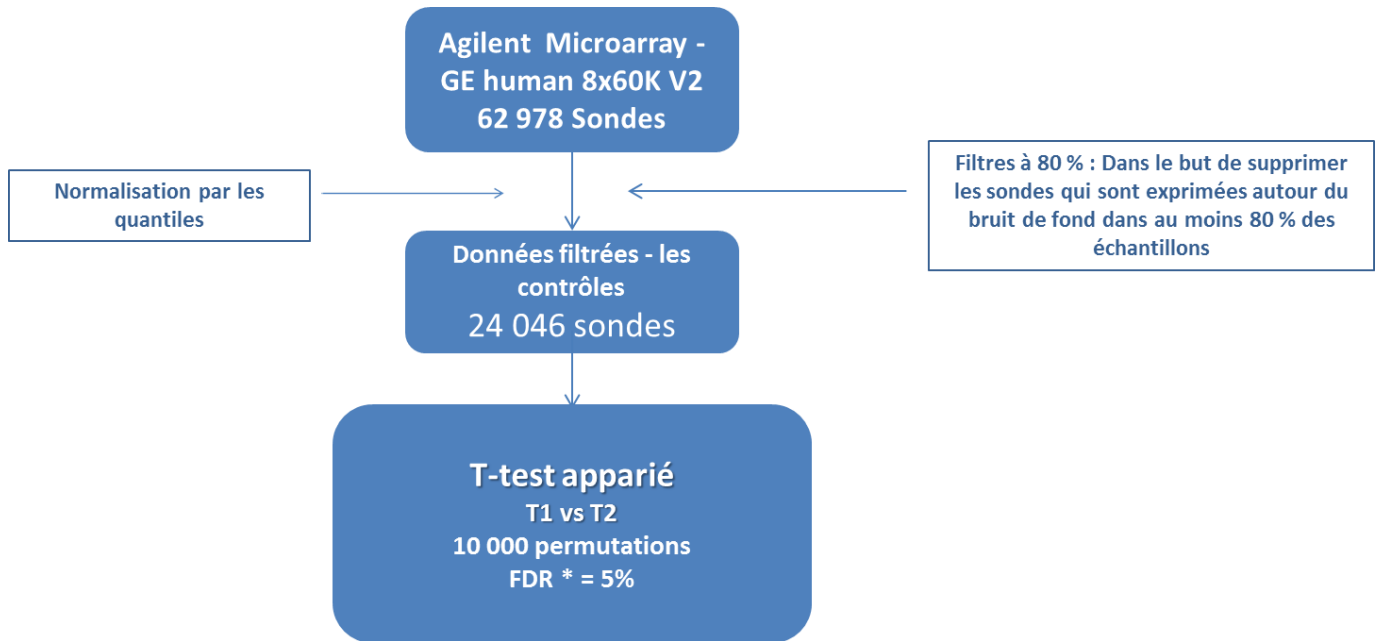


Figure 18 : Pipeline d'analyse de l'expression des gènes

Les données brutes sont filtrées et les contrôles supprimés, une normalisation par les quantiles est appliquée. Un test t apparié sur les données normalisées puis un clustering hiérarchique a été réalisé sur les gènes retrouvés comme différentiellement exprimés. Un FDR de 5 % a été fixé.

Un clustering hiérarchique non supervisé a été réalisé sur les données normalisées et ajustées sur la médiane (gènes et échantillons) selon leurs expressions en utilisant *TMeV* (*Tigr MultiExperiment Viewer* <http://www.tm4.org/mev>). La corrélation de *Pearson* a été utilisée, les clusters ont été groupés sur la base de *linkage average method*. 10 000 permutations ont été générées au hasard afin de corriger les tests multiples et fixer un seuil de significativité. Ici, le *FDR* a été fixé à 5 %.

J'ai réalisé un enrichissement en termes fonctionnels en utilisant l'outil *g : Profiler*. C'est une base de données publique qui permet d'analyser les listes de gènes issues d'expérimentations génomiques à haut débit. Les termes *Gene Ontology* sont la source la plus utilisée pour l'annotation fonctionnelle. L'outil *g : Profiler* permet aussi d'identifier des voies biologiques et métaboliques ainsi que de mettre en évidence les enrichissements de site de fixation de facteurs de transcription pour chaque gène. Nous avons fixé le seuil de significativité à une p-valeur corrigée de *Bonferroni* à 0,05 (239, 240).

Résultats

Identification du profil d'expression de l'effet du melphalan

J'ai réalisé un test t apparié sur les données normalisées (24 046 sondes dont l'expression est au-dessus du bruit de fond). Le test t permet d'identifier 6 985 sondes ce qui correspond à 5 225 gènes différentiellement exprimés entre le T1 (temps du jour de l'hospitalisation et avant chimiothérapie) et le T2 (après chimiothérapie et avant la greffe) chez les patients traités par melphalan. Autrement dit, la variation des 5225 gènes représente l'effet du melphalan sur l'expression des PBMC avec un FDR de 5 %. Les échantillons ont été séparés en deux, d'un côté le T1 (échantillon de patient avant chimiothérapie) et de l'autre côté le T2 (échantillons de patients après chimiothérapie et avant la greffe) **figure 10**. Le groupe T1 est censé n'être composé que d'échantillons du groupe T1 mais celui-ci est hétérogène et se compose d'échantillons appartenant au groupe T1 ainsi que d'échantillons du groupe T2. Le groupe T2 est homogène et se compose d'échantillons appartenant seulement au groupe T2. Les gènes sont divisés en deux grands *clusters* (**Figure 19**). Le cluster 1 correspond aux gènes qui sont différentiellement exprimés entre T1 et T2 et sont surexprimés chez les patients après avoir reçu la chimiothérapie, le cluster 1 est composé de 425 gènes. Au contraire, le cluster 2 correspond aux gènes différentiellement exprimés entre T1 et T2 et sont surexprimés chez les patients avant la chimiothérapie, le cluster 2 est composé de 1 909 gènes.

Les 5225 gènes différentiellement exprimés issus de l'analyse statistique ont été utilisés pour l'annotation fonctionnelle *in silico*. Un enrichissement en termes fonctionnels permet d'identifier les différentes catégories de gènes différentiellement exprimés. Pour cela *g : Profiler* a été utilisé en fixant un seuil de significativité à 5 %. Pour le *Cluster 1* (se compose des gènes qui sont sous-exprimés dans le T1 par rapport à T2) des enrichissements en termes fonctionnels ont été retrouvés tels que : régulation de l'apoptose, chimiotaxie, ou régulation de l'activité des transférases avec des p-valeurs corrigées significatives de $7,3 \cdot 10^{-4}$, $1,9 \cdot 10^{-3}$ et $4,9 \cdot 10^{-2}$, respectivement (**Figure 20**).

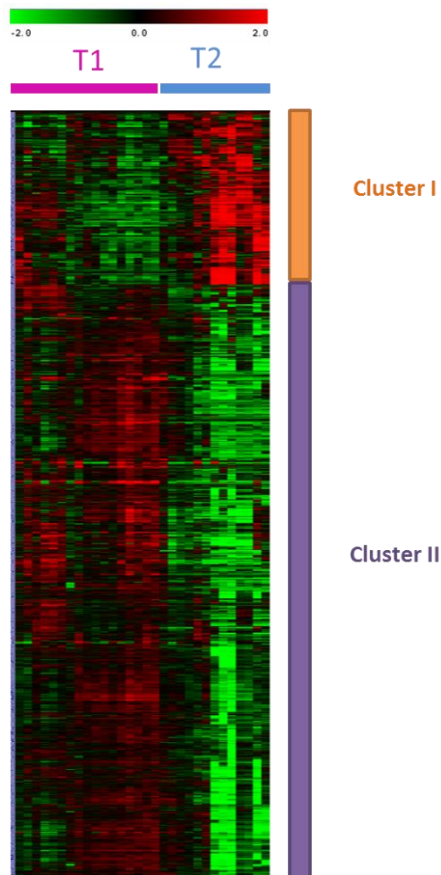


Figure 19 : Profil d'expression de l'effet du melphalan

Les gènes sous exprimés sont représentés en **vert**, les gènes surexprimés sont en **rouge**. Sur l'axe des abscisses ; les échantillons séparés sur deux branches **T1 (Avant chimiothérapie)** et **T2 (Après chimiothérapie)**. Sur l'axe des ordonnées ; les sondes qui représentent les gènes différentiellement exprimés, ces dernières sont séparées en deux clusters ; **Cluster I** et **Cluster II**

Pour le *Cluster II* (gènes qui sont surexprimés dans le T1 par rapport à T2) des enrichissements en termes fonctionnels ont été retrouvés tels que : biosynthèse des protéines, activation des lymphocytes, apoptose, et endommagement de l'ADN avec des avec des p-valeurs corrigées significatives de $1,4 \cdot 10^{-44}$, $1,4 \cdot 10^{-7}$, $1,4 \cdot 10^{-5}$ et $2,5 \cdot 10^{-5}$, respectivement (**Figure 21**)

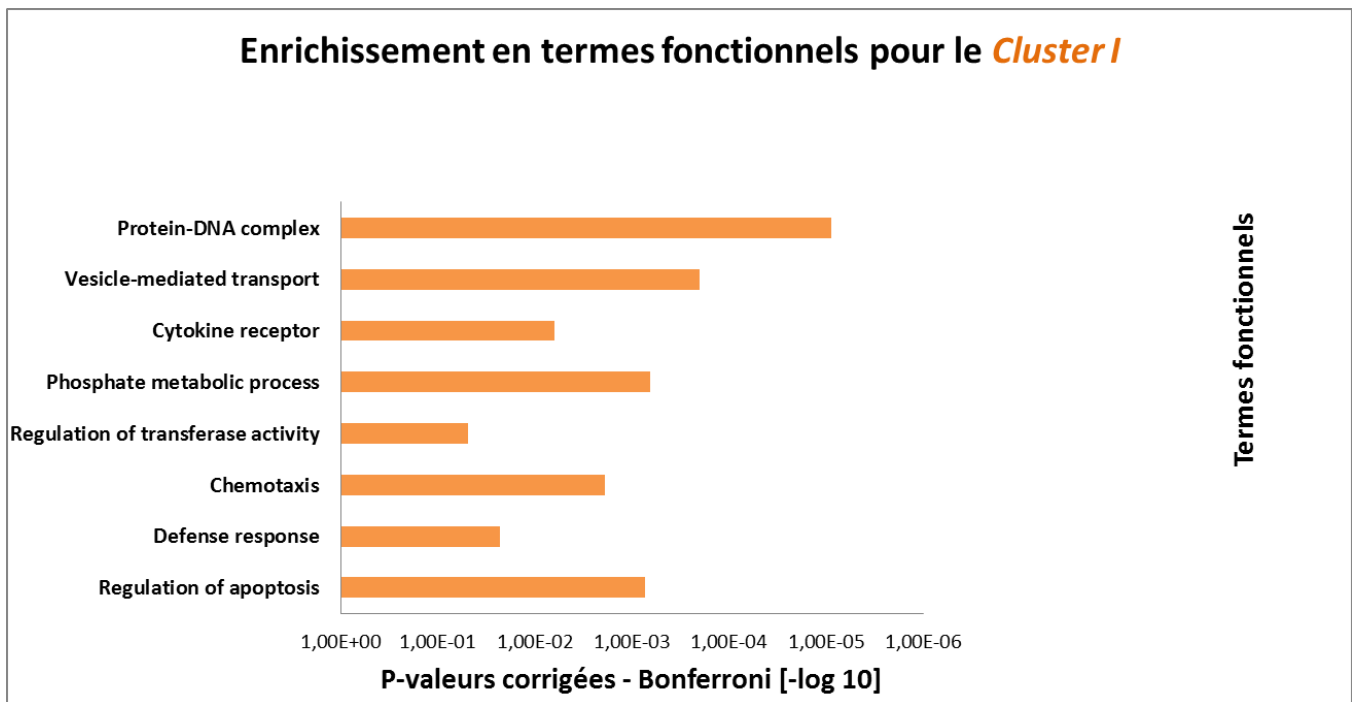


Figure 20 : Enrichissement en termes fonctionnels du Cluster I

Résumé de certains enrichissements en termes fonctionnels (Go termes) trouvés avec *g* : Profiler pour le Cluster I. En ordonne, les *p*-valeurs corrigés (correction de Bonferroni) en fonction de Go termes sélectionnés. Tous les enrichissements sont statistiquement significatifs avec des *p*-valeurs < 0,05.

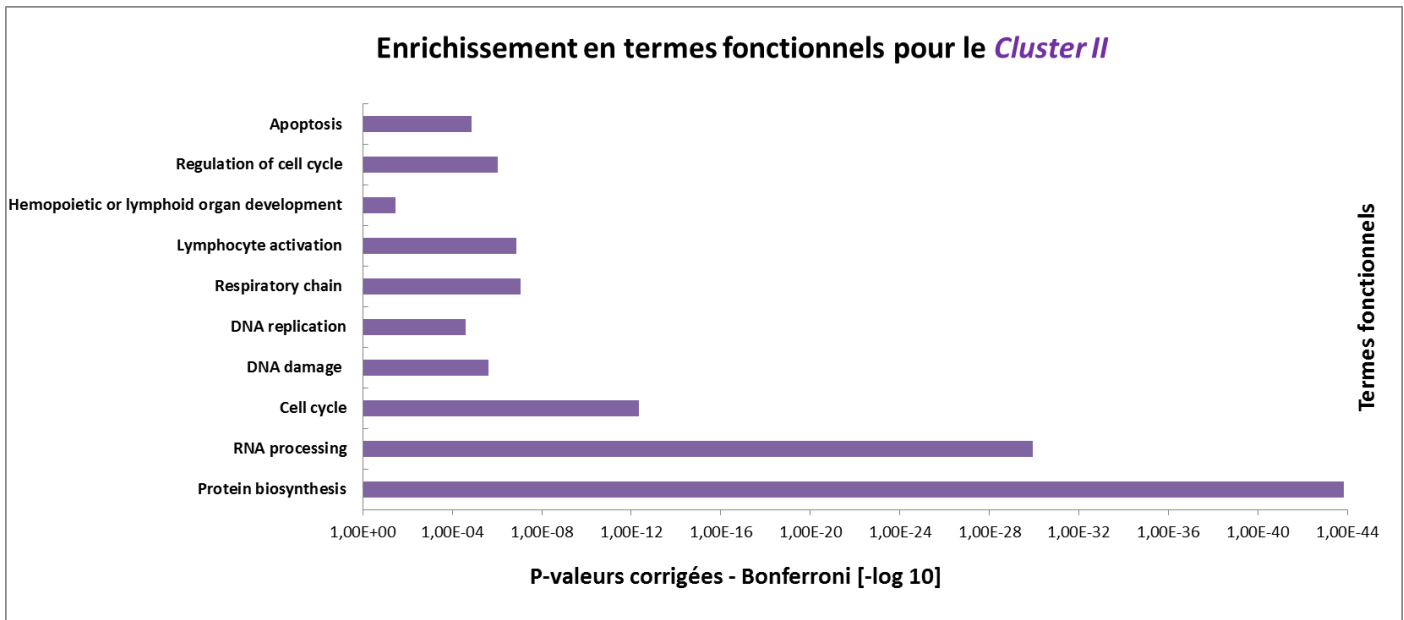


Figure 21 : Enrichissement en termes fonctionnels du Cluster II

Résumé de certains enrichissements en termes fonctionnels (Go termes) trouvés avec *g* : Profiler pour le Cluster II. En ordonne, les *p*-valeurs corrigés (correction de Bonferroni) en fonction de Go termes sélectionnés. Tous les enrichissements sont statistiquement significatifs avec des *p*-valeurs < 0,05.

Discussion

Dans la bibliographie, je n'ai relevé aucune étude transcriptomique qui a été réalisée dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques, visant à voir l'effet du melphalan sur l'expression génique des PBMC. 5 225 gènes ont été identifiés comme étant différentiellement exprimés entre le T1 (temps du jour de l'hospitalisation et avant chimiothérapie) et le T2 (après chimiothérapie et avant la greffe) chez les patients traités par melphalan avec un FDR de 5 %. Autrement dit, l'expression de 5 225 gènes est dérégulée après le conditionnement chimiothérapeutique.

Le cluster I se compose des gènes différentiellement sous-exprimés du T2 (après la chimiothérapie) par rapport au T1. Le melphalan est un agent alkylant cytostatique, il empêche la séparation et la réplication de l'ADN (241). Par ses deux groupes alkylés, il établit les liaisons covalentes stables avec les groupements nucléophiles des deux brins d'ADN, empêchant alors la réplication cellulaire. Il inhibe aussi la synthèse de l'ADN et de l'ARN et cause une cytotoxicité dans les cellules tumorales. Cela explique la surexpression des gènes appartenant aux voies de régulation de l'apoptose, de chimiotaxie ainsi que d'autres voies biologiques. D'un autre côté, le cluster II se compose des gènes différentiellement sous-exprimés du T2 (après la chimiothérapie) par rapport au T1. En effet, le mécanisme d'action du melphalan explique aussi l'enrichissement en termes fonctionnels que nous avons mis en évidence dans le cluster II, notamment, la sous expression des gènes impliqués dans la réplication de l'ADN, et de l'ARN, de la production des protéines, dans le cycle cellulaire et autres. Nous avons mis en évidence une sous-expression de certains gènes de l'apoptose, ceci peut être expliqué par le fait que la cellule enclenche des systèmes de résistance à la mort cellulaire en sous-exprimant certains gènes apoptotiques, mais que cela ne modifiera pas l'issue de l'effet du melphalan à haute dose qui est la destruction de la majorité des cellules circulantes du sang périphérique ainsi que de la moelle osseuse.

Comme attendu, le clustering hiérarchique a permis de séparer les échantillons de patients en deux groupes selon leur profil d'expression. Le groupe T1 qui se compose des échantillons de patients à leur admission à l'hôpital et avant la chimiothérapie à haute dose, et le groupe T2 qui se compose des échantillons de patients après le conditionnement chimiothérapeutique et avant la réinjection des cellules souches. Cependant, la composition du groupe T1 n'est pas homogène, 4 sur 15 échantillons de patients qui sont censés appartenir au groupe T2, clusterisent avec les échantillons du groupe T1. Une analyse plus approfondie, nous a permis de démontrer que chez les patients du groupe T2 qui se clusterisent avec les échantillons du groupe T1, l'expression de l'IL-1 β était statistiquement à la hausse (p -valeur = 5×10^{-10}) par rapport aux échantillons des patients appartenant au groupe T2 et qui se clusterisent dans le bon groupe.

De plus, il n'y a pas de corrélation entre la rechute précoce et le statut de réponse à la chimiothérapie (rémission complète ou rémission partielle).

L'expression de l'IL-1 β par les PBMC induit l'expression et la sécrétion de l'IL-6 par les plasmocytes. L'IL-6 a un rôle important dans le cas du myélome, s'impliquant ainsi dans le développement normal et anormal des plasmocytes (242). L'interleukine-6 est un facteur crucial dans la croissance cellulaire, la prolifération et la survie des cellules myélomateuses (243-247). Cette cytokine est aussi un stimulateur puissant de l'ostéoclastogenèse et un sculpteur du microenvironnement dans la moelle osseuse des patients atteints de myélome. Pour cela, l'intérêt pour l'IL-6 est suscité et celle-ci a été considérée comme une cible thérapeutique potentielle dans le cas du myélome (243). Comme application à cette théorie, des études précliniques et cliniques ont été mises en place (243, 248). *Hunsucker* et coll. réalisent une étude *in vitro* sur des lignées cellulaires myélomateuses et sur des échantillons de patients atteints de myélome et montrent que l'association Siltuximab (un anti-IL-6) melphalan améliore l'effet antiprolifératif des plasmocytes primaires issus de patients atteints de myélome, les gammopathies monoclonales de signification indéterminée et l'amylose. Ceci pourrait justifier l'utilisation du Siltuximab en clinique en combinaison avec le melphalan (249). *San-Miguel* et coll. réalisent une étude clinique randomisée en phase II sur l'utilisation d'une combinaison de bortezomib-melphalan et prednisone en avec ou sans Siltuximab (un anti-IL-6), dans le cadre d'une chimiothérapie conventionnelle (réduction tumorale) chez des patients non éligibles à une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (patients dont l'âge est ≥ 65 ans). Cette étude inclut 106 patients, ces derniers ont été divisés en deux groupes (avec Siltuximab vs sans Siltuximab). L'étude n'a pas confirmé son hypothèse selon laquelle l'ajout de l'anti-IL-6 augmenterait le taux de réponse au traitement (248).

Le Siltuximab (CNTO 328) est un anticorps monoclonal chimérique Homme-souris anti-IL-6, il a démontré une activité anti-cancéreuse prometteuse dans le cadre du myélome en combinaison avec le bortezomib (250) et avec la dexaméthasone (251) dans des modèles précliniques de myélome (249). En raison des résultats encourageants sur l'inhibition de l'IL-6 dans le myélome (252) ainsi que des données précliniques, le Siltuximab est actuellement inclus dans des essais cliniques en combinaison principalement avec le bortezomib (253) et la dexaméthasone (249, 251). Chez l'Homme, dans des modèles de lignées cellulaires myélomateuses et en présence d'IL-6, le Siltuximab inhibe la phosphorylation de ERK-1/2, STAT-1, et STAT-3, bloquant ainsi les signaux essentiels pour la croissance cellulaire et la survie (249, 250). De plus, le Siltuximab inhibe la surexpression de Mcl-1 (myeloid cell leukemia 1) induite par le bortezomib et la protéine *heat shock* 70 (HSP-70), ces deux protéines pourraient être impliquées dans la chimiorésistance (250). En raison de ces données prometteuses que montre l'effet de Siltuximab ainsi que d'autres approches anti-IL-6 telles que le fragment de la chaîne unique NRI (254) et l'anticorps humanisé 1339 (255) il serait très intéressant d'évaluer la combinaison du melphalan en tant que conditionnement chimiothérapeutique et d'un anti-IL-6.

Chez les patients de notre cohorte, la moyenne de la durée de rechute des patients dont les échantillons ne clusterisent pas avec le bon groupe et dont l'expression de l'IL-1 β est élevée (Les 4 sur 15 échantillons appartenant au groupe T2, mais clusterisant avec le groupe T1) est de 15 mois avec un écart-type standard de 8,24. La moyenne de rechute des patients dont les échantillons clusterisent avec le bon groupe (les 11 sur 15 échantillons appartenant au groupe T2 et clusterisant avec le groupe T2) est de 27,25 mois et un écart-type standard de 9,77. Parmi les 11 échantillons qui clusterisent correctement, 4 patients ont rechuté. Les 7 autres sont en rémission depuis en moyenne 37,3 mois avec un écart-type standard de 13. La différence de taux de rechute est significativement différente avec une p-valeur de 0,05 entre les patients dont l'expression de l'IL-1 β est augmentée par rapport aux à ceux dont l'expression de l'IL-1 β est diminuée.

Nous n'avons malheureusement pas pu confirmer le taux de l'IL-1 β et l'IL-6 par dosage protéique. Des expériences d'ELISA et de cytométrie de flux ont été investiguées dans le but de doser les interleukines dans le plasma d'échantillons de patient n'ont donné aucun résultat. Nous pouvons l'expliquer par deux hypothèses différentes : la première est un problème technique, les plasmas de patients ont été récupérés puis stocker à -80 ° C durant toute la durée de l'étude, les cytokines ont été peut-être altérées et dégradées. La seconde hypothèse est que la différence dans l'expression de l'IL-1 β que nous avons mis en évidence est trop précoce et que la protéine (IL-1 β) n'est pas encore produite et par la même explication nous n'avons pas pu doser l'IL-6. Une mise en place de protocole de dosage de l'IL-1 β et l'IL-6 dans le plasma à des intervalles réduits après la chimiothérapie à haute dose puis un suivi de patient en corrélant le taux des cytokines à la période de rechutes pourraient confirmer notre hypothèse.

Nous proposons le modèle suivant (**Figure 22**) ; l'augmentation de l'expression de l'IL-1 β par les PBMCs influe sur l'expression à la hausse de l'expression et de sécrétion de l'IL-6 par les plasmocytes, ce qui induit la prolifération des plasmocytes et une rechute précoce des patients ou une résistance à la chimiothérapie (249). Même si l'ajout de l'anti IL-6 en combinaison du Bortezomib-melphalan-prednisone dans l'étude clinique de phase II (en chimiothérapie conventionnelle) de *San-Miguel* et coll. n'améliorait pas le taux de réponse au traitement, il serait intéressant de voir l'effet de la combinaison melphalan à haute dose et Siltuximab (Anti-IL-6) dans le cadre du conditionnement chimiothérapeutique et d'une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Ceci pourrait diminuer le *rush* cytokinien, ce qui réduirait la prolifération des cellules tumorales, augmenterait l'efficacité du melphalan et réduirait le risque de rechute précoce post-autogreffe.

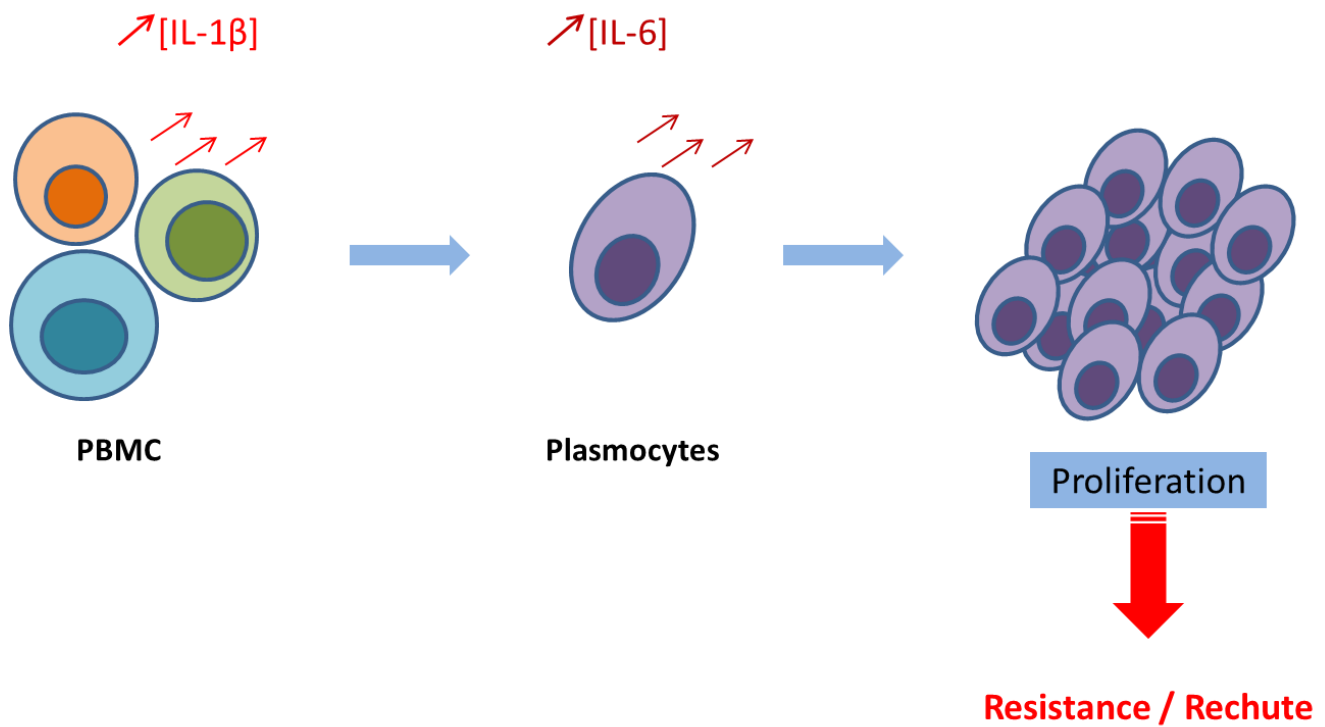


Figure 22 : Schéma montrant l'implication de l'IL-1 β et l'IL-6 dans la résistance à la chimiothérapie et la rechute précoce

La sécrétion de l'IL-1 β par les PBMC induit l'expression de l'IL-6 par les plasmocytes qui aide à leur prolifération ce qui en résulte la résistance à la chimiothérapie et à la rechute précoce des patients autogreffés.

Conclusion

L'interleukine-1 β sécrétée par les PBMC, induit l'expression de l'interleukine-6 par les cellules plasmiques. L'IL-6 est une cytokine impliquée dans la croissance cellulaire, la prolifération et dans la survie cellulaire des cellules myélomateuses. La surexpression de l'IL-1 β pourrait être un bon biomarqueur de rechute précoce chez les patients atteints de myélome candidats à une autogreffe et recevant le melphalan comme chimiothérapie de conditionnement.

En perspective, une étude sur une cohorte plus grande serait un bon moyen de vérifier l'hypothèse que l'IL-1 β serait un marqueur pronostique de rechute précoce. Il serait aussi intéressant ensuite de combiner le melphalan à un anti-IL-6 (comme le Siltuximab) afin de réduire le rush cytokinique, ce qui réduirait la prolifération précoce des cellules tumorales, et ainsi augmenter l'efficacité du melphalan et réduire la rechute précoce des patients autogreffés atteints de myélome.

Publication en cours de rédaction : Interleukin-1 β : A potential early relapse marker in autograft patients receiving melphalan as conditioning chemotherapy

Interleukin-1 β : A potential early relapse marker in autograft patients receiving melphalan as conditioning chemotherapy

Labiad.Y¹, Venton.G^{1,2}, Farnault.L², Loriod.B¹, Fernandez-Nunez.N¹, Nguyen.C¹ and Costello.R^{1,2}*

¹ *Aix-Marseille Université ; INSERM, UMR1090, TAGC Campus de Luminy, Marseille, F_13288, France*

² *Service d'Hématologie et de Thérapie Cellulaire Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille, Centre Hospitalier
Universitaire La Conception, Marseille, France*

** Corresponding author*

Key words: Melphalan high dose chemotherapy, treatment resistance, early relapse, Auto-HSCT,
interleukin-1 β

Current address for correspondence: Pr. Régis T Costello

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

Phone number: (33) 4 91 38 41 50,

Fax number: (33) 4 91 36 41 54,

E-mail address: regis.costello@free.fr

Introduction

Multiple myeloma (MM) is a hematological malignancy disease that affects clonal B cells and which is characterized by the accumulation of clonal plasma cells due to increased survival and proliferation (249, 256). Adhesion of myeloma cells to bone marrow stromal cells induces the latter to secrete pro-survival cytokines, including interleukine-6 (IL-6). IL-6 activates multiple cell survival and proliferation signaling pathways in plasmocytes, suggesting that IL-6 blockade could be a good therapeutic target for MM therapy (249, 256).

Autologous hematopoietic stem cells transplantation (auto-HSCT) remains the first line reference treatment in young (<65 years) patients. Melphalan is an alkylating agent that induces the formation of DNA interstand crosslinks regarded as critical toxic lesion (249, 257, 258). In MM, melphalan is administrated as high-dose conditioning chemotherapy for auto-HSCT and as low dose therapy in combination with other drugs (259, 260). The aim of our study is to analyze using a transcriptional approach the effects of high-dose melphalan chemotherapy on peripheral blood mononucleated cells (PBMCs) in order to identify prognosis factors in MM patients treated by auto-HSCT.

Material and methods

Patient recruitment

The protocol was accepted by the AP-HM Comité de Protection des Personnes (CPP) Aix-Marseille II and patients were included in the protocol after informed consent. Fifteen patients with MM undergoing auto-HSCT were recruited in the Hématologie et Thérapie Cellulaire Department in the La Conception university hospital (Marseille). There were 10 men and 5 women, with a median age of 59 (range 32-78 years old). All patients had VRD (Velcade®, Dexamethasone®, Revlimid®) chemotherapy (3 to 4 cycles) before auto-HSCT and were in complete remission (n=8), partial remission (n=3), very good partial response (n=3), or in progression (n=1) before auto-HSCT.

PBMCs isolation

For each patient, blood was collected at two time points, just before and 24 hours after melphalan conditioning regimen, before reinfusion of the autologous stem cell graft. Blood samples were centrifuged in order to separate the plasma and the other blood components. The plasma was frozen at – 80°C. PBMCs were prepared by Ficoll-Hypaque density-gradient centrifugation. Isolated PBMCs were frozen at -80°C until RNA extraction.

RNA extraction, quantification quality controls

Depending on the cell number, two kits were used for RNAs extraction, the RNeasy Mini Kit Qiagen[®] that accept 10 million of cells and the RNeasy Midi Kit Qiagen[®] that accept 100 million cells. The RNAs were extracted according to the protocol provided by Qiagen. The RNAs were quantified by measuring the optical density measured at 260 and 280 nm, the ratio 260/280 (> 1.8) indicating the purity of the preparation. Quality extracts of ARNs was verified with Agilent 2100 Bioanalyzer[®], which separate RNAs according to their size allowing to detect RNA degradation and also to verify the absence of contamination with genomic DNA. A score on a scale of 0 to 10 was automatically attributed for any sample (RNA Integrity Number) and under 8 the sample was not used. For samples presenting genomic DNA contamination, DNase treatment was performed using the RNase Free DNase Set kit of Qiagen[®].

Pangenomic gene expression

A total of 100ng of RNA was labeled using One-Color Microarray-Based Gene Expression Analysis: Low Input Quick Amp Labeling protocol. Purified Cy3 labeled cRNA (0.6 µg) was hybridized for 17h at 65°C, using the SurePrint G3 human GE 8x60K V2 chips (Agilent Technologies[®]). The microarrays are composed of 62 928 feature. The Probes synthesized on chips have a size of 60 nucleotides. The microarrays were washed using the Gene Expression Wash Buffer Kit (Agilent Technologies, USA) and scanned as for the standard Agilent protocol. The data were processed using Feature Extraction software.

Microarray data normalization Statistical analysis

The library AgiND is implemented in R software allowing to analyze and visualize the data. AgiND is developed on Bioconductor library model tagc.univ-mrs.fr/ComputationalBiology/AgiND/. It is used to diagnose and the normalization of the microarray data. Quantile normalization method was used to normalize the data; the objective is to homogenize the distribution of microarray intensity. A first filter was applied on the data in order to delete controls, then a second filter was applied in order to delete the genes that were expressed at background level in >80%of the samples in each group. For the statistical analysis, we used « TMeV» (Tigr MultiExperiment Viewer) that implements the paired-t test. This statistical analysis aims to identify genes differentially expressed between samples. The empirical p-values were calculated using 10 000 permutations. We performed a hierarchical clustering to group the genes according to their expression. Pearson correlation was used, and the clusters were grouped on the basis of average linkage method (Figure 1). Enrichment analysis was performed using g: profiler tool which is a public web server for characterizing and manipulating gene lists resulting from high-throughput genomic data.

Results

A paired t-test was performed on the normalized data (24 046 probes which expression is higher than the background). The t-test identified 6 985 probes (5225 genes) differentially expressed between sample of patients before and after melphalan conditioning (T1: before chemotherapy; T2: after chemotherapy and before reinfusion of autologous stem cell graft) Otherwise, variation of the 5225 genes represents melphalan effect on PBMC with FDR = 5%. On the dendrogram, in the abscissa, patient samples are separated in two groups, T1: patient samples before melphalan, T2: patient samples after chemotherapy but before reinfusion of autologous stem cell graft) (Figure 2). T1 group is heterogeneous and composed with T1 and T2 samples. In contrast, T2 group is homogeneous and it is composed only with T2 samples. In the ordinate, probes are separated on two clusters. Cluster I, corresponds to the differentially expressed genes between T1 and T2, and are over expressed in the patients that have received their chemotherapy (melphalan), it is composed of 425 genes. Rather, cluster II is composed of the differentially expressed genes between T1 and T2 and are over expressed in the patient after chemotherapy and before auto-HSCT. The cluster II is composed of 1909 genes.

The 5225 differentially expressed genes were used to perform *in silico* functional annotation. g:profiler was used fixing a FDR of 5%. For the cluster I, a list of functional terms enrichment were found like: chemotaxis, regulation of apoptosis and regulation of transferase activity with significant corrected p-values: $1.9 \cdot 10^{-3}$, $7.3 \cdot 10^{-4}$, and $4.9 \cdot 10^{-2}$, respectively (Figure 3).

For the cluster II, a list of functional terms enrichment were found like protein biosynthesis, lymphocyte activation, apoptosis and DNA damage with significant corrected p-values: $1.4 \cdot 10^{-44}$, $1.4 \cdot 10^{-7}$, $1.4 \cdot 10^{-5}$ and $2.5 \cdot 10^{-5}$, respectively (Figure 4).

Discussion

The transcriptomic specific profile of melphalan high dose chemotherapy effect on PBMCs identified 5225 differentially expressed (T1 versus T2) genes with a FDR of 5%. Cluster I is composed of genes that are differentially down expressed in T2 group compared with T1. Cluster II is composed of genes that are differentially up expressed in T2 group compared with T1. Hierarchical clustering allowed to separate sample patients into two groups depending on their gene expression profile. The T2 group is composed of patient samples that received their chemotherapy and the group composition was homogeneous (only T2 samples). In contrast, the T1 group is composed of patient samples that do not receive their chemotherapy, and the group composition was heterogeneous (T1 and T2 samples).

We focused our attention on IL-1 β expression since this cytokine gene expression was drastically up regulated (p value = $5 \cdot 10^{-10}$) following melphalan chemotherapy. The expression of Interleukin 1 β (IL-1 β) by PBMCs induces expression and secretion of Interleukin 6 (IL-6) by plasma cells. IL-6 is a pleiotropic cytokine that has many physiological functions, and impacts many types of solid cancers and hematological

malignancies (261). In MM the pleiotropic, pro-inflammatory cytokine IL-6 is a crucial factor for the growth, proliferation, and survival of the plasma cells (243, 246, 262). Clinical and preclinical studies aiming at IL6 signaling blockade confirm the role of this cytokine in MM pathogenesis (243, 248), (249-251). In our cohort, the mean duration of relapse of the patient samples of the T2 group that clusterized with the T1 group (4 on the 15 analyzed samples) was 15 months (standard deviation of 8.24). The IL-1 β expression of these patients was high compared with the other T2 samples. In contrast, mean duration of relapse of the patient samples of the T2 group that clusterized with T2 group (11 on the 15 analyzed samples) was 27.25 months (standard deviation of 9.77) and their IL-1 β expression was lower than the T2 samples that clusterized in the T1 group. The relapse rate was significantly different among patients whose expression of IL-1 β was increased in comparison with those with reduced expression of IL-1 β (p-value=0.05). Thus overexpression of IL-1 β gene could be a good biomarker of early relapse in patients with MM undergoing autologous-HSCT, this hypothesis will be tested on a larger cohort study.

We propose the following model (Figure 5); the increased expression of IL-1 β by PBMCs induces the expression and secretion of IL-6 by plasma cells, which induces the proliferation of tumor cells and cause early patient relapse and/or resistance to chemotherapy (249). The addition of an anti-IL-6 in a combination of bortezomib-melphalan-prednisone in the phase II clinical study (in conventional chemotherapy) of San Miguel et al. (248) did not improve the rate of response to treatment. Nonetheless it would be interesting to test the effect of melphalan high dose combined with an anti-IL-6 in auto-HSCT. This could decrease the cytokinien rush, which would reduce tumor cells proliferation, thus increasing the efficiency of melphalan and reducing the risk of early relapse in MM patient candidate for autograft.

Conclusion

The inteuleukine-1 β secreted by PBMCs induces the expression of interleukin-6 by plasma cells. IL-6 is a cytokine involved in cell growth, proliferation and cell survival in myeloma cells.

It would be interesting then to combine melphalan and an anti-IL-6 (as Siltuximab) to reduce cytokinien rush, reducing early tumor cell proliferation, and thus increase the effectiveness of high dose melphalan chemotherapy and reduce early relapse of patients with myeloma receiving autologous hematopoietic stem cells transplantation

Figures:

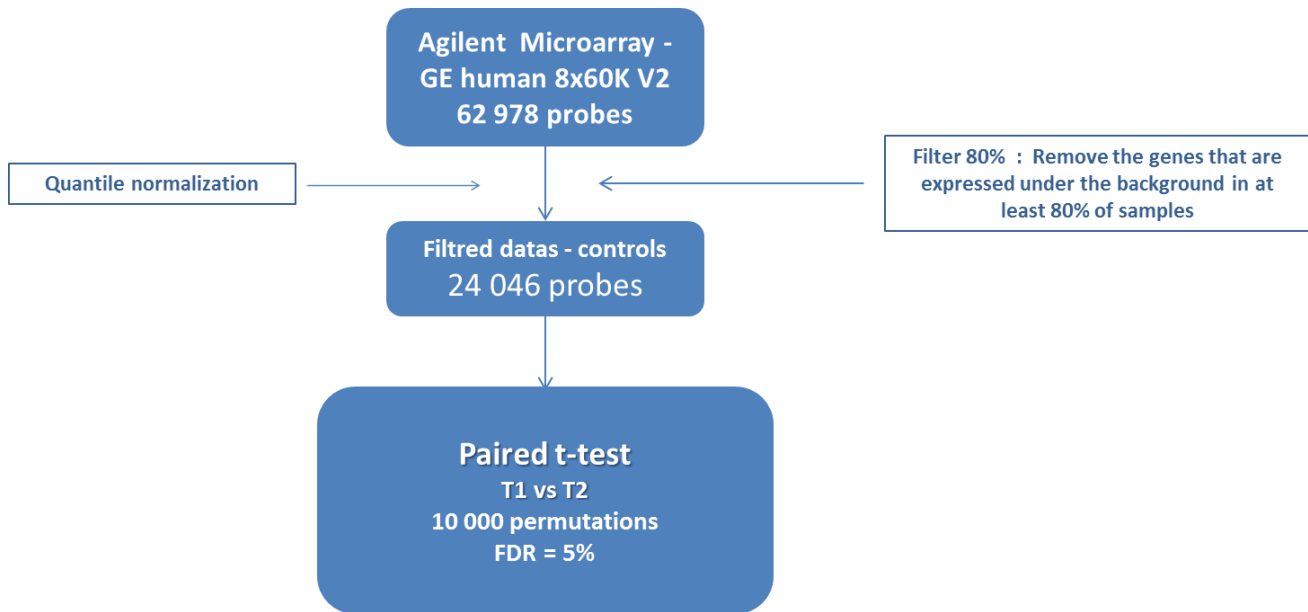


Figure 1 : Gene expression analysis pipeline

The raw data were filtered and then controls were removed. Quantile normalization was applied. A paired t-test was performed on the normalized data and a hierarchical clustering was applied to significant differentially expressed genes between T1 group (sample patients before chemotherapy) and T2 group (sample patients after chemotherapy and before graft). The FDR was fixed at 5%

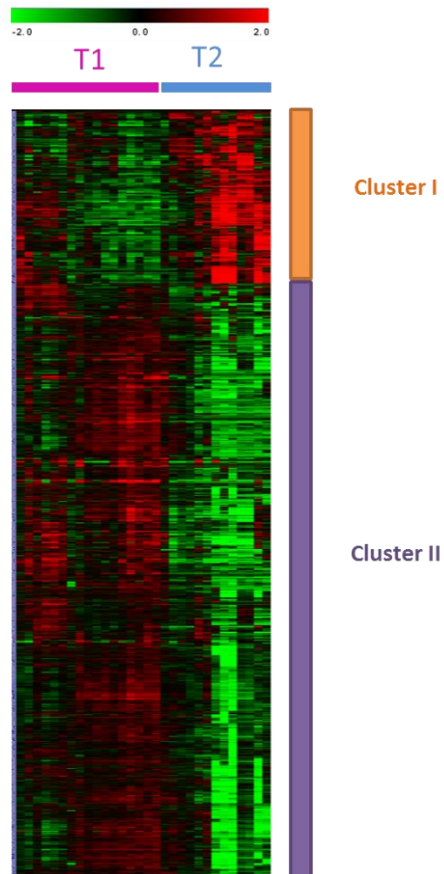


Figure 2: Gene expression profile of melphalan effect

Down-regulated genes are shown in green and the up-regulated genes are in red. On the abscissa axis, the samples are separated into two groups T1 (before chemotherapy) and T2 (after chemotherapy and before graft). On the ordinates, probes that represent differentially expressed genes. The probes are separated into two clusters: Cluster I and Cluster II

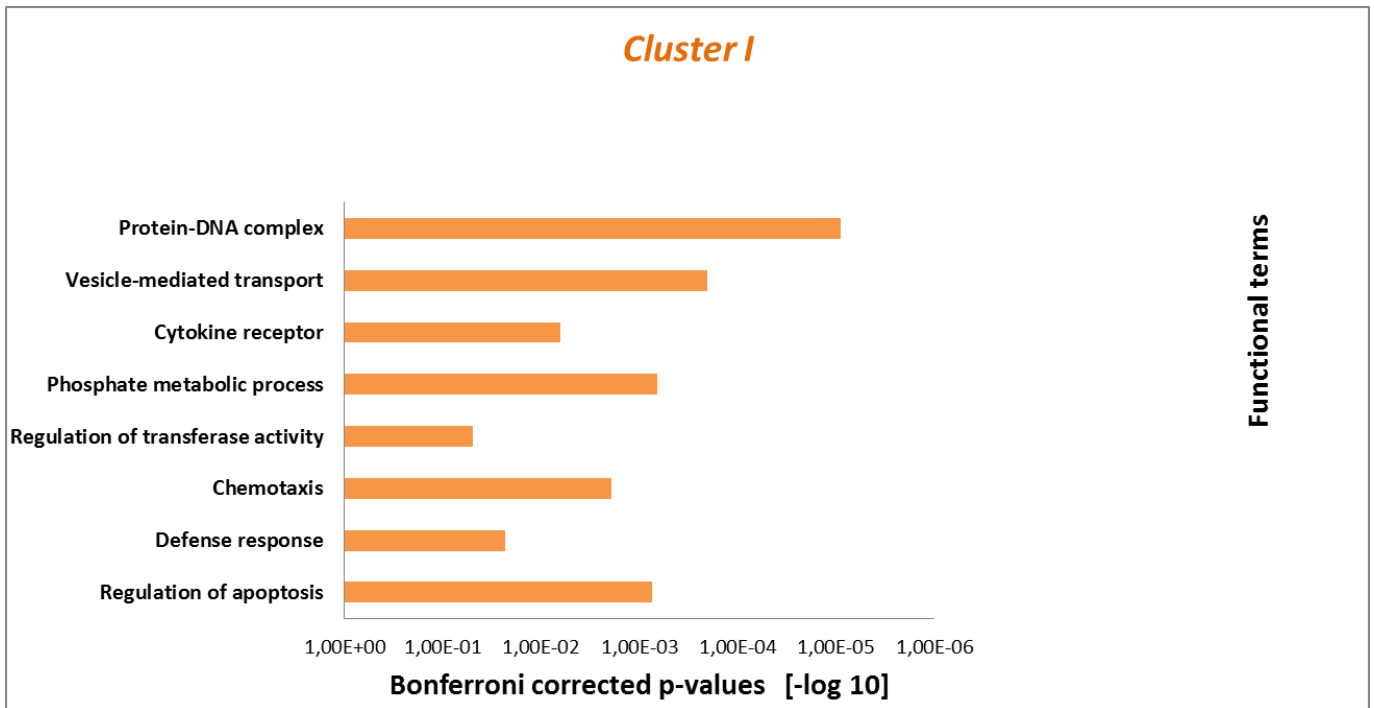


Figure 3: Cluster I functional term enrichment

Summary of some enrichment functional terms (Go terms) found with g: Profiler for Cluster I. In the ordinate, adjusted p-values (Bonferroni correction) according to GO selected terms. All enrichments are statistically significant with p-values <0.05.

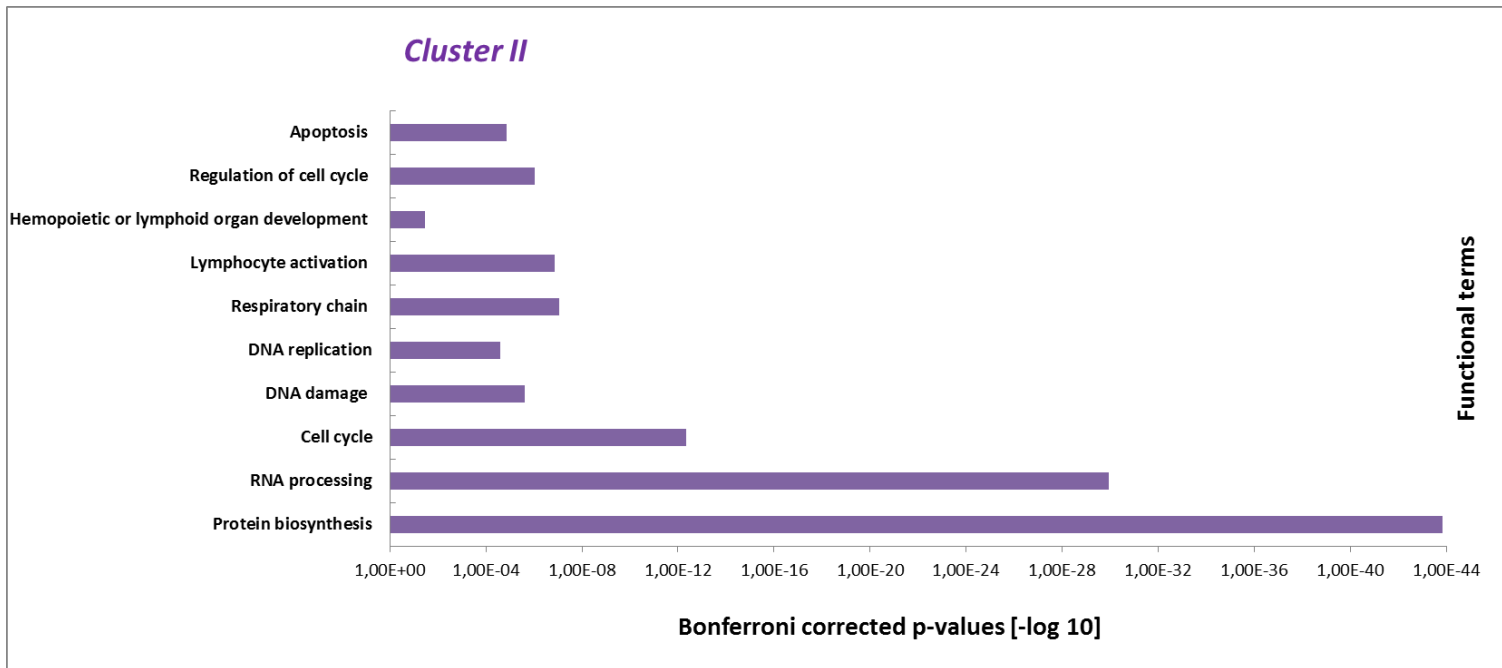


Figure 4: Cluster II functional term enrichment

Summary of some enrichment functional terms (Go terms) found with g: Profiler for Cluster II. In the ordinate, adjusted p-values (Bonferroni correction) according to GO selected terms. All enrichments are statistically significant with p-values <0.05.

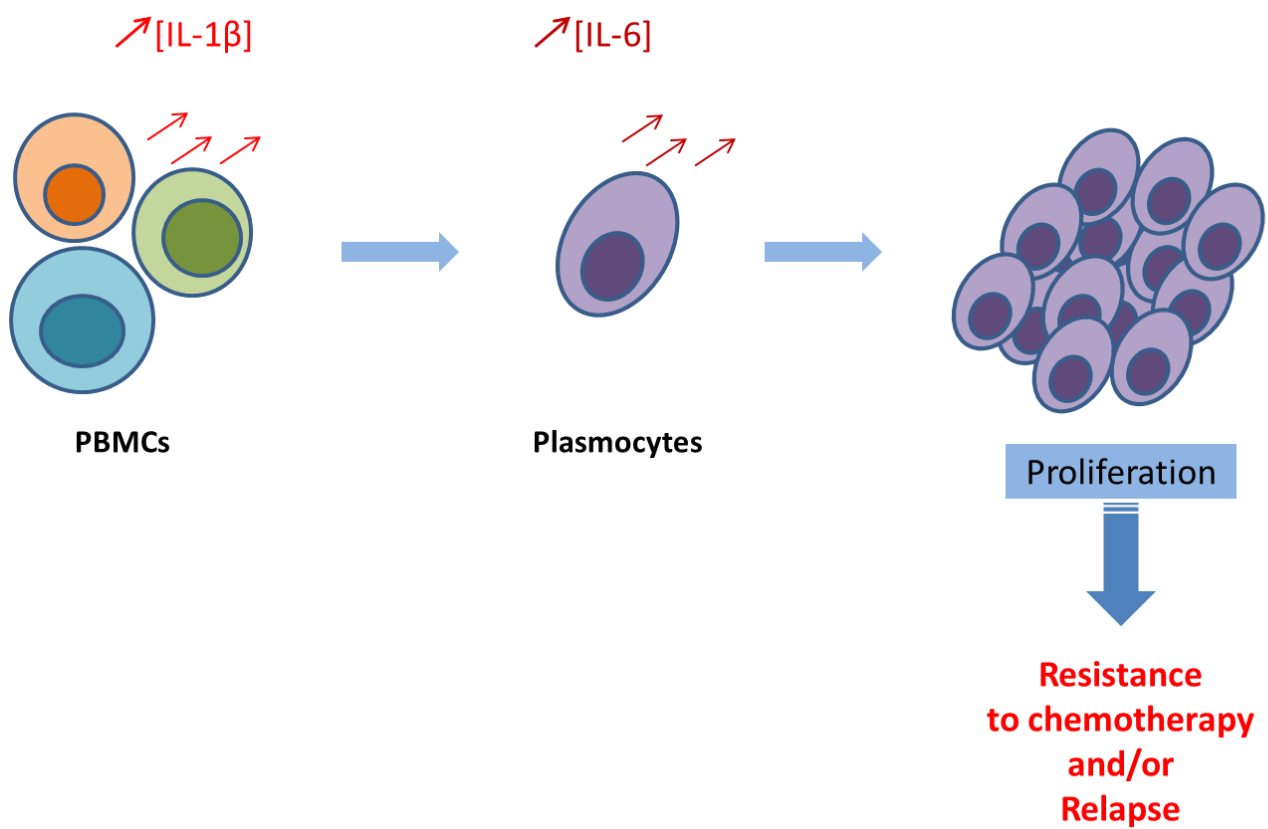


Figure 5 : Involvement of IL-1 β and IL-6 in the resistance to chemotherapy and patients early relapse

The secretion of IL-1 β by PBMCs induces the expression of IL-6 by plasma cells which help to their proliferation. Leading to chemotherapy resistance and early relapse in autologous stem cells transplantation recipients.

Bibliography

1. Hunsucker SA, Magarotto V, Kuhn DJ, Kornblau SM, Wang M, Weber DM, et al. Blockade of interleukin-6 signalling with siltuximab enhances melphalan cytotoxicity in preclinical models of multiple myeloma. *British journal of haematology*. 2011;152(5):579-92. Epub 2011/01/19.
2. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(8):585-98. Epub 2007/07/25.
3. Spanswick VJ, Craddock C, Sekhar M, Mahendra P, Shankaranarayana P, Hughes RG, et al. Repair of DNA interstrand crosslinks as a mechanism of clinical resistance to melphalan in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100(1):224-9. Epub 2002/06/19.
4. Sunters A, Springer CJ, Bagshawe KD, Souhami RL, Hartley JA. The cytotoxicity, DNA crosslinking ability and DNA sequence selectivity of the aniline mustards melphalan, chlorambucil and 4-[bis (2-chloroethyl) amino] benzoic acid. *Biochemical pharmacology*. 1992;44(1):59-64.
5. Hulin C, Facon T, Rodon P, Pegourie B, Benboubker L, Doyen C, et al. Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3664-70. Epub 2009/05/20.
6. Merchionne F, Perosa F, Dammacco F. New therapies in multiple myeloma. *Clinical and experimental medicine*. 2007;7(3):83-97. Epub 2007/11/01.
7. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer*. 2007;110(9):1911-28.
8. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1-21.
9. Ishikawa H, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Kawano MM. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2000;39(1-2):51-5. Epub 2000/09/07.
10. Rosean TR, Tompkins VS, Tricot G, Holman CJ, Olivier AK, Zhan F, et al. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Immunologic research*. 2014;59(1-3):188-202. Epub 2014/05/23.
11. San-Miguel J, Blade J, Shpilberg O, Grosicki S, Maloisel F, Min CK, et al. Phase 2 randomized study of bortezomib-melphalan-prednisone with or without siltuximab (anti-IL-6) in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(26):4136-42. Epub 2014/05/17.
12. Voorhees PM, Chen Q, Kuhn DJ, Small GW, Hunsucker SA, Strader JS, et al. Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(21):6469-78. Epub 2007/11/03.
13. Voorhees PM, Chen Q, Small GW, Kuhn DJ, Hunsucker SA, Nemeth JA, et al. Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death. *British journal of haematology*. 2009;145(4):481-90. Epub 2009/04/07.

Chapitre 4 :

Etude transcriptomique des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection par HIV

Etude transcriptomique des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection par HIV

Introduction et justificatif du travail

Dans les ganglions lymphatiques des patients atteints de lymphome, les cellules B reçoivent des signaux tels que IL-6, l'IL-10 et le TNF- α , qui induisent l'activation et la prolifération des cellules B. Cette prolifération augmente les erreurs de réparation de l'ADN, et associée à la dérégulation des gènes suppresseurs de tumeurs (tels que p53) ou encore l'activation de proto-oncogènes (tels que BCL-6 ou Ras) amène à favoriser le développement tumoral.

Le lymphome B diffus à grandes cellules (LDGC) représente 30 à 40 % des lymphomes, celui-ci est traité par une combinaison de drogues. L'index de pronostique international (IPI) est utilisé pour classer et traiter les patients. L'IPI est calculé sur la base de paramètres cliniques, tels que : l'âge, le taux et de LDH. Sur cette base, 4 groupes pronostiques sont définis : bas risque avec 0-1 point, risque intermédiaire bas avec 2 points, risque intermédiaire haut avec 3 points et haut risque avec 4-5 points, ce dernier à un taux de survie à 5 ans de 26 % (Table 4).

Groupes	Bas risque	Risque intermédiaire bas	Risque intermédiaire haut	Haut risque
Survie à 5 ans	73 %	51 %	43 %	26 %
Nombre de points	0 - 1	2	3	4 - 5

Table 4 : Identification des groupes de patients atteints de lymphome B diffus à grandes cellules selon l'index de pronostique international IPI

L'hétérogénéité clinique peut être expliquée par l'hétérogénéité moléculaire de la tumeur, par conséquent, les critères cliniques ne suffisent plus pour traiter les patients. Pour tester cette hypothèse, en 2000, l'équipe d'Alizadeh et coll. (95) utilise les microarrays pour analyser une série de biopsies de patients atteints de lymphomes B diffus à grandes cellules. Les résultats de ce travail ont permis de proposer la distinction de deux sous-types différents au sein des LDGC. Les sous-types GC (pour germinal cell) avec la surexpression de CD10, CD 38, aMyB, OGG1, BCL-6, BCL-7a et LMO2 ainsi que le groupe ABC (pour activated B cell) avec la surexpression de IRF4, FLIP et BCL-2 ; ont été identifiés. L'intérêt majeur de cette étude est que ce profil correspond à des groupes pronostiques différents (Figure 23).

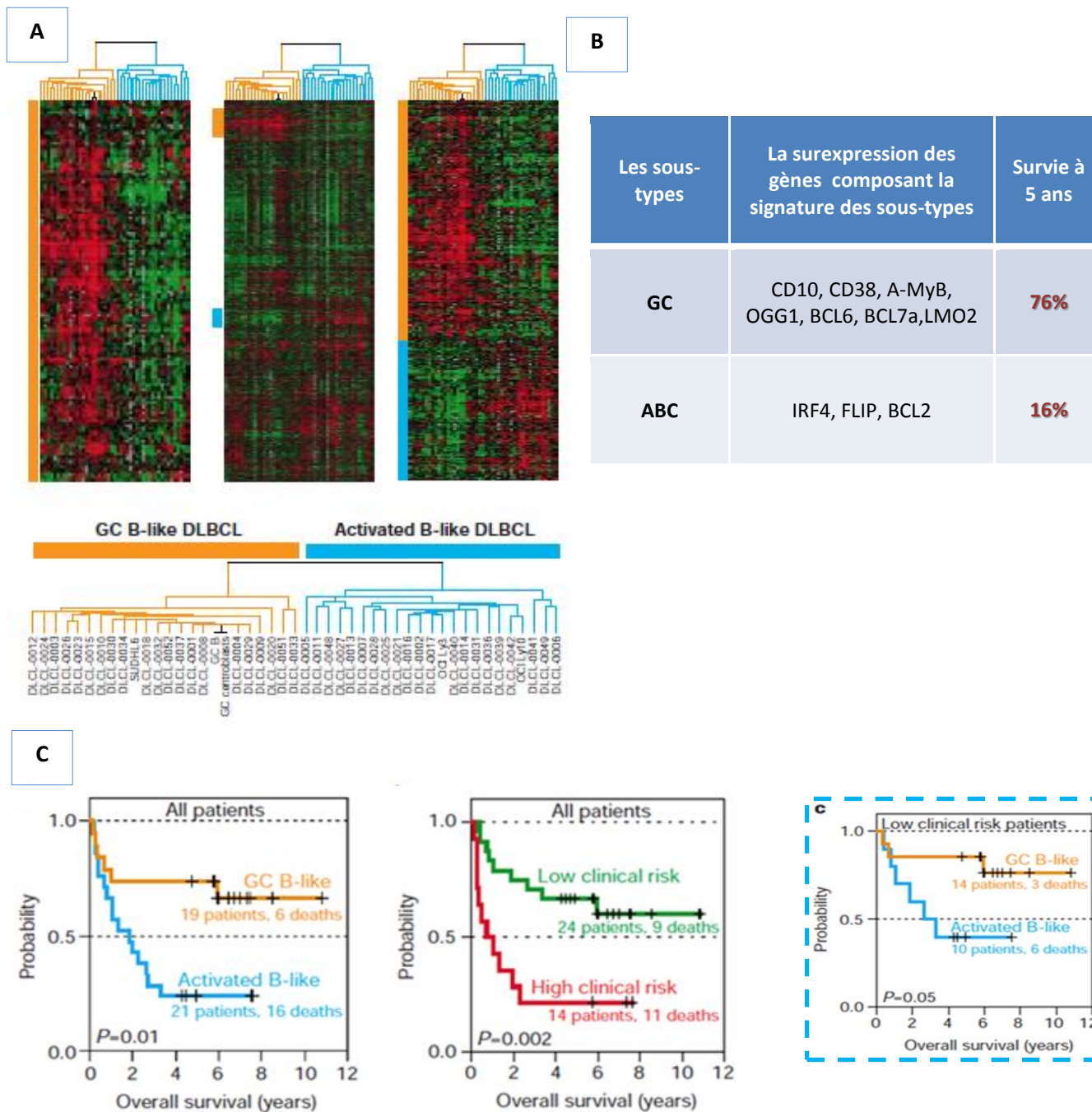


Figure 23 : Caractéristiques et profils d'expression des sous-types GC et ABC
 23-A : représente le profil d'expression des sous-types ABC et GC du LDGC
 23-B : représente des gènes surexprimés dans les deux sous-types identifiés
 23-C : représente les courbes de survie Kaplan-Meier des sous-types GC et ABC

Le panel sépare des patients en fonction du sous-groupe GC vs ABC. La médiane de survie globale se situe à 2 ans pour le groupe ABC, et elle n'est pas atteinte pour le groupe GC (Figure 25-C). Une étude postérieure

dirigée par Rowenwald et coll. en 2002 (96) retrouve les sous-types GC et ABC, mais aussi un 3^e groupe qu'il qualifie du « type 3 ». Cette étude retrouve les différences de survie précédentes, avec une différence nette entre le groupe ABC et le « type 3 » *versus* GC. Ils ont affiné des aspects prédictifs, en montrant notamment l'impact négatif de l'expression d'un groupe de gènes d'activation du lymphocyte B sur la survie. L'analyse à haut débit est devenue un outil central tant dans la classification que dans la physiopathologie des lymphomes (263).

Les lymphomes non hodgkiniens chez les patients infectés par le VIH comportent des formes anatomopathologiques particulières (lymphomes de séreuses, maladies de *Castleman* multicentrique), à côté de formes histologiques retrouvées chez les patients non-immunodéprimés, notamment les lymphomes de Burkitt et les lymphomes B diffus à grandes cellules. Les traitements des LNH associés au VIH sont calqués sur ceux des patients non immunodéprimés. En revanche, la pathophysiologie des lymphomes liés à l'infection au VIH n'est pas la même que celle des lymphomes immunocompétents. En présence du VIH, il existe un microenvironnement spécial dans le ganglion lymphatique, qui induit notamment l'activation et la prolifération des cellules B en absence de la réponse immunitaire. La prolifération augmente la dérégulation des gènes tels que p53 et l'activation des proto-oncogènes tels que c-myc et BCL-6 en plus de l'absence de l'immunosurveillance.

Il n'existe pas à notre connaissance de données transcriptomiques concernant les LNH liés à l'infection au VIH, mais seulement des études partielles sur un nombre limité de gènes et/ou des études en immunohistochimie, technique dont on connaît les discordances concernant la discrimination GC versus non-GC en comparaison avec la technique moléculaire de référence. L'objectif de notre étude est donc d'analyser le profil d'expression génique des LNH du type DGC afin de vérifier l'existence éventuelle des sous-groupes décrits chez les patients immunocompétents et/ou de définir de nouveaux profils géniques spécifiques des LNH liés à l'infection par le VIH. Notre objectif est aussi de définir la pathophysiologie des différents sous-types et de mettre en évidence les voies moléculaires dérégulées qui peuvent avoir une valeur pronostique.

Matériels et méthodes

Échantillons biologiques

La tumorothèque de l'ANRS (Agence nationale de recherches sur le sida et les hépatites virales) nous a donné accès à 7 échantillons conservés en paraffine mais aussi des données cliniques et biologiques (cohorte ANRS CO16 Lympho-VIR). Cinq autres échantillons nous ont été fournis par le Pr Lépidi (CHU de la Timone Marseille). Nous avons utilisé deux réplicats techniques par échantillon biologique.

Extraction des ARN, quantification et contrôle qualité

Le kit RNeasy FFPE de Qiagen a été utilisé, ce protocole est idéal pour la purification de l'ARN total à partir de microdissection d'organe fixé inclus en paraffine. Ce protocole inclut une étape de déparaffinisation et réhydratation du tissu, une étape de lyse avec la protéinase K, suivie d'une étape de traitement à la chaleur. L'ARN a été ensuite extrait sur colonne avec un traitement à la DNase, des lavages successifs et une élution avec de l'eau RNase free. Il faut noter que, malgré les difficultés de conservation des ARN en paraffine, des résultats reproductibles et cliniquement significatifs ont pu être obtenus sur de tels prélèvements (264).

La quantification et le contrôle de qualité des ARN ont été réalisés en utilisant le NanoDrop et le Bioanalyzer d'Agilent.

Étude transcriptomique

Pour l'analyse transcriptomique, la puce SurePrint G3 Human GE 8x60K v2 d'Agilent est utilisée. Cette dernière offre une grande couverture des gènes et des transcrits, avec une grande sensibilité. La puce comporte huit zones d'hybridation (arrays), dont chacun comporte 62 976 sondes. Plusieurs sondes du même transcrit sont synthétisés sur la puce qui ciblent différents endroits du gène, celles-ci ont une taille de 60 nucléotides.

Le protocole « Gene Expression FFPE Workflow » d'Agilent a été utilisé pour le marquage et l'hybridation des échantillons. Le protocole comporte une étape de réparation, amplification, de purification et de marquage de la librairie, suivi d'une étape de purification des ADN complémentaires marqués et l'hybridation sur les puces pangénomiques.

Analyses statistiques

Un clustering hiérarchique non supervisé a été réalisé sur les données normalisées (normalisation par les quantiles) afin de définir les groupes qui peuvent séparer les échantillons selon leur profil d'expression génique. Une analyse SAM est ensuite réalisée en tenant en compte des groupes retrouvés après clustering hiérarchique. 10 000 permutations, et un FDR de 1 % sont utilisés.

Résultats préliminaires

Après clustering hiérarchiques des données normalisées des 24 échantillons (2 réplicats par échantillons), deux groupes ont été mis en évidence selon leur profil d'expression génique. Sur cette base, une analyse SAM a été réalisée sur les données normalisées en utilisant la corrélation de *Pearson* et 10 000 permutations, le FDR a été fixé à 1 %. Les deux groupes du clustering hiérarchique non supervisé ont été

retrouvés, les deux groupes sont hétérogènes et se composent tous deux de profil GC et non-GC (selon la classification classique des lymphomes). 6944 gènes différentiellement exprimés ont été retrouvés entre les deux groupes d'échantillons (figure 24).

Nous ne pouvons pas encore discuter les résultats qui sont encore préliminaires, des analyses statistiques plus poussées vont être réalisées, ainsi que des analyses d'annotation fonctionnelles afin de mettre en évidence les sous-types potentiels des lymphomes B diffus à grandes cellules, mais aussi identifier les voies dérégulées dans chaque sous-type. Les résultats de cette étude seront validés dans une cohorte indépendante, cohorte dont les échantillons ont été récupérés du CHU de Nice (Service du Pr Michiels) et de l'ANRS.

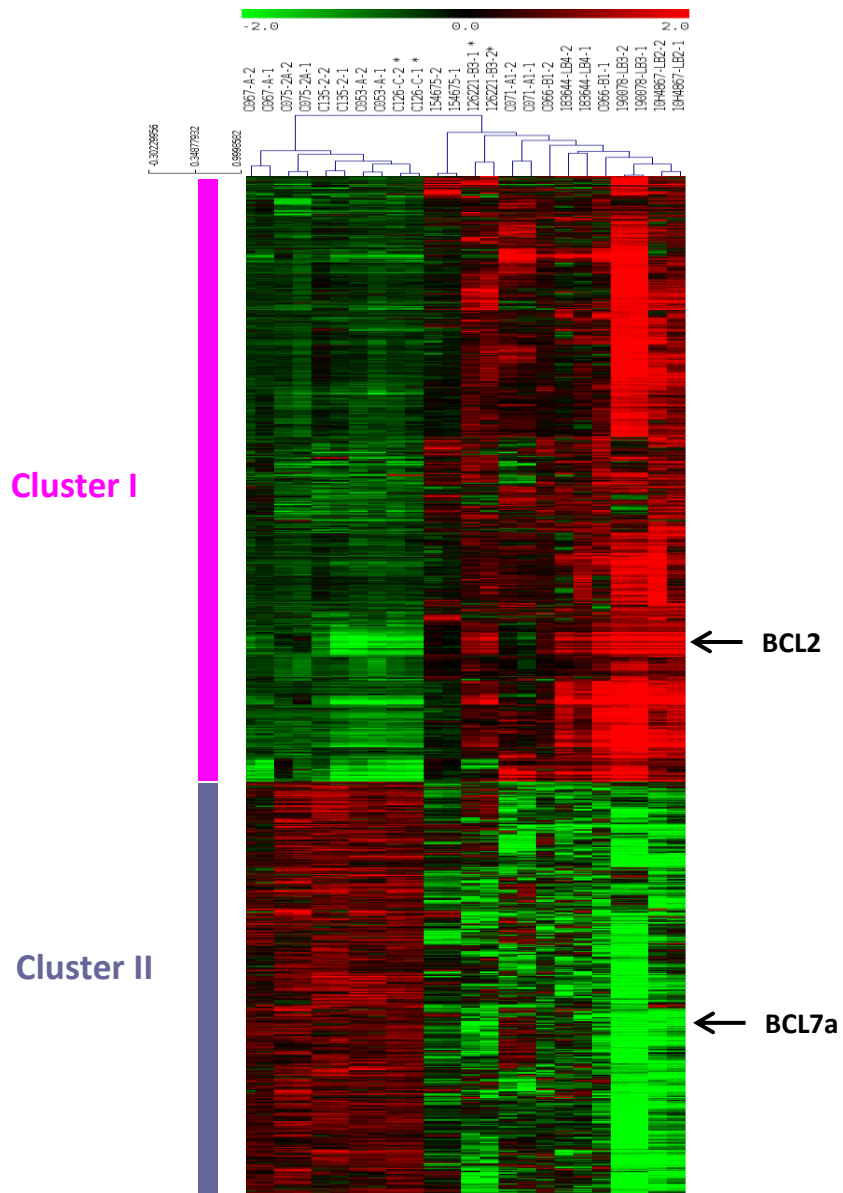


Figure 24 : Profil d'expression des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection au VIH

Les gènes sous exprimés sont représentés en vert, les gènes surexprimés sont en rouge. Sur l'axe des abscisses ; les échantillons séparés sur deux groupes. Sur l'axe des ordonnées ; les sondes qui représentent les gènes différemment exprimés, ces dernières sont séparées en deux clusters ; Cluster I et Cluster II

Conclusion générale

La génomique fonctionnelle vise principalement à définir la fonction des gènes en étudiant notamment les produits de ces derniers : les ARN et les protéines, mais aussi d'étudier leur mode d'expression, de régulation ainsi que leurs interactions. Désormais, les méthodes expérimentales à haut débit ont rendu possible l'analyse simultanée de l'ensemble du génome humain. La génomique impliquant l'expression des gènes à grande échelle a rapidement trouvé des applications en clinique afin de tendre vers une médecine personnalisée et prédictive (265).

Durant ma thèse, je me suis intéressée à l'apport de l'approche transcriptomique dans la compréhension de différents problèmes de l'oncohématologie notamment : au décès lié aux infections, à l'absence d'obtention de la rémission, ainsi qu'au décès lié aux rechutes

- **Le décès lié aux infections**

Une grande partie de mon travail a été de définir une signature transcriptomique prédictive de la survenue d'un sepsis et/ou de SIRS dans le cadre des autogreffes de cellules souches hématopoïétiques. Onze gènes (CHAT, CNN3, ANKRD42, LOC100505717, EDAR, GPAT2, ENST00000390421, MTRM8, C6orf192 et LOC10289230 et XLOC-005643) ont été identifiés comme étant différemment exprimés chez les patients qui développeront un sepsis et/ou de SIRS au minimum dans les 48 heures suivant la chimiothérapie de conditionnement. Cette signature transcriptomique prédictive ouvre les portes à de nouvelles stratégies thérapeutiques basées sur la prophylaxie antibiotique et/ou antifongique adaptée au profil de risque spécifique de chaque patient à développer ou pas un sepsis.

D'autre part, j'ai participé à une étude clinique visant à étudier l'efficacité de la micafungine comme prophylaxie antifongique chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (**Publication annexe**)

- **L'absence d'obtention de la rémission**

Je me suis intéressée à la physiopathologie des lymphomes non hodgkiniens liés à l'infection par le VIH, en analysant le profil d'expression génique des lymphomes B à grandes cellules afin de vérifier l'existence éventuelle des sous-groupes décrits chez les patients immunocompétents et/ou de définir de nouveaux profils géniques spécifiques des LNH liés à l'infection par le VIH. Cette étude est en cours de réalisation, les résultats préliminaires seront confirmés dans une cohorte de réplication indépendante.

- **Le décès lié aux rechutes**

Dans cette partie, je me suis intéressée à la chimiothérapie de conditionnement : le melphalan. Cette étude nous a permis dans un premier temps ; d'identifier les voies moléculaires et biologiques affectées après le

conditionnement chimiothérapeutique dans les cellules mononuclées du sang périphérique, ainsi que d'identifier l'IL-1 β comme étant un potentiel marqueur de la rechute précoce des patients atteints de myélome traités par autogreffes de cellules souches hématopoïétiques.

La défaillance du système immunitaire inné est liée à la rechute des patients dans différentes pathologies et notamment la leucémie aiguë myéloïde. Nous avons comparé la signature transcriptomique des cellules NK de patients atteints de LAM à celle de donneurs sains. De plus, nous avons identifié le facteur de transcription ETS-1 comme étant un candidat potentiel capable à réguler l'expression des trois NCR.

La majorité des patients atteints de LAM sont en rémission complète après une chimiothérapie standard. Cependant, la majorité des patients rechutent et décèdent de la maladie. La population de cellules souches leucémiques est enrichie en cellules CD 34⁺, CD 38⁻, celles-ci sont résistantes à la chimiothérapie conventionnelle. Dans cette partie, nous nous sommes intéressés à l'effet du DIMATE inhibiteur des aldéhydes déshydrogénases sur les cellules leucémiques (**Annexe**).

Bibliographie

1. Savagner F. Classification moléculaire des tumeurs thyroïdiennes: intérêts et limites de l'approche transcriptomique. *Correspondances en MHDN*. 2010;14(7):216-9.
2. Campo E. Whole genome profiling and other high throughput technologies in lymphoid neoplasms—current contributions and future hopes. *Modern Pathology*. 2013;26:S97-S110.
3. Russo G, Zegar C, Giordano A. Advantages and limitations of microarray technology in human cancer. *Oncogene*. 2003;22(42):6497-507.
4. Dong Z, Chen Y. Transcriptomics: advances and approaches. *Science China Life sciences*. 2013;56(10):960-7. Epub 2013/10/05.
5. Willingham AT, Gingeras TR. TUF love for “junk” DNA. *Cell*. 2006;125(7):1215-20.
6. Jacquier A. The complex eukaryotic transcriptome: unexpected pervasive transcription and novel small RNAs. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(12):833-44.
7. Crick FH. On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*. 1958;12:138-63. Epub 1958/01/01.
8. Kohler R. *The Eighth Day of Creation: Makers of the Revolution in Biology* by Horace Freeland Judson. 1997.
9. Jacob F, Monod J. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology*. 1961;3(3):318-56.
10. Crick FH. The origin of the genetic code. *Journal of molecular biology*. 1968;38(3):367-79.
11. Hoagland MB, Stephenson ML, Scott JF, Hecht LI, Zamecnik PC. A soluble ribonucleic acid intermediate in protein synthesis. *The Journal of biological chemistry*. 1958;231(1):241-57.
12. Gesteland R, Atkins J. *The {RNA} World*. 1993.
13. Berget SM, Moore C, Sharp PA. Spliced segments at the 5'terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(8):3171-5.
14. Chow LT, Gelinis RE, Broker TR, Roberts RJ. An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell*. 1977;12(1):1-8.
15. Stark BC, Kole R, Bowman EJ, Altman S. Ribonuclease P: an enzyme with an essential RNA component. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1978;75(8):3717-21.
16. Kruger K, Grabowski PJ, Zaug AJ, Sands J, Gottschling DE, Cech TR. Self-splicing RNA: autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of *Tetrahymena*. *Cell*. 1982;31(1):147-57.
17. Ecker JR, Davis RW. Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1986;83(15):5372-6.
18. Romano N, Macino G. Quelling: transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences. *Molecular microbiology*. 1992;6(22):3343-53.
19. Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998;391(6669):806-11.
20. Montgomery MK, Xu S, Fire A. RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1998;95(26):15502-7.
21. Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature*. 2001;411(6836):494-8.

22. Zamore PD, Tuschl T, Sharp PA, Bartel DP. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*. 2000;101(1):25-33.
23. Mardis ER. Next-generation DNA sequencing methods. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2008;9:387-402.
24. Wang Z, Gerstein M, Snyder M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*. 2009;10(1):57-63.
25. Wreschner DH, Herzberg M. A new blotting medium for the simple isolation and identification of highly resolved messenger RNA. *Nucleic acids research*. 1984;12(3):1349-60.
26. Cantor CR. Orchestrating the human genome project. *Science*. 1990;248(4951):49-51.
27. Watson JD, Cook-Deegan RM. The human genome project and international health. *Jama*. 1990;263(24):3322-4.
28. Adams MD, Kelley JM, Gocayne JD, Dubnick M, Polymeropoulos MH, Xiao H, et al. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science*. 1991;252(5013):1651-6.
29. Nagle JW. Sequence identification of 2,375 human brain genes. *Nature*. 1992;355:13.
30. Tanaka T, Ogiwara A, Uchiyama I, Takagi T, Yazaki Y, Nakamura Y. Construction of a normalized directionally cloned cDNA library from adult heart and analysis of 3040 clones by partial sequencing. *Genomics*. 1996;35(1):231-5.
31. Jordan BR. Large-scale expression measurement by hybridization methods: from high-density membranes to "DNA chips". *Journal of biochemistry*. 1998;124(2):251-8.
32. Granjeaud S, Nguyen C, Rocha D, Luton R, Jordan BR. From hybridization image to numerical values: a practical, high throughput quantification system for high density filter hybridizations. *Genetic Analysis: Biomolecular Engineering*. 1996;12(3):151-62.
33. Granjeaud S, Bertucci F, Jordan BR. Expression profiling: DNA arrays in many guises. *Bioessays*. 1999;21(9):781-90.
34. Gress TM, Hoheisel JD, Lennon GG, Zehetner G, Lehrach H. Hybridization fingerprinting of high-density cDNA-library arrays with cDNA pools derived from whole tissues. *Mammalian Genome*. 1992;3(11):609-19.
35. Nguyen C, Rocha D, Granjeaud S, Baldit M, Bernard K, Naquet P, et al. Differential gene expression in the murine thymus assayed by quantitative hybridization of arrayed cDNA clones. *Genomics*. 1995;29(1):207-16.
36. Zhao N, Hashida H, Takahashi N, Misumi Y, Sakaki Y. High-density cDNA filter analysis: a novel approach for large-scale, quantitative analysis of gene expression. *Gene*. 1995;156(2):207-13.
37. Chen JJ, Wu R, Yang P-C, Huang J-Y, Sher Y-P, Han M-H, et al. Profiling expression patterns and isolating differentially expressed genes by cDNA microarray system with colorimetry detection. *Genomics*. 1998;51(3):313-24.
38. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang Y-C, Granjeaud S, Birnbaum D, et al. Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Human molecular genetics*. 1999;8(9):1715-22.
39. Lockhart DJ, Dong H, Byrne MC, Follettie MT, Gallo MV, Chee MS, et al. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays. *Nature biotechnology*. 1996;14(13):1675-80.
40. Gershon D. Microarray technology: an array of opportunities. *Nature*. 2002;416(6883):885-91.

41. Brenner S, Johnson M, Bridgham J, Golda G, Lloyd DH, Johnson D, et al. Gene expression analysis by massively parallel signature sequencing (MPSS) on microbead arrays. *Nature biotechnology*. 2000;18(6):630-4.
42. Nagalakshmi U, Wang Z, Waern K, Shou C, Raha D, Gerstein M, et al. The transcriptional landscape of the yeast genome defined by RNA sequencing. *Science*. 2008;320(5881):1344-9.
43. Dafforn A, Chen P, Deng G, Herrler M, Iglehart D, Koritala S, et al. Linear mRNA amplification from as little as 5 ng total RNA for global gene expression analysis. *BioTechniques*. 2004;37(5):854-7.
44. Ozsolak F, Platt AR, Jones DR, Reifemberger JG, Sass LE, McInerney P, et al. Direct RNA sequencing. *Nature*. 2009;461(7265):814-8.
45. Eddy SR. Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews Genetics*. 2001;2(12):919-29.
46. Kim VN. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2005;6(5):376-85.
47. Krol J, Loedige I, Filipowicz W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nature Reviews Genetics*. 2010;11(9):597-610.
48. Brodersen P, Voinnet O. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2009;10(2):141-8.
49. Lippman Z, Martienssen R. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature*. 2004;431(7006):364-70.
50. Saxe JP, Lin H. Small noncoding RNAs in the germline. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2011;3(9):a002717.
51. Zhang H, Chen Z, Wang X, Huang Z, He Z, Chen Y. Long non-coding RNA: a new player in cancer. *Journal of hematology & oncology*. 2013;6(1):1-7.
52. Lashkari DA, DeRisi JL, McCusker JH, Namath AF, Gentile C, Hwang SY, et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1997;94(24):13057-62.
53. Pesole G. What is a gene? An updated operational definition. *Gene*. 2008;417(1):1-4.
54. Krebs JE, Goldstein ES, Kilpatrick ST. *Lewin's genes X*: Jones & Bartlett Publishers; 2009.
55. Ozsolak F, Milos PM. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews Genetics*. 2011;12(2):87-98.
56. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995;270(5235):467-70.
57. Forster T, Costa Y, Roy D, Cooke HJ, Maratou K. Triple-target microarray experiments: a novel experimental strategy. *BMC genomics*. 2004;5(1):1.
58. Altman NS, Hua J. Extending the loop design for two-channel microarray experiments. *Genetical research*. 2006;88(03):153-63.
59. Pascual V, Chaussabel D, Banchereau J. A genomic approach to human autoimmune diseases. *Annual review of immunology*. 2010;28:535-71. Epub 2010/03/03.
60. Knapen D, Vergauwen L, Laukens K, Blust R. Best practices for hybridization design in two-colour microarray analysis. *Trends in biotechnology*. 2009;27(7):406-14.
61. King HC, Sinha AA. Gene expression profile analysis by DNA microarrays: promise and pitfalls. *Jama*. 2001;286(18):2280-8.
62. Patterson TA, Lobenhofer EK, Fulmer-Smentek SB, Collins PJ, Chu T-M, Bao W, et al. Performance comparison of one-color and two-color platforms within the MicroArray Quality Control (MAQC) project. *Nature biotechnology*. 2006;24(9):1140-50.

63. Peixoto BR, Vêncio RZ, Egidio CM, Mota-Vieira L, Verjovski-Almeida S, Reis EM. Evaluation of reference-based two-color methods for measurement of gene expression ratios using spotted cDNA microarrays. *BMC genomics*. 2006;7(1):1.
64. Bolstad BM, Irizarry RA, Åstrand M, Speed TP. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*. 2003;19(2):185-93.
65. Quackenbush J. Microarray data normalization and transformation. *Nature genetics*. 2002;32:496-501.
66. Fujita A, Sato JR, de Oliveira Rodrigues L, Ferreira CE, Sogayar MC. Evaluating different methods of microarray data normalization. *BMC bioinformatics*. 2006;7(1):1.
67. Irizarry RA, Hobbs B, Collin F, Beazer-Barclay YD, Antonellis KJ, Scherf U, et al. Exploration, normalization, and summaries of high density oligonucleotide array probe level data. *Biostatistics*. 2003;4(2):249-64.
68. Suárez E, Burguete A, McLachlan GJ. Microarray data analysis for differential expression: a tutorial. *Puerto Rico health sciences journal*. 2009;28(2).
69. Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(9):5116-21.
70. Smyth GK. *Limma: linear models for microarray data*. *Bioinformatics and computational biology solutions using R and Bioconductor*: Springer; 2005. p. 397-420.
71. Kerr MK, Martin M, Churchill GA. Analysis of variance for gene expression microarray data. *Journal of computational biology*. 2000;7(6):819-37.
72. Parmigiani G, Garrett ES, Irizarry RA, Zeger SL. The analysis of gene expression data: an overview of methods and software. *The analysis of gene expression data*: Springer; 2003. p. 1-45.
73. Reid RW, Fodor AA. Determining gene expression on a single pair of microarrays. *BMC bioinformatics*. 2008;9(1):1.
74. Zabell SL. On Student's 1908 Article "The Probable Error of a Mean". *Journal of the American Statistical Association*. 2008;103(481):1-7.
75. Walker MS, Hughes TA. Messenger RNA expression profiling using DNA microarray technology: Diagnostic tool, scientific analysis or un-interpretable data?(Review). *International journal of molecular medicine*. 2008;21(1):13.
76. Slonim DK. From patterns to pathways: gene expression data analysis comes of age. *Nature genetics*. 2002;32:502-8.
77. Shields R. MIAME, we have a problem. *Trends in Genetics*. 2006;22(2):65-6.
78. Kuo WP, Jenssen T-K, Butte AJ, Ohno-Machado L, Kohane IS. Analysis of matched mRNA measurements from two different microarray technologies. *Bioinformatics*. 2002;18(3):405-12.
79. Irizarry RA, Warren D, Spencer F, Kim IF, Biswal S, Frank BC, et al. Multiple-laboratory comparison of microarray platforms. *Nature methods*. 2005;2(5):345-50.
80. Bammler T, Beyer RP, Bhattacharya S, Boorman GA, Boyles A, Bradford BU, et al. Addendum: Standardizing global gene expression analysis between laboratories and across platforms. *Nature methods*. 2005;2(6):477-.
81. Draghici S, Khatri P, Eklund AC, Szallasi Z. Reliability and reproducibility issues in DNA microarray measurements. *Trends in Genetics*. 2006;22(2):101-9.
82. Chuaqui RF, Bonner RF, Best CJ, Gillespie JW, Flaig MJ, Hewitt SM, et al. Post-analysis follow-up and validation of microarray experiments. *Nature genetics*. 2002;32:509-14.
83. Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, et al. Minimum information about a microarray experiment (MIAME)—toward standards for microarray data. *Nature genetics*. 2001;29(4):365-71.

84. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531-7.
85. Shivarov V, Bullinger L. Expression profiling of leukemia patients: key lessons and future directions. *Experimental hematology*. 2014;42(8):651-60.
86. Bacher U, Kohlmann A, Haferlach T. Perspectives of gene expression profiling for diagnosis and therapy in haematological malignancies. *Briefings in functional genomics & proteomics*. 2009;8(3):184-93.
87. Schoch C, Kern W, Kohlmann A, Hiddemann W, Schnittger S, Haferlach T. Acute myeloid leukemia with a complex aberrant karyotype is a distinct biological entity characterized by genomic imbalances and a specific gene expression profile. *Genes, Chromosomes and Cancer*. 2005;43(3):227-38.
88. Bullinger L, Döhner K, Bair E, Fröhling S, Schlenk RF, Tibshirani R, et al. Use of gene-expression profiling to identify prognostic subclasses in adult acute myeloid leukemia. *New England Journal of Medicine*. 2004;350(16):1605-16.
89. Radmacher MD, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Whitman SP, Vardiman JW, et al. Independent confirmation of a prognostic gene-expression signature in adult acute myeloid leukemia with a normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2006;108(5):1677-83.
90. Willman CL. Has gene expression profiling improved diagnosis, classification, and outcome prediction in AML? *Best practice & research Clinical haematology*. 2008;21(1):21-8.
91. Raponi M, Lancet JE, Fan H, Dossey L, Lee G, Gojo I, et al. A 2-gene classifier for predicting response to the farnesyltransferase inhibitor tipifarnib in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2589-96.
92. Stapnes C, Rynningen A, Hatfield K, Oyan AM, Eide GE, Corbascio M, et al. Functional characteristics and gene expression profiles of primary acute myeloid leukaemia cells identify patient subgroups that differ in susceptibility to histone deacetylase inhibitors. *International journal of oncology*. 2007;31(6):1529-38.
93. Hofmann W-K, de Vos S, Elashoff D, Gschaidmeier H, Hoelzer D, Koeffler HP, et al. Relation between resistance of Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia to the tyrosine kinase inhibitor STI571 and gene-expression profiles: a gene-expression study. *The Lancet*. 2002;359(9305):481-6.
94. Holleman A, Cheek MH, den Boer ML, Yang W, Veerman AJ, Kazemier KM, et al. Gene-expression patterns in drug-resistant acute lymphoblastic leukemia cells and response to treatment. *New England Journal of Medicine*. 2004;351(6):533-42.
95. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, Ma C, Lossos IS, Rosenwald A, et al. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*. 2000;403(6769):503-11.
96. Rosenwald A, Wright G, Chan WC, Connors JM, Campo E, Fisher RI, et al. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 2002;346(25):1937-47.
97. Coller HA, Grandori C, Tamayo P, Colbert T, Lander ES, Eisenman RN, et al. Expression analysis with oligonucleotide microarrays reveals that MYC regulates genes involved in growth, cell cycle, signaling, and adhesion. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(7):3260-5.
98. Ebert BL, Golub TR. Genomic approaches to hematologic malignancies. *Blood*. 2004;104(4):923-32.

99. Shaffer A, Yu X, He Y, Boldrick J, Chan EP, Staudt LM. BCL-6 represses genes that function in lymphocyte differentiation, inflammation, and cell cycle control. *Immunity*. 2000;13(2):199-212.
100. Shaffer A, Lin K-I, Kuo TC, Yu X, Hurt EM, Rosenwald A, et al. Blimp-1 orchestrates plasma cell differentiation by extinguishing the mature B cell gene expression program. *Immunity*. 2002;17(1):51-62.
101. 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. *Journal of Clinical Oncology*. 2003;21(24):4642-9.
102. Jemal A, Clegg LX, Ward E, Ries LA, 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(1):3-27.
103. 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(3):453-74.
104. Lavigne P, Acres S. Advisory Committee on Epidemiology. Resolutions. *Canada diseases weekly report= Rapport hebdomadaire des maladies au Canada*. 1989;15(25):127-9.
105. Jiang Y, Barrett A, Goldman J, Mavroudis D. 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*. 1997;74(1):1-6.
106. Asai O, Longo DL, Tian Z-G, 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. *Journal of Clinical Investigation*. 1998;101(9):1835.
107. Elkins WL, Pickard A, Pierson GR. Deficient expression of class-I HLA in some cases of acute leukemia. *Cancer Immunology, Immunotherapy*. 1984;18(2):91-100.
108. Urlacher A, Falkenrodt A, Tongio M, Mayer S. HLA class I antigens on normal and leukemic cells (quantitative analysis). *Tissue antigens*. 1987;29(5):237-45.
109. 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(10):3661-7.
110. 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(2):151-7.
111. Fauriat C, Just-Landi S, Mallet F, Arnoulet C, Sainty 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(1):323-30.
112. Kiladjian J, Bourgeois E, Lobe I, Braun T, Visentin G, Bourhis J, et al. Cytolytic function and survival of natural killer cells are severely altered in myelodysplastic syndromes. *Leukemia*. 2006;20(3):463-70.
113. Costello RT, Boehrer A, Sanchez C, Mercier D, Baier C, 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(3):338-41.
114. 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(40):42569.

115. 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(1):e1041701.
116. Thorén FB, Romero AI, Brune M, Hellstrand K. Histamine dihydrochloride and low-dose interleukin-2 as post-consolidation immunotherapy in acute myeloid leukemia. *Expert opinion on biological therapy*. 2009;9(9):1217-23.
117. 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. *European journal of haematology*. 1996;57(4):312-9.
118. 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(6):921-32.
119. Barton K, Muthusamy N, Fischer C, Ting C-N, 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(4):555-63.
120. 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(4):437-49.
121. 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 V α 14i NKT cells. *Immunity*. 2004;20(4):477-94.
122. Glimcher LH, Townsend MJ, Sullivan BM, Lord GM. Recent developments in the transcriptional regulation of cytolytic effector cells. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(11):900-11.
123. Koizumi H, Horta MF, Youn BS, Fu KC, Kwon BS, Young J, 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. *Molecular and cellular biology*. 1993;13(11):6690-701.
124. MCFARLAND W, GRANVILLE NB, DAMESHEK W. Autologous bone marrow infusion as an adjunct in therapy of malignant disease. *Blood*. 1959;14(5):503-21.
125. Clifford P, Clift R, Duff J. Nitrogen-mustard therapy combined with autologous marrow infusion. *The Lancet*. 1961;277(7179):687-90.
126. Kurnick N. Autologous and Isologous Bone Marrow Storage and Infusion in the Treatment of Myelo-Suppression*. *Transfusion*. 1962;2(3):178-87.
127. Schmitz. Randomised trial of filgrastim-mobilised peripheral blood progenitor cell transplantation versus autologous bone-marrow transplantation in lymphoma patients (vol 347, pg 353, 1996). *LANCET LTD 42 BEDFORD SQUARE, LONDON, ENGLAND WC1B 3SL*; 1996. p. 914-.
128. Goldberg S, Mangan K, Klumpp TR, Macdonald J, Thomas C, Mullaney M, et al. Complications of peripheral blood stem cell harvesting: review of 554 PBSC leukaphereses. *Journal of hematotherapy*. 1995;4(2):85-90.
129. Fadilah S. Fundamentals in the management of multiple myeloma. *Med J Malaysia*. 2010;65(3):231-9.
130. Kyle RA. Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *British journal of haematology*. 2000;111(4):1035-44. Epub 2001/02/13.
131. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2004;351(18):1860-73. Epub 2004/10/29.

132. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(13):1362-9.
133. Colpo A, Hochberg E, Chen YB. Current status of autologous stem cell transplantation in relapsed and refractory Hodgkin's lymphoma. *The oncologist*. 2012;17(1):80-90. Epub 2012/01/03.
134. 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'Etude des Lymphomes de l'Adulte. *Blood*. 2013;121(1):48-53. Epub 2012/06/22.
135. 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. *Annals of hematology*. 2014;93(2):233-42. Epub 2014/02/25.
136. Al Khabori M, de Almeida JR, Guyatt GH, Kuruvilla J, Crump M. Autologous stem cell transplantation in follicular lymphoma: a systematic review and meta-analysis. *Journal of the National Cancer Institute*. 2012;104(1):18-28. Epub 2011/12/23.
137. 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. *Hematological oncology*. 2013;31(1):29-33. Epub 2012/04/11.
138. 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. *The Cochrane database of systematic reviews*. 2012;1:CD007678. Epub 2012/01/20.
139. Celebi H, Akan H, Akcaglayan E, Ustun C, Arat M. Febrile neutropenia in allogeneic and autologous peripheral blood stem cell transplantation and conventional chemotherapy for malignancies. *Bone marrow transplantation*. 2000;26(2):211-4. Epub 2000/08/05.
140. Pizzo P, Meyers J, Freifeld A, Walsh T. Infections in the cancer patient. *Cancer: principles and practice of oncology*. 1993;2:1963-98.
141. Kern WV, Cometta A, De Bock R, Langenaeken J, Paesmans M, Zanetti G, et al. Oral versus intravenous empirical antimicrobial therapy for fever in patients with granulocytopenia who are receiving cancer chemotherapy. *New England Journal of Medicine*. 1999;341(5):312-8.
142. Sohn B, Yoon D, Kim S, Lee K, Kang E, Park J, et al. The role of prophylactic antimicrobials during autologous stem cell transplantation: a single-center experience. *European journal of clinical microbiology & infectious diseases*. 2012;31(7):1653-61.
143. 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 Journal*. 2012;141(2):442-50.
144. Majhail N, Rizzo JD. Surviving the cure: long term followup of hematopoietic cell transplant recipients. *Bone marrow transplantation*. 2013;48(9):1145-51.
145. 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]. [Rinsho ketsueki] *The Japanese journal of clinical hematology*. 2014;55(6):607-32.
146. Physicians ACoC. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Critical care medicine*. 1992;20:864-74.
147. Levy MM, Fink MP, Marshall JC, Abraham E, Angus D, Cook D, et al. 2001 sccm/esicm/accp/ats/sis international sepsis definitions conference. *Intensive care medicine*. 2003;29(4):530-8.

148. Taniguchi T, Koido Y, Aiboshi J, Yamashita T, Suzaki S, Kurokawa A. Change in the ratio of interleukin-6 to interleukin-10 predicts a poor outcome in patients with systemic inflammatory response syndrome. *Critical care medicine*. 1999;27(7):1262-4.
149. Ueda S, Nishio K, Minamino N, Kubo A, Akai Y, Kangawa K, et al. Increased plasma levels of adrenomedullin in patients with systemic inflammatory response syndrome. *American journal of respiratory and critical care medicine*. 1999;160(1):132-6.
150. Stoiser B, Knapp S, Thaihammer F, Locker G, Kofler J, Hollenstein U, et al. Time course of immunological markers in patients with the systemic inflammatory response syndrome: evaluation of sCD14, sVCAM-1, sELAM-1, MIP-1 and TGF- β 2. *European journal of clinical investigation*. 1998;28:672-8.
151. Hietaranta A, Kemppainen E, Puolakkainen P, Sainio V, Haapiainen R, Peuravuori H, et al. Extracellular phospholipases A2 in relation to systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and systemic complications in severe acute pancreatitis. *Pancreas*. 1999;18(4):385-91.
152. Takala A, Jousela I, Olkkola KT, Jansson S-E, Leirisalo-Repo M, Takkunen O, et al. Systemic inflammatory response syndrome without systemic inflammation in acutely ill patients admitted to hospital in a medical emergency. *Clinical science*. 1999;96(3):287-95.
153. Mossie A. Pathophysiology of sepsis. *World journal of medicine and medical science*. 2013;1(8):159-68.
154. Quenot J, Pavon A, Fournel I, Barbar S, Bruyère R. Le choc septique de l'adulte en France: vingt ans de données épidémiologiques. *Réanimation*. 2015;24(3):303-9.
155. Balk RA. Severe sepsis and septic shock: definitions, epidemiology, and clinical manifestations. *Critical care clinics*. 2000;16(2):179-92.
156. Cohen J. The immunopathogenesis of sepsis. *Nature*. 2002;420(6917):885-91.
157. Kox W, Volk T, Kox S, Volk H-D. Immunomodulatory therapies in sepsis. *Intensive care medicine*. 2000;26(1):S124-S8.
158. Patel GP, Gurka DP, Balk RA. New treatment strategies for severe sepsis and septic shock. *Current opinion in critical care*. 2003;9(5):390-6.
159. Nauseef WM, Borregaard N. Neutrophils at work. *Nature immunology*. 2014;15(7):602-11.
160. Bhan C, Dipankar P, Chakraborty P, Sarangi PP. Role of cellular events in the pathophysiology of sepsis. *Inflammation Research*. 2016:1-16.
161. Sawa Y, Ueki T, Hata M, Iwasawa K, Tsuruga E, Kojima H, et al. LPS-induced IL-6, IL-8, VCAM-1, and ICAM-1 expression in human lymphatic endothelium. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 2008;56(2):97-109.
162. Lerman YV, Lim K, Hyun Y-M, Falkner KL, Yang H, Pietropaoli AP, et al. Sepsis lethality via exacerbated tissue infiltration and TLR-induced cytokine production by neutrophils is integrin α 3 β 1-dependent. *Blood*. 2014;124(24):3515-23.
163. V Lerman Y, Kim M. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions. *Cardiovascular & Haematological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-Cardiovascular & Hematological Disorders)*. 2015;15(1):19-28.
164. Kobayashi Y. The role of chemokines in neutrophil biology. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*. 2008;13:2400-7.
165. Brown K, Brain S, Pearson J, Edgeworth J, Lewis S, Treacher D. Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis. *The Lancet*. 2006;368(9530):157-69.
166. Markiewski MM, DeAngelis RA, Lambris JD. Complexity of complement activation in sepsis. *Journal of cellular and molecular medicine*. 2008;12(6a):2245-54.
167. Ward PA. The dark side of C5a in sepsis. *Nature Reviews Immunology*. 2004;4(2):133-42.

168. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. 2004;303(5663):1532-5.
169. Nathan C, Ding A. Nonresolving inflammation. *Cell*. 2010;140(6):871-82.
170. Schulte W, Bernhagen J, Bucala R. Cytokines in sepsis: potent immunoregulators and potential therapeutic targets—an updated view. *Mediators of inflammation*. 2013;2013.
171. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, et al. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *The Journal of Immunology*. 1999;163(3):1537-44.
172. Sha Y, Zmijewski J, Xu Z, Abraham E. HMGB1 develops enhanced proinflammatory activity by binding to cytokines. *The Journal of Immunology*. 2008;180(4):2531-7.
173. Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock DT, Latz E, Czura CJ, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2. *Shock*. 2006;26(2):174-9.
174. Riedemann NC, Guo R-F, Gao H, Sun L, Hoesel M, Hollmann TJ, et al. Regulatory role of C5a on macrophage migration inhibitory factor release from neutrophils. *The Journal of Immunology*. 2004;173(2):1355-9.
175. Cavillon JM, Adib-Conquy M. Bench-to-bedside review: endotoxin tolerance as a model of leukocyte reprogramming in sepsis. *Crit Care*. 2006;10(5):233. Epub 2006/10/19.
176. Ellaban E, Bolgos G, Remick D. Selective macrophage suppression during sepsis. *Cellular immunology*. 2004;231(1):103-11.
177. Poehlmann H, Schefold JC, Zuckermann-Becker H, Volk H-D, Meisel C. Phenotype changes and impaired function of dendritic cell subsets in patients with sepsis: a prospective observational analysis. *Critical Care*. 2009;13(4):1.
178. Faivre V, Lukaszewicz AC, Alves A, Charron D, Payen D, Haziot A. Human monocytes differentiate into dendritic cells subsets that induce anergic and regulatory T cells in sepsis. *PloS one*. 2012;7(10):e47209.
179. Chiche L, Forel J-M, Thomas G, Farnarier C, Vely F, Bléry M, et al. The role of natural killer cells in sepsis. *BioMed research international*. 2011;2011.
180. Sherwood ER, Enoh VT, Murphey ED, Lin CY. Mice depleted of CD8⁺ T and NK cells are resistant to injury caused by cecal ligation and puncture. *Laboratory investigation*. 2004;84(12):1655-65.
181. Badgwell B, Parihar R, Magro C, Dierksheide J, Russo T, Carson WE. Natural killer cells contribute to the lethality of a murine model of *Escherichia coli* infection. *Surgery*. 2002;132(2):205-12.
182. Kuijpers TW, Baars PA, Dantin C, van den Burg M, van Lier RA, Roosnek E. Human NK cells can control CMV infection in the absence of T cells. *Blood*. 2008;112(3):914-5.
183. Delano MJ, Thayer T, Gabrilovich S, Kelly-Scumpia KM, Winfield RD, Scumpia PO, et al. Sepsis induces early alterations in innate immunity that impact mortality to secondary infection. *The Journal of Immunology*. 2011;186(1):195-202.
184. Bour-Jordan H, Esensten JH, Martinez-Llordella M, Penaranda C, Stumpf M, Bluestone JA. Intrinsic and extrinsic control of peripheral T-cell tolerance by costimulatory molecules of the CD28/B7 family. *Immunological reviews*. 2011;241(1):180-205.
185. De AK, Kodys KM, Pellegrini J, Yeh B, Furse RK, Bankey P, et al. Induction of global anergy rather than inhibitory Th2 lymphokines mediates posttrauma T cell immunodepression. *Clinical Immunology*. 2000;96(1):52-66.
186. Roth G, Moser B, Krenn C, Brunner M, Haisjackl M, Almer G, et al. Susceptibility to programmed cell death in T-lymphocytes from septic patients: a mechanism for lymphopenia and Th2 predominance. *Biochemical and biophysical research communications*. 2003;308(4):840-6.

187. Boomer JS, To K, Chang KC, Takasu O, Osborne DF, Walton AH, et al. Immunosuppression in patients who die of sepsis and multiple organ failure. *Jama*. 2011;306(23):2594-605.
188. Guignant C, Lepape A, Huang X, Kherouf H, Denis L, Poitevin F, et al. Programmed death-1 levels correlate with increased mortality, nosocomial infection and immune dysfunctions in septic shock patients. *Critical Care*. 2011;15(2):1.
189. Brahmamdam P, Inoue S, Unsinger J, Chang KC, McDunn JE, Hotchkiss RS. Delayed administration of anti-PD-1 antibody reverses immune dysfunction and improves survival during sepsis. *Journal of leukocyte biology*. 2010;88(2):233-40.
190. Gurung P, Rai D, Condotta SA, Babcock JC, Badovinac VP, Griffith TS. Immune unresponsiveness to secondary heterologous bacterial infection after sepsis induction is TRAIL dependent. *The Journal of Immunology*. 2011;187(5):2148-54.
191. Tupin E, Kinjo Y, Kronenberg M. The unique role of natural killer T cells in the response to microorganisms. *Nature Reviews Microbiology*. 2007;5(6):405-17.
192. Jiang H, Chess L. An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *The Journal of clinical investigation*. 2004;114(9):1198-208.
193. Emoto M, Miyamoto M, Yoshizawa I, Emoto Y, Schaible UE, Kita E, et al. Critical role of NK cells rather than V α 14⁺ NKT cells in lipopolysaccharide-induced lethal shock in mice. *The Journal of Immunology*. 2002;169(3):1426-32.
194. Tsujimoto H, Ono S, Matsumoto A, Kawabata T, Kinoshita M, Majima T, et al. A critical role of CpG motifs in a murine peritonitis model by their binding to highly expressed toll-like receptor-9 on liver NKT cells. *Journal of hepatology*. 2006;45(6):836-43.
195. Carding SR, Egan PJ. $\gamma\delta$ T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nature Reviews Immunology*. 2002;2(5):336-45.
196. Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. $\gamma\delta$ T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *The Journal of Immunology*. 2005;174(10):6045-53.
197. Jameson J, Witherden D, Havran WL. T-cell effector mechanisms: $\gamma\delta$ and CD1d-restricted subsets. *Current opinion in immunology*. 2003;15(3):349-53.
198. Schwacha MG, Ayala A, Chaudry IH. Insights into the role of gammadelta T lymphocytes in the immunopathogenic response to thermal injury. *Journal of leukocyte biology*. 2000;67(5):644-50.
199. Daniel T, Thobe BM, Chaudry IH, Choudhry MA, Hubbard WJ, Schwacha MG. Regulation of the postburn wound inflammatory response by $\gamma\delta$ T-cells. *Shock*. 2007;28(3):278-83.
200. Matsushima A, Ogura H, Fujita K, Koh T, Tanaka H, Sumi Y, et al. Early activation of $\gamma\delta$ T lymphocytes in patients with severe systemic inflammatory response syndrome. *Shock*. 2004;22(1):11-5.
201. Venet F, Bohé J, Debard A-L, Bienvenu J, Lepape A, Monneret G. Both percentage of $\gamma\delta$ T lymphocytes and CD3 expression are reduced during septic shock. *Critical care medicine*. 2005;33(12):2836-40.
202. Belkaid Y. Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity. *Nature Reviews Immunology*. 2007;7(11):875-88.
203. Wisnoski N, Chung C-S, Chen Y, Huang X, Ayala A. The contribution of CD4⁺ CD25⁺ T-regulatory-cells to immune suppression in sepsis. *Shock (Augusta, Ga)*. 2007;27(3):251.
204. Bermejo-Martin JF, Andaluz-Ojeda D, Almansa R, Gandia F, Gomez-Herreras JI, Gomez-Sanchez E, et al. Defining Immunological Dysfunction in Sepsis: a requisite tool for Precision Medicine. *The Journal of infection*. 2016. Epub 2016/02/07.
205. Ehrenstein MR, Notley CA. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology*. 2010;10(11):778-86.

206. Rauch PJ, Chudnovskiy A, Robbins CS, Weber GF, Etzrodt M, Hilgendorf I, et al. Innate response activator B cells protect against microbial sepsis. *Science*. 2012;335(6068):597-601.
207. Panacek EA, Marshall JC, Albertson TE, Johnson DH, Johnson S, MacArthur RD, et al. Efficacy and safety of the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody F (ab')₂ fragment afelimomab in patients with severe sepsis and elevated interleukin-6 levels. *Critical care medicine*. 2004;32(11):2173-82.
208. Faix JD. Biomarkers of sepsis. *Critical reviews in clinical laboratory sciences*. 2013;50(1):23-36.
209. Patel R, Deen K, Youngs D, Warwick J, Keighley M. Interleukin 6 is a prognostic indicator of outcome in severe intra-abdominal sepsis. *British journal of surgery*. 1994;81(9):1306-8.
210. Stryjewski GR, Nylén ES, Bell MJ, Snider RH, Becker KL, Wu A, et al. Interleukin-6, interleukin-8, and a rapid and sensitive assay for calcitonin precursors for the determination of bacterial sepsis in febrile neutropenic children. *Pediatric Critical Care Medicine*. 2005;6(2):129-35.
211. Bozza FA, Salluh JJ, Japiassu AM, Soares M, Assis EF, Gomes RN, et al. Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Critical Care*. 2007;11(2):1.
212. Gabay C, Kushner I. Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*. 1999;340(6):448-54.
213. Assicot M, Bohuon C, Gendrel D, Raymond J, Carsin H, Guilbaud J. High serum procalcitonin concentrations in patients with sepsis and infection. *The Lancet*. 1993;341(8844):515-8.
214. Reinhart K, Bauer M, Riedemann NC, Hartog CS. New approaches to sepsis: molecular diagnostics and biomarkers. *Clinical microbiology reviews*. 2012;25(4):609-34.
215. Hoffmann G, Totzke G, Seibel M, Smolny M, Wiedermann FJ, Schobersberger W. In vitro modulation of inducible nitric oxide synthase gene expression and nitric oxide synthesis by procalcitonin. *Critical care medicine*. 2001;29(1):112-6.
216. Ward PA. The harmful role of c5a on innate immunity in sepsis. *Journal of innate immunity*. 2010;2(5):439-45.
217. Livaditi O, Kotanidou A, Psarra A, Dimopoulou I, Sotiropoulou C, Augustatou K, et al. Neutrophil CD64 expression and serum IL-8: sensitive early markers of severity and outcome in sepsis. *Cytokine*. 2006;36(5):283-90.
218. Gros A, Roussel M, Sauvadet E, Gacouin A, Marqué S, Chimot L, et al. The sensitivity of neutrophil CD64 expression as a biomarker of bacterial infection is low in critically ill patients. *Intensive care medicine*. 2012;38(3):445-52.
219. Jeong SJ, Song YG, Kim CO, Kim HW, Ku NS, Han SH, et al. Measurement of plasma sTREM-1 in patients with severe sepsis receiving early goal-directed therapy and evaluation of its usefulness. *Shock*. 2012;37(6):574-8.
220. Linder A, Christensson B, Herwald H, Björck L, Åkesson P. Heparin-binding protein: an early marker of circulatory failure in sepsis. *Clinical infectious diseases*. 2009;49(7):1044-50.
221. Zou Q, Wen W, Zhang X. Presepsin as a novel sepsis biomarker. *World journal of emergency medicine*. 2014;5(1):16-9.
222. Yin K, Dang S, Zhang J. Relationship between expression of triggering receptor-1 on myeloid cells in intestinal tissue and intestinal barrier dysfunction in severe acute pancreatitis. *World journal of emergency medicine*. 2011;2(3):216-21.
223. Shozushima T, Takahashi G, Matsumoto N, Kojika M, Okamura Y, Endo S. Usefulness of presepsin (sCD14-ST) measurements as a marker for the diagnosis and severity of sepsis that satisfied diagnostic criteria of systemic inflammatory response syndrome. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2011;17(6):764-9.

224. Endo S, Suzuki Y, Takahashi G, Shozushima T, Ishikura H, Murai A, et al. Usefulness of presepsin in the diagnosis of sepsis in a multicenter prospective study. *Journal of Infection and Chemotherapy*. 2012;18(6):891-7.
225. English D, Andersen BR. Single-step separation of red blood cells, granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *Journal of immunological methods*. 1974;5(3):249-52.
226. Didier G, Brézellec P, Remy E, Henaut A. GeneANOVA-gene expression analysis of variance. *Bioinformatics*. 2002;18(3):490-1.
227. Quackenbush J. Computational analysis of microarray data. *Nat Rev Genet*. 2001;2(6):418-27.
228. Brown MP, Grundy WN, Lin D, Cristianini N, Sugnet CW, Furey TS, et al. Knowledge-based analysis of microarray gene expression data by using support vector machines. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2000;97(1):262-7.
229. Adrie C, Azoulay E, Francois A, Clec'h C, Darques L, Schwebel C, et al. Influence of gender on the outcome of severe sepsis: a reappraisal. *CHEST Journal*. 2007;132(6):1786-93.
230. Kasmar AG, Van Rhijn I, Magalhaes KG, Young DC, Cheng T-Y, Turner MT, et al. Cutting edge: CD1a tetramers and dextramers identify human lipopeptide-specific T cells ex vivo. *The Journal of Immunology*. 2013;191(9):4499-503.
231. He X, Yang W, Tang W, Ma R, Sun Y, Wang P, et al. TRAV gene expression in PBMCs and TILs in patients with breast cancer analyzed by a DNA melting curve (FQ-PCR) technique for TCR α chain CDR3 spectratyping. *Neoplasma*. 2011;59(6):693-9.
232. Faris R, Weber MM, Seeger DR, Cavazos D, de Graffenried L, Murphy EJ, et al. Mitochondrial Glycerol-3-Phosphate Acyltransferase-Dependent Phospholipid Synthesis Modulates Phospholipid Mass and IL-2 Production in Jurkat T Cells. *Lipids*. 2016;51(3):291-301.
233. Melnick M, Phair RD, Lapidot SA, Jaskoll T. Salivary gland branching morphogenesis: a quantitative systems analysis of the Eda/Edar/NF κ B paradigm. *BMC developmental biology*. 2009;9(1):1.
234. D'Ignazio L, Bandarra D, Rocha S. NF-kappaB and HIF crosstalk in immune responses. *The FEBS journal*. 2016;283(3):413-24.
235. Majdalawieh A, Ro HS. Regulation of IkappaBalpha function and NF-kappaB signaling: AEBP1 is a novel proinflammatory mediator in macrophages. *Mediators of inflammation*. 2010;823821(10):12.
236. Li X, Su J, Cui X, Li Y, Barochia A, Eichacker PQ. Can we predict the effects of NF-kappaB inhibition in sepsis? Studies with parthenolide and ethyl pyruvate. *Expert opinion on investigational drugs*. 2009;18(8):1047-60.
237. Olofsson PS, Rosas-Ballina M, Levine YA, Tracey KJ. Rethinking inflammation: neural circuits in the regulation of immunity. *Immunological reviews*. 2012;248(1):188-204.
238. Vanska M, Koivula I, Hamalainen S, Pulkki K, Nousiainen T, Jantunen E, et al. High pentraxin 3 level predicts septic shock and bacteremia at the onset of febrile neutropenia after intensive chemotherapy of hematologic patients. *Haematologica*. 2011;96(9):1385-9. Epub 2011/09/02.
239. 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 acids research*. 2007;35(suppl 2):W193-W200.
240. Reimand J, Arak T, Adler P, Kolberg L, Reisberg S, Peterson H, et al. g: Profiler—a web server for functional interpretation of gene lists (2016 update). *Nucleic acids research*. 2016:gkw199.
241. www.vidal.fr.

242. Klein B, Tarte K, Jourdan M, Mathouk K, Moreaux J, Jourdan E, et al. Survival and proliferation factors of normal and malignant plasma cells. *International journal of hematology*. 2003;78(2):106-13.
243. Rosean TR, Tompkins VS, Tricot G, Holman CJ, Olivier AK, Zhan F, et al. Preclinical validation of interleukin 6 as a therapeutic target in multiple myeloma. *Immunologic research*. 2014;59(1-3):188-202. Epub 2014/05/23.
244. Hardin J, MacLeod S, Grigorieva I, Chang R, Barlogie B, Xiao H, et al. Interleukin-6 prevents dexamethasone-induced myeloma cell death. *Blood*. 1994;84(9):3063-70.
245. Lichtenstein A, Tu Y, Fady C, Vescio R, Berenson J. Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cellular immunology*. 1995;162(2):248-55.
246. Kishimoto T. Interleukin-6: from basic science to medicine-40 years in immunology. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:1-21.
247. Ishikawa H, Tsuyama N, Abroun S, Liu S, Li F-J, Otsuyama K-I, et al. Interleukin-6, CD45 and the src-kinases in myeloma cell proliferation. *Leukemia & lymphoma*. 2003;44(9):1477-81.
248. San-Miguel J, Blade J, Shpilberg O, Grosicki S, Maloisel F, Min CK, et al. Phase 2 randomized study of bortezomib-melphalan-prednisone with or without siltuximab (anti-IL-6) in multiple myeloma. *Blood*. 2014;123(26):4136-42. Epub 2014/05/17.
249. Hunsucker SA, Magarotto V, Kuhn DJ, Kornblau SM, Wang M, Weber DM, et al. Blockade of interleukin-6 signalling with siltuximab enhances melphalan cytotoxicity in preclinical models of multiple myeloma. *British journal of haematology*. 2011;152(5):579-92. Epub 2011/01/19.
250. Voorhees PM, Chen Q, Kuhn DJ, Small GW, Hunsucker SA, Strader JS, et al. Inhibition of interleukin-6 signaling with CNTO 328 enhances the activity of bortezomib in preclinical models of multiple myeloma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(21):6469-78. Epub 2007/11/03.
251. Voorhees PM, Chen Q, Small GW, Kuhn DJ, Hunsucker SA, Nemeth JA, et al. Targeted inhibition of interleukin-6 with CNTO 328 sensitizes pre-clinical models of multiple myeloma to dexamethasone-mediated cell death. *British journal of haematology*. 2009;145(4):481-90. Epub 2009/04/07.
252. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi J-F. Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer a review of the rationale and clinical evidence. *Clinical Cancer Research*. 2003;9(13):4653-65.
253. Rossi J-F, Manges RF, Sutherland HJ, Jagannath S, Voorhees P, Sonneveld P, et al. Preliminary results of CNTO 328, an anti-interleukin-6 monoclonal antibody, in combination with bortezomib in the treatment of relapsed or refractory multiple myeloma. *Blood*. 2008;112(11):867-.
254. Yoshio-Hoshino N, Adachi Y, Aoki C, Pereboev A, Curiel DT, Nishimoto N. Establishment of a new interleukin-6 (IL-6) receptor inhibitor applicable to the gene therapy for IL-6-dependent tumor. *Cancer research*. 2007;67(3):871-5.
255. Fulciniti M, Hideshima T, Vermot-Desroches C, Pozzi S, Nanjappa P, Shen Z, et al. A high-affinity fully human anti-IL-6 mAb, 1339, for the treatment of multiple myeloma. *Clinical Cancer Research*. 2009;15(23):7144-52.
256. Hideshima T, Mitsiades C, Tonon G, Richardson PG, Anderson KC. Understanding multiple myeloma pathogenesis in the bone marrow to identify new therapeutic targets. *Nature reviews Cancer*. 2007;7(8):585-98. Epub 2007/07/25.
257. Spanswick VJ, Craddock C, Sekhar M, Mahendra P, Shankaranarayana P, Hughes RG, et al. Repair of DNA interstrand crosslinks as a mechanism of clinical resistance to melphalan in multiple myeloma. *Blood*. 2002;100(1):224-9. Epub 2002/06/19.

258. Sunters A, Springer CJ, Bagshawe KD, Souhami RL, Hartley JA. The cytotoxicity, DNA crosslinking ability and DNA sequence selectivity of the aniline mustards melphalan, chlorambucil and 4-[bis (2-chloroethyl) amino] benzoic acid. *Biochemical pharmacology*. 1992;44(1):59-64.
259. Hulin C, Facon T, Rodon P, Pegourie B, Benboubker L, Doyen C, et al. Efficacy of melphalan and prednisone plus thalidomide in patients older than 75 years with newly diagnosed multiple myeloma: IFM 01/01 trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(22):3664-70. Epub 2009/05/20.
260. Merchionne F, Perosa F, Dammacco F. New therapies in multiple myeloma. *Clinical and experimental medicine*. 2007;7(3):83-97. Epub 2007/11/01.
261. Hong DS, Angelo LS, Kurzrock R. Interleukin-6 and its receptor in cancer. *Cancer*. 2007;110(9):1911-28.
262. Ishikawa H, Mahmoud MS, Fujii R, Abroun S, Kawano MM. Proliferation of immature myeloma cells by interleukin-6 is associated with CD45 expression in human multiple myeloma. *Leukemia & lymphoma*. 2000;39(1-2):51-5. Epub 2000/09/07.
263. Tirado CA, Chen W, Garcia R, Kohlman KA, Rao N. Genomic profiling using array comparative genomic hybridization define distinct subtypes of diffuse large B-cell lymphoma: a review of the literature. *Journal of hematology & oncology*. 2012;5:54. Epub 2012/09/13.
264. Barrans SL, Crouch S, Care MA, Worrillow L, Smith A, Patmore R, et al. Whole genome expression profiling based on paraffin embedded tissue can be used to classify diffuse large B-cell lymphoma and predict clinical outcome. *British journal of haematology*. 2012;159(4):441-53.
265. Feezor RJ, Cheng A, Paddock HN, Baker HV, Moldawer LL. Functional genomics and gene expression profiling in sepsis: beyond class prediction. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2005;41 Suppl 7:S427-35. Epub 2005/10/21.

Annexes

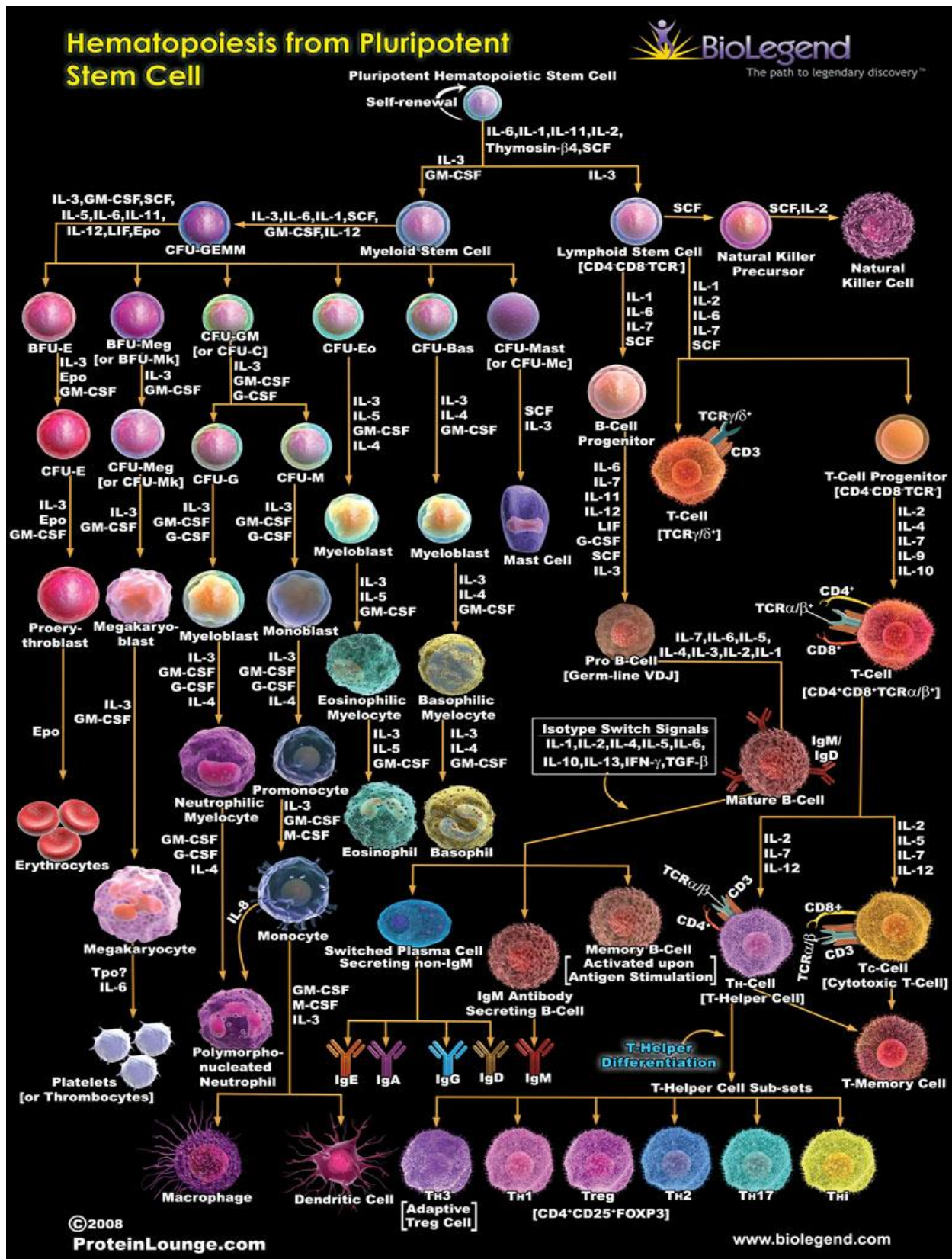


Figure 1 : L'hématopoïèse
 Etapes de différenciations des cellules sanguines à partir des cellules souches hématopoïétiques pluripotentes (www.biolegend.com)

Les hémopathies malignes : Généralités

Définition

Les hémopathies malignes sont définies comme des néoplasies développées à partir de cellules hématopoïétiques de la moelle osseuse et du système lymphoïde Figure 1 (1). L'Organisation mondiale de la santé (OMS) a proposé de les classer en hémopathies myéloïdes et hémopathies lymphoïdes. Les hémopathies myéloïdes comprennent : les syndromes myéloprolifératifs chroniques, les syndromes myélodysplasiques, les leucémies aiguës myéloïdes. Les hémopathies lymphoïdes comprennent : les lymphomes hodgkiniens, les lymphomes non hodgkiniens (B, T, NK/T).

Diagnostic

Le diagnostic des hémopathies malignes repose sur une combinaison de résultats multidisciplinaires ; confrontant des données cliniques, morphologiques, biologiques, cytogénétiques, histopathologiques, génétiques, immuno-phénotypiques, cytologiques et moléculaires. Cette confrontation permet de classer les hémopathies malignes dans différentes catégories, définies par une classification proposée par l'OMS. Cette classification représente un consensus entre cliniciens, hématologistes, biologistes et anatomopathologistes (2). Chaque pathologie présente des modalités évolutives et un pronostic propre (1).

Classification des hémopathies malignes

Hémopathies myéloïdes

Ces pathologies touchent les cellules souches de la moelle osseuse, comportant les précurseurs des lignées granuleuses, érythroblastiques, mégacaryocytaires et histio-monocytaires (1).

Les néoplasies myéloprolifératives chroniques

Les syndromes myéloprolifératifs chroniques se caractérisent par l'accumulation sanguine et médullaire de cellules différenciées (1), et l'on distingue :

- Leucémie myéloïde chronique : cellules granuleuses
- Polyglobulie primitive : cellules érythroblastiques
- Thrombocytémie : cellules mégacaryocytaires
- Myélofibrose idiopathique : atteinte des trois lignées

Les syndromes myélodysplasiques

Ils se caractérisent par des évènements mutationnels d'une ou des trois lignées médullaires, responsables de cytopénie. Ces syndromes peuvent aussi évoluer vers une leucémie aiguë.

Les leucémies aiguës myéloïdes

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est la plus fréquente des leucémies aiguës, dont elle représente 80 % (3). L'incidence de la LAM augmente avec l'âge de : ~1,3/100 000 dans la population dont l'âge est inférieur à 65 ans, à 12,2/100 000 chez la population dont l'âge est supérieur (3). Bien que le progrès dans le traitement de la LAM ait conduit à des améliorations significatives chez les patients jeunes, le pronostic chez les personnes âgées qui représentent la majorité des cas reste faible. Même avec les traitements actuels, plus de 70 % des patients de plus de 65 ans décèdent de leur maladie dans l'année du diagnostic (4, 5).

Les leucémies aiguës myéloïdes se caractérisent par une prolifération des précurseurs médullaires des trois lignées conduisant à l'accumulation dans le sang et dans la moelle de cellules immatures. Il existe différents types de LAM, les indifférenciées, les peu différenciées, les myéloblastiques, les monoblastiques, les myélomonoblastiques ainsi que les leucémies aiguës érythroblastiques et mégacaryoblastiques. La classification franco-américano-britannique représente la première classification des LAM. Établie en 1976, elle définit huit sous-types (table 1) basée sur les caractéristiques morphologiques et cytochimiques des cellules leucémiques.

Franco -américano-britannique	
M 0	Leucémie myeloblastique indifférenciée
M 1	Leucémie myeloblastique sans mutation
M 2	Leucémie myeloblastique avec mutation
M 3	Leucémie promyelocytaire
M 4	Leucémie myelocitaire
M 5	Leucémie monoblastique
M 6	Leucémie érythroblastique
M 7	Leucémie megacaryoblastique

Table 1 : Classification franco-américano-britannique des leucémies aiguës myéloïdes selon Bennett et al. 1985

En 2001, l'OMS propose un nouveau système de classification basé sur les progrès réalisés dans le diagnostic et la gestion des LAM, celui-ci est suivi par une version révisée en 2008 (6).

En 2016, une nouvelle version révisée a été établie, la classification des LAM proposée par l'OMS se distingue par l'intégration de données : génétiques, morphologiques, immunophénotypiques et cliniques

pour définir de grandes entités pathologiques : LAM avec anomalies génétiques récurrentes ; LAM avec des fonctionnalités liées à la myélodysplasie ; LAM liées au traitement ; LAM non spécifiée ; sarcome myéloïde ; et la prolifération myéloïde liée au syndrome de Down (Table2)(4, 7)

Classification de l'OMS
LAM avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8:21)(q22;q22) ; RUNX1-RUNX1T1
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; CBFβ-MYH11
LAP avec PML-RARA
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3) ; MLLT3-KMT2A
LM avec t(6;9)(p23;q34.1) ; DEK-NUP214
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; GATA2,MECOM
LAM avec t(1;22)(p13.3;q13.3) ; RBM15-MKL1
LAM avec BCR-ABL1
LAM avec NPM1 muté
LAM avec mutation biallélique de CEBPA
LAM avec RUX1 muté

Table 2 : Classification des leucémies aiguës myéloïdes (LAM) avec anomalies génétiques récurrentes selon l'OMS 2008

LAP : Leucémie aiguë promyélocytaire, LM : Leucémie myéloïde

La LAM peut survenir chez les patients souffrant d'un trouble hématologique sous-jacent ou à la suite d'un traitement antérieur (par exemple, l'exposition à des topo-isomérases II, des agents alkylants ou des radiations) (8). Cependant, dans la majorité des cas, elle apparaît comme une tumeur maligne de novo chez des individus en bonne santé. Quelle que soit son étiologie, la pathogénie de la LAM implique la prolifération anormale et la différenciation d'une population clonale de cellules souches myéloïdes. Des translocations bien caractérisées et récurrentes, telles que t (8:21) (gène CBF-AML) ou t (15:17) (gène APL) se traduisent par la formation de protéines chimères (RUNX1-RUNX1T1 et PML-RARA, respectivement), qui modifient le processus de maturation normale des précurseurs myéloïdes. Outre les grands remaniements chromosomiques, des changements moléculaires ont également été impliqués dans le développement de la LAM (4).

La leucémie aiguë myéloïde est une pathologie très hétérogène ; bien que des cas puissent être stratifiés en groupes : favorable, intermédiaire et de risque défavorable en fonction de leur profil cytogénétique, le pronostic de ces catégories varie considérablement (4). L'identification des mutations génétiques

récurrentes, telles que FLT3-ITD, NMP1 et CEBPA, a permis d'affiner le pronostic individuel. Malgré les progrès dans les soins de soutien, le traitement le plus courant est une combinaison de cytarabine - d'anthracyclines et la greffe allogénique de cellules souches pour les candidats éligibles. Les patients âgés sont souvent incapables de tolérer de tels traitements et présentent un pronostic particulièrement défavorable (4).

Les hémopathies lymphoïdes

Les hémopathies lymphoïdes sont des tumeurs hématopoïétiques provenant de cellules immunocompétentes : les lymphocytes. Ces derniers se propagent à d'autres tissus lymphoïdes et non lymphoïdes, soit par infiltration directe ou diffusion hématogène. Les hémopathies lymphoïdes constituent un groupe hétérogène de pathologies liées au dérèglement des lymphocytes (9).

Les hémopathies lymphoïdes sont divisées en deux groupes principaux : les lymphomes non hodgkiniens (LNH) et les lymphomes hodgkiniens (HL) (10).

Le lymphome hodgkinien

Le lymphome d'Hodgkin (ou hodgkinien) est caractérisé par la présence le plus souvent, de cellules de Reed–Sternberg. Il survient particulièrement chez de jeunes patients, sans antécédents d'immunosuppression.

Les lymphomes non hodgkiniens

Les NHL sont classés comme étant du type B (le plus fréquent), T, ou NK. Le diagnostic des différents lymphomes est effectué en combinant plusieurs techniques : examen microscopique standard, immunophénotypage, immunohistochimique ou en utilisant la cytométrie en flux. L'utilisation de la biologie moléculaire (ADN/ARN) peut être nécessaire pour confirmer le diagnostic. Bien que la cause des lymphomes soit inconnue, les infections virales antérieures avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) ou le virus T-lymphotropique humain (HTLV-1) peuvent être associées à des sous-types de LNH. L'immunosuppression et l'infection dues au virus du sida (VIH) sont aussi des facteurs de risque (10).

Plusieurs systèmes de classification ont été proposés, on peut citer celle de : l'institut national du cancer, celle de l'Organisation mondiale de la santé... Ces systèmes classent les lymphomes par : type cellulaire, modèle de croissance et par grade. En général, les tumeurs les plus avancées aux stades les plus élevés ont un mauvais pronostic et sont plus susceptibles de se propager au système nerveux (10). Le tableau ci-dessous (Table 3) résume la classification histologique des hémopathies lymphoïdes non hodgkiniennes T et B selon l'OMS.

Les lymphomes T et NK

Les lymphomes T et NK constituent un groupe hétérogène de pathologies liées à un dérèglement d'origine lymphocytaire. Ils se développent aux dépens des lymphocytes T matures ayant quitté le thymus après y avoir réarrangé leurs récepteurs à l'antigène et franchissent avec succès différentes étapes de sélection. Ils représentent 15 % des lymphomes dans les pays occidentaux et leur pronostic est défavorable, si on les compare à celui des lymphomes B. La dénomination « Lymphomes T périphériques » les oppose aux lymphomes et leucémies développés aux dépens des précurseurs lymphocytaires « centraux » que sont les leucémies et lymphomes lymphoblastiques T. La description des lymphomes dérivant des cellules natural killer est regroupée avec celle des lymphomes T, en raison des similitudes immunologiques qui existent entre ces deux lignées (9).

Les principaux marqueurs de la lignée T sont le CD2, le CD3, le CD5 et le CD7. La négativité des marqueurs CD1, TdT (Terminal Deoxynucleotidyl Transferase) permet d'affirmer le caractère « périphérique » (post-thymique) de la prolifération. Les antigènes CD4, CD8 et les protéines des granules cytotoxiques (TIA-1, granzyme B, perforine) permettent de préciser les sous-types fonctionnels des cellules T. Le phénotype des cellules NK présente une variation selon la sous-population considérée, mais nous pouvons quand même retenir le profil suivant : CD2+, CD3 membranaire -, CD3e cytoplasmique +, CD16+, CD56+. Il existe le plus souvent une expression cytoplasmique de marqueurs de cytotoxicité (9).

La classification des lymphomes T selon l'OMS ne distingue pas moins d'une quinzaine d'entités différentes (9, 11). Table 3

Lymphomes T et NK	Lymphomes B
Cellules T précurseurs	
Lymphomes/Leucémies T lymphoblastiques	Cellules B précurseurs
Proliférations T matures (périphériques)	Lymphomes/Leucémies B lymphoblastiques
Leucémie polymorphocytaire T	Proliférations B matures (périphériques)
Leucémie lymphocytaire T à grains	Leucémies lymphoïdes chroniques B/lymphomes lymphocytiques
Leucémie agressive NK	Leucémie prolymphocytaire B
Lymphome T de l'adulte (HTLV-1)	Lymphome lymphoplasmocytaire
Syndrome de Sézary	Lymphome splénique de la zone marginale
Lymphome T angio-immunoblastique	Leucémies à tricholeucocytes
Lymphome T périphérique, sans d'autre précision	Myélome/plasmocytome
Lymphome anaplasique à grandes cellules (T/null) de type systémique	Lymphome extra-ganglionnaire de la zone marginale de type MALT
Lymphome NK/T extraganglionnaire de type nasal	Lymphome de la zone marginale ganglionnaire
Lymphome T type entéropathie	Lymphome folliculaire
Lymphome T $\gamma\delta$ hépatosplénique	Lymphome du manteau
Lymphome T sous-cutané type panniculite	Lymphome diffus à grandes cellules B (médiastinal/séreuses)
Lymphome anaplasique à grandes cellules (T/null) cutané primitif	Lymphome de <i>Burkitt</i>

Table 3 : Classification histologique des hémopathies lymphoïdes non hodgkiniennes T et B selon l'organisation mondiale de la santé 1997.

Les lymphomes T angio-immunoblastiques

Les lymphomes angio-immunoblastiques (LAI) ont été décrits comme des affections non tumorales, mais sont désormais considérés comme des tumeurs avec une prolifération clonale T CD4 avec une fréquente trisomie 3 ou 5 (11). Le phénotype immunologique est habituellement celui d'une prolifération de T

matures (CD1a-, TdT -, CD3+, CD5+, CD7+) les cellules T situées au sein de la prolifération sont essentiellement CD4+, souvent accompagnées d'un contingent de cellules CD8+ moins nombreuses. La présence d'immunoblastes de phénotype B au sein des lésions de lymphomes T est caractéristique de ce sous-type de lymphome. Ces cellules sont porteuses de marqueurs d'association au virus d'Epstein-Barr (EBV). Le pronostic de cette hémopathie est défavorable avec une survie à 5 ans de l'ordre de 35 % (9).

Les lymphomes anaplasiques à grandes cellules T (T/nuls)

Les cellules des lymphomes T anaplasiques à grandes cellules expriment les antigènes CD25 et CD30, fréquemment l'antigène membranaire épithélial (EMA) et souvent un phénotype cytotoxique, avec l'expression des protéines perforine et granzyme. Deux formes cliniques sont observées :

- les formes cutanées primitives ; avec une évolution indolente, voire spontanément régressive.
- les formes systémiques avec un tableau clinique plus agressif avec polyadénopathies, atteinte extraganglionnaire et une translocation t (2 ;5) qui conduit à un gène de fusion entre le gène denucléophosmine (NPM) et le gène de lymphoma kinase (ALK) (9, 11). Les lymphomes T angio-immunoblastiques ont un pronostic favorable par rapport aux autres lymphomes T périphériques avec une sensibilité aux traitements chimiothérapeutiques (12, 13)

Les lymphomes T périphériques, sans autre précision

Ils constituent un groupe hétérogène de lymphomes, ne présentant aucune autre caractéristique permettant de les classer dans un autre sous-type. Ils représentent environ 40 % des lymphomes T périphériques. Les cellules tumorales présentent un immunophénotype de lymphocytes T périphériques CD3+, CD5+, CD7+ avec une prédominance de l'expression de CD4 et de CD8 (9, 11).

Les lymphomes T cutanés

Ils se séparent en deux groupes (9) :

- les lymphoproliférations T cutanées primitives non épidermotropes : exprimant l'antigène CD30
- les lymphoproliférations T cutanées primitives non épidermotropes : CD30 négatif.

Les lymphomes T/NK extraganglionnaire du type nasal, les lymphomes T de type entéropathie, les lymphomes T hépatospléniques, les leucémies NK agressives et autres types sont des formes rares de lymphomes avec des caractéristiques spécifiques à chaque entité (9, 11).

Les lymphomes B

Les lymphomes B représentent environ 85 % de l'ensemble des lymphomes non hodgkiniens dans les pays occidentaux. Les lymphomes diffus à grandes cellules B, les lymphomes folliculaires, les lymphomes du

manteau, les lymphomes de la zone marginale du type MALT et les lymphomes diffus lymphocytiques de type leucémie lymphoïde chronique sont les plus fréquents (11, 14).

Les lymphomes folliculaires

Ils se caractérisent par une architecture folliculaire, de composition cellulaire comparable à celle des centres germinatifs normaux (centroblastes, centrocytes), d'où la dénomination de centroblastique-centrocytique selon la classification de Kiel. Sur un plan immunohistochimique, les cellules B tumorales expriment en général l'antigène CD10, mais pas les antigènes CD5 ou CD23. Elles sont entourées par un réseau de cellules dendritiques (détectées par immunohistochimie R4/23+, CD35+). En cytogénétique et dans la majorité des cas, il existe une translocation t(14;18) qui permet de déplacer l'oncogène BCL-2, normalement situé sur le chromosome 18, à proximité des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines. La dérégulation de BCL-2 qui en résulte ; conduit à une surexpression de la protéine, avec ses conséquences sur la survie cellulaire (en raison du rôle de BCL-2 dans la protection de l'apoptose). Le lymphome folliculaire est caractérisé par une évolution lente. Il peut se transformer en lymphome d'une grande malignité par l'accumulation et l'enrichissement en anomalies génétiques, en particulier la mutation p53 (11, 15).

Les lymphomes du manteau

Les lymphomes du manteau se caractérisent par une prolifération monomorphe d'architecture diffuse ou nodulaire, constitués de petites cellules irrégulières, parfois disposées autour de centres germinatifs réactionnels, de phénotype B IgM+/IgD+, CD5+, CD10- et CD23-. La cytogénétique a montré l'existence d'une translocation t(11;14)(q13;q32) qui permet à l'oncogène BCL-1 (situé sur le chromosome 11 normalement) à se retrouver à proximité des gènes des chaînes lourdes d'immunoglobulines. La surexpression de BCL-1 dans ce cas-là, augmente la production de la protéine cycline D1 qui joue un rôle dans la prolifération cellulaire (11, 16). Les lymphomes du manteau ont un pronostic sévère, avec une mauvaise réponse aux chimiothérapies. Le taux de survie à 5 ans est voisin de 25 % (14). D'autres variantes cytogénétiques blastiques ont été décrites, elles sont encore de plus mauvais pronostic. Ces variantes sont associées à une accumulation d'anomalies génétiques, dont les mutations de p53 (14, 17).

Les lymphomes B de la zone marginale du tissu lymphoïde associés aux muqueuses (de type MALT)

Ces LHN sont constitués de cellules de petite taille dont l'aspect cytologique peut varier. Les cellules B tumorales sont de phénotype IgM+, IgD-, CD5-, CD10-, CD23-. L'anomalie génétique la plus connue est la translocation t(11;18), présente chez 30-50% des patients atteints de lymphome de MALT (14). Helicobacter pylori joue un rôle dans les localisations gastriques du lymphome. Des études ont montré que cette bactérie était nécessaire à la croissance tumorale et que le traitement d'Helicobacter par

antibiothérapie est souvent suivi d'une régression de la maladie voire une rémission (14, 18, 19). Trois variétés histologiques sont connues :

- Les lymphomes lymphocytiques
- Les lymphomes lymphoplasmocytaires
- Les lymphomes ganglionnaires de la zone marginale

Les lymphomes diffus à grandes cellules B (LDGCB)

Représentent 30 - 40 % des lymphomes non hodgkiniens. Une translocation t (14 ;18) est retrouvée dans environ 20 % des cas, des anomalies du gène Laz-3/BCL-6 sont particulièrement fréquentes. Un réarrangement ou une amplification du gène c-myc est rarement observé (14, 20). La surexpression de la protéine BCL-2 et de la protéine mutée p53 constituent des valeurs de mauvais pronostic (21, 22). Les LDGCB peuvent aussi être observés dans un contexte d'immunosuppression (VIH +, traitements immunosuppresseurs).

Les lymphomes de Burkitt

Ils sont considérés comme une entité pathologique de grande malignité, ce type de lymphome est rare. Les cellules tumorales sont de taille moyenne avec un noyau arrondi ou ovoïde à contours réguliers. Son profil immunophénotypique est bien caractérisé avec une expression des antigènes : CD19, CD20, CD22, CD79a associé aux cellules B. L'origine centrofolliculaire de ces cellules tumorales est confirmée par la surexpression du CD10 et de BCL-6. Les lymphomes de Burkitt peuvent envahir n'importe quel tissu, actuellement trois formes de ce lymphome sont identifiées :

- Une forme endémique
- Une forme sporadique
- Une forme observée chez les patients immunodéprimés

L'implication de l'oncogène c-myc est la marque constante dans ces trois formes avec la translocation t (8 ;14) ou une variante t (2 ;8) ou encore t (8 ;22), son association avec le virus d'Epstein-Barr (EBV) dans sa forme endémique africaine en fait un modèle de tumeur associée à un virus (23)

Le myélome multiple

Définition du myélome

Le myélome est une hémopathie maligne qui affecte les cellules B clonales. Il se caractérise par une expansion aberrante des cellules plasmocytaires dans la moelle osseuse, ainsi que dans l'os cortical et les

autres sites extramédullaire (24). Décrit pour la première fois dans les années 1840 par des médecins qui ont observé une atteinte osseuse et des infiltrations de la moelle osseuse (25)

Le myélome représente 10 % des hémopathies malignes (26). C'est une pathologie qui évolue généralement : d'un stade asymptomatique avec une prolifération clonale des plasmocytes appelée gammopathies monoclonales de signification indéterminée (MGUS). Les MGUS affectent 3 % de la population de plus de 50 ans et progressent en myélome multiple à un taux global de 1 % par an (27). Le myélome est responsable de 1,5 à 2 % des décès liés aux cancers et 20 % des décès liés aux hémopathies malignes. Il est plus fréquent chez l'homme que chez la femme et a un âge de survenue de 65 à 70 ans. Dans la plupart des cas, les causes du myélome sont inconnues, cependant, il a été associé aux rayonnements, aux solvants ainsi qu'à l'exposition aux pesticides et au benzène (24).

Manifestations cliniques du myélome

Le myélome est caractérisé par de l'ostéopénie, des lésions lytiques et de l'hypercalcémie sont des marqueurs caractéristiques. Les douleurs osseuses sont présentes chez 70 à 80 % des patients, avec des complications telles que les fractures pathologiques et la compression de la moelle épinière. L'anémie, l'insuffisance rénale, les saignements, l'hyperuricémie et l'amylose sont aussi des manifestations du myélome (24).

La pathophysiologie du myélome

Les immunoglobulines (Ig) sont constituées deux chaînes lourdes liées, avec une chaîne légère attachée à chacune, Figure 2. Dans un contexte non pathologique, les cellules plasmocytaires produisent des immunoglobulines pour combattre les corps étrangers considérés comme du « non-soi ». Cependant, dans le cas du myélome, les cellules monoclonales plasmocytaires prolifèrent et surproduisent la protéine M (IgG, IgM, ou IgA anormaux ou rarement IgE ou IgD). Les cellules du myélome multiple produisent anormalement aussi des protéines de chaînes légères (κ ou λ), les cytokines qui stimulent les ostéoclastes et répriment la production des ostéoblastes ainsi que les facteurs de l'angiogenèse qui contribuent à la formation des nouveaux vaisseaux sanguins. Par conséquent, le processus du myélome multiple conduit à un niveau de protéine M excessive, ce qui provoque de l'hyperviscosité ; et les protéines de chaînes légères causent des dommages aux organes cibles, en particulier ; les reins et les os (28).

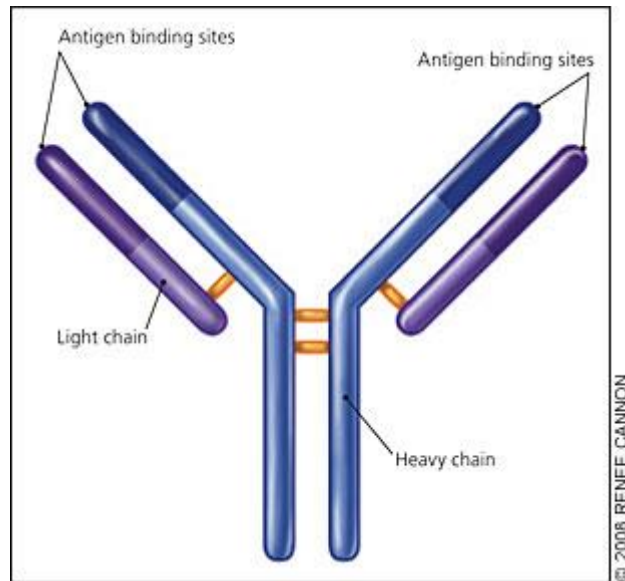


Figure 2 : Schématisation d'une molécule d'immunoglobuline (Ig) contenant deux chaînes lourdes appariées avec une chaîne légère plus petite attachée à chacune d'elles. (Nau and al. 2008)

Le diagnostic

Le diagnostic de myélome multiple est basé sur les directives de « International Myeloma Working Group Guidelines », table 5 (29). Le diagnostic repose sur la présence d'un anticorps monoclonal « la paraprotéine » ou « protéine M » conjointement avec une plasmocytose et des lésions d'organes liés au myélome (osseuses, rénales...). Cette protéine M spécifique au patient peut être détectée dans le sérum ou dans l'urine. L'identification et la quantification de la protéine M dans le sérum et dans l'urine (électrophorèse des protéines sériques et électrophorèse des protéines urinaires) sont un élément central dans le diagnostic du myélome. L'électrophorèse sur gel d'agarose est la méthode courante de détection de la M-protéines, alors que l'immunoélectrophorèse est effectuée pour caractériser les types de chaînes lourdes et légères (24).

Gammopathie monoclonale de signification indéterminée	Myélome couvant	Myélome multiple
Protéine monoclonale sérique <30 g/L	Protéine monoclonale sérique ≥30 g/L	Présence de protéine monoclonale sérique dans le sérum et/ou dans l'urine
Présence de cellules plasmatiques clonales dans la moelle osseuse <10 %	Présence de cellules plasmatiques clonales dans la moelle osseuse ≥10 %	Présence de cellules plasmatiques clonales dans la moelle osseuse ou diagnostic d'un plasmacytome par biopsie
Aucune évidence d'autres troubles lymphoprolifératifs	Pas de myélome lié à une atteinte d'organe ou à une atteinte tissulaire	Myélome lié à une atteinte d'organe ou à une atteinte tissulaire
Pas de myélome lié à une atteinte d'organe ou à une atteinte tissulaire	-	-

Table 4 : Les critères de diagnostic du myélome multiple selon le « International Myeloma Working Group Guidelines » 2003

Le traitement du myélome

L'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques reste le traitement de référence en première ligne, chez le sujet jeune atteint de myélome, après des cycles de chimiothérapies conventionnelles, visant à réduire la masse tumorale.

Bibliographie

1. Diebold J, Molina T, Le Tourneau A, Audouin J. Hémopathies malignes: définition et différentes variétés selon la classification de l'OMS 2001. *Revue francophone des laboratoires*. 2008;2008(398):65-71.
2. Jaffee E, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. World Health Organization classification of tumors. Pathology and genetics of tumors of hematopoietic and lymphoid tissues. Lyon: IARC Press; 2001.
3. Yamamoto JF, Goodman MT. Patterns of leukemia incidence in the United States by subtype and demographic characteristics, 1997–2002. *Cancer Causes & Control*. 2008;19(4):379-90.
4. De Kouchkovsky I, Abdul-Hay M. Acute myeloid leukemia: a comprehensive review and 2016 update. *Blood cancer journal*. 2016;6(7):e441.
5. Meyers J, Yu Y, Kaye JA, Davis KL. Medicare fee-for-service enrollees with primary acute myeloid leukemia: an analysis of treatment patterns, survival, and healthcare resource utilization and costs. *Applied health economics and health policy*. 2013;11(3):275-86.

6. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114(5):937-51.
7. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;blood-2016-03-643544.
8. Sill H, Olipitz W, Zebisch A, Schulz E, Wölfler A. Therapy-related myeloid neoplasms: pathobiology and clinical characteristics. *British journal of pharmacology*. 2011;162(4):792-805.
9. Dupuis J, Gisselbrecht C. Lymphomes non hodgkiniens T et NK périphériques. *EMC-Hématologie*. 2004;1(4):135-49.
10. Kelly JJ, Karcher DS. Lymphoma and peripheral neuropathy: a clinical review. *Muscle & nerve*. 2005;31(3):301-13. Epub 2004/11/16.
11. Gaulard P. Classification des lymphomes non hodgkiniens. *Médecine thérapeutique*. 2000;6(5):343-52.
12. Tilly H, Gaulard P, Lepage E, Dumontet C, Diebold J, Plantier I, et al. Primary anaplastic large-cell lymphoma in adults: clinical presentation, immunophenotype, and outcome. *Blood*. 1997;90(9):3727-34.
13. Falini B, Pileri S, Zinzani PL, Carbone A, Zagonel V, Wolf-Peeters C, et al. ALK+ lymphoma: clinico-pathological findings and outcome. *Blood*. 1999;93(8):2697-706.
14. Armitage JO. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*. 1997;89(11):3909-18.
15. Stansfeld A, Diebold J, Kapanci Y, Kelenyi G, Lennert K, Mioduszezowska O, et al. Updated Kiel classification for lymphomas. *The Lancet*. 1988;331(8580):292-3.
16. Bonnet C, Caers J, De Prijck B, Hafraoui K, Beguin Y. Lymphome du manteau: prise en charge 2011. *Revue medicale suisse*. 2011;7:1644-9.
17. Beà SI, Ribas M, Hernández JM, Bosch F, Pinyol M, Hernández L, et al. Increased number of chromosomal imbalances and high-level DNA amplifications in mantle cell lymphoma are associated with blastoid variants. *Blood*. 1999;93(12):4365-74.
18. Hussell T, Isaacson P, Spencer J, Crabtree J. The response of cells from low-grade B-cell gastric lymphomas of mucosa-associated lymphoid tissue to *Helicobacter pylori*. *The Lancet*. 1993;342(8871):571-4.
19. Wotherspoon A, Diss T, Pan L, Isaacson P, Doglioni C, Moschini A, et al. Regression of primary low-grade B-cell gastric lymphoma of mucosa-associated lymphoid tissue type after eradication of *Helicobacter pylori*. *The Lancet*. 1993;342(8871):575-7.
20. Bastard C, Tilly H, Lenormand B, Bigorgne C, Boulet D, Kunlin A, et al. Translocations involving band 3q27 and Ig gene regions in non-Hodgkin's lymphoma [see comments]. *Blood*. 1992;79(10):2527-31.
21. Hermine O, Haioun C, Lepage E, d'Agay M-F, Briere J, Lavignac C, et al. Prognostic significance of bcl-2 protein expression in aggressive non-Hodgkin's lymphoma. *Groupe d'Etude des Lymphomes de l'Adulte (GELA)*. *Blood*. 1996;87(1):265-72.
22. Ichikawa A, Kinoshita T, Watanabe T, Kato H, Nagai H, Tsushita K, et al. Mutations of the p53 gene as a prognostic factor in aggressive B-cell lymphoma. *New England Journal of Medicine*. 1997;337(8):529-34.
23. Ribrag V, Camara-Clayette V, Bosq J, Vasstszky Y. Lymphome de Burkitt. 2012.
24. Fadilah S. Fundamentals in the management of multiple myeloma. *The Medical journal of Malaysia*. 2010;65(3):231-9.
25. Kyle RA. Multiple myeloma: an odyssey of discovery. *British journal of haematology*. 2000;111(4):1035-44. Epub 2001/02/13.
26. Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. *The New England journal of medicine*. 2004;351(18):1860-73. Epub 2004/10/29.
27. Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV, Larson DR, Plevak MF, Offord JR, et al. Prevalence of monoclonal gammopathy of undetermined significance. *New England Journal of Medicine*. 2006;354(13):1362-9.
28. Nau KC, Lewis WD. Multiple myeloma: diagnosis and treatment. *American family physician*. 2008;78(7):853-9. Epub 2008/10/10.
29. Criteria for the classification of monoclonal gammopathies, multiple myeloma and related disorders: a report of the International Myeloma Working Group. *British journal of haematology*. 2003;121(5):749-57. Epub 2003/06/05.

Publication en cours de rédaction : Caractérisation transcriptomique de l'inflammation des PBMC, des poumons et du cerveau de souris au cours du syndrome de détresse respiratoire aiguë

Large scale transcriptomic characterization of mice blood, lung and brain inflammation during Acute Lung Injury.

*Séverine Garnier^{1,2}, Isabelle Lesur^{1,2}, Elise Yammine^{1,2}, Yasmine Labiad^{1,2}, Béatrice Loriod^{1,2}, Pascal Rihet^{1,2}
and Catherine Nguyen^{1,2*}*

1- Aix-Marseille Université, UMR_S 1090, TAGC, Parc scientifique de Luminy, Marseille, France

2- Inserm, UMR_S 1090, TAGC, Parc scientifique de Luminy, Marseille, France.

* Corresponding author: catherine.nguyen@inserm.fr

Abstract (253/350 words)

In this work, we describe a global transcriptome overview of critical events occurring in blood, brain and lung during an induced non infection inflammation in a murine model. Female C57BL6/J mice received an intravenous oleic acid injection (OA) to induce a controlled inflammation. Lung, brain and Peripheral Blood Mononuclear Cell (PBMC) expression patterns were analyzed using a Agilent 60K cDNA mouse microarray; the enrichment of canonical pathways was calculated based on genes differentially expressed using the Ingenuity Pathway program. Our analysis revealed marked changes in pathways involving the immune and inflammatory responses. The inflammatory response was activated 1h30 in lung and 4h in brain after oleic acid injection, showing a high expression level of genes involved in canonical pathways related to inflammation, such as to LXR/RXR receptor, acute phase response and coagulation. In the lung, the second peak of response was observed 4h after OA injection. Strikingly, all the significant pathways identified in brain were also significant in lung, although most of the genes differentially expressed over the time course were different. The inflammatory responses oscillated between pro and anti-inflammatory response in both lung and brain, the time course being, however, different in the two organs. In PBMC, the response appeared only 4h after OA injection and the pathways identified differed from those identified in lung and brain, but the LXR/RXR one.

Keywords: Inflammation, ALI, Brain, PBMC, Lung, Transcriptome

Background

The inflammation is a body's response consecutively to an injury, infection or a trauma, involving the immune system with the pro- and anti-inflammatory components {Robertson, 2006 #5} For example, in intensive care unit, critically ill patients undergo an inflammatory process that can lead to organ dysfunction and eventually death with pathophysiological events similar to those seen in sepsis. Non-infectious systemic inflammatory response syndrome (SIRS) shares many common parameters with sepsis, where a cascade of events is initiated by molecules common to pathogenic, non-pathogenic, and commensal bacteria {Adib-Conquy, 2007 #41}. They are recognized by specific "pattern recognition receptors" (PPRS) that identify also molecular structures associated with cellular stress and death, known as damage associated molecular patterns (DAMPs) as well as conserved pathogen derived structures, or pathogens associated molecular patterns (PAMPs) {Ciraci, #63}. The innate immune system represents a non-specific response that can be activated within minutes. Its respond to a variety of stimuli is central to its function in pathogen clearance and tissue repair based on its ability to distinguish pathogens as "non-self" {Ciraci, #63}. The recent advances in inflammasome biology underline its role in sterile inflammation and triggering of adaptive immune response {Ciraci, #63}, based on the hypothesis that immune system activity stemmed from recognition of and reaction to internal danger signals, rather than from discrimination between self and non-self-molecules (Matzinger P Expert Rev. Clin. Immunol. 8(4), 311–317 (2012), A. Castellheim, Scandinavian Journal of Immunology 69, 479–491, 2009). A recent review concerning the immunosuppression in sepsis that was recently published by Hotchkiss and all (Richard S Hotchkiss, Guillaume Monneret, Didier Payen Lancet Infect Dis 2013;13: 260–68) underlined that patients were unable to eradicate invading pathogens . One of the conclusions was that the degree of immunosuppression that occurs in sepsis, may explain why many previous sepsis trials that were directed at blocking inflammatory mediators or pathogen recognition signalling pathways failed, suggesting that therapies improving host immunity may increase survival. Anyhow, since a part from the response of an organism to infection depends strictly on the immune status and balance of inflammatory response, it is mandatory to perform experiments which could specify the differences between inflammation due to an infectious process and that due to a non-infectious one.

The technological advances in nucleic acid coupled with increased computational capacity provide an opportunity to characterize the determinants of a response to an injury and infection at a genome-wide scale. Thus, a large transcriptome analysis performed on the human circulating leukocyte after severe trauma and burn injury, compared to healthy subjects receiving low-dose bacterial endotoxin, shown that these severe stresses produce a global reprioritization affecting >80% of the cellular functions and pathways, described as an unexpected "genomic storm" (Wenzhong Xiao, J. Exp. Med. Vol. 208 No. 13 2581-2590 2011). The similarities in gene expression patterns between these different injuries reveal an apparently fundamental human response to severe inflammatory stress, with genomic signatures that are surprisingly far more common than different (Wenzhong Xiao, J. Exp. Med. Vol. 208 No. 13 2581-2590 2011). This large scale analysis shown that, in severe blunt trauma, the early leukocyte genomic response is consistent with simultaneously increased expression of genes involved in the systemic inflammatory, innate immune, and compensatory anti-inflammatory responses, as well as in the suppression of genes involved in adaptive immunity (Wenzhong Xiao, J. Exp. Med. Vol. 208 No. 13 2581-2590 2011). As organs failures and infection is a known complication, this study also compared transcriptome between complicated versus uncomplicated clinical recovery, and found that the difference between this two groups is only quantitative, since they observed that there are no new genes or pathway recruited but rather a magnitude of the early response and the time required for expression to return to control values. Thus, the difference is instead in the degree and the duration of the deregulated acute inflammatory response more in agreement with the Non-resolving inflammation hypothesis (Nathan, C., and A. Ding. 2010. *Cell*. 140:871–882.) rather than the second hit paradigm (Wenzhong Xiao, J. Exp. Med. Vol. 208 No. 13 2581-2590 2011), but without excluded the real effect of an infection in this condition.

Human studies have, provided important and descriptive information about the evolution of the physiological and inflammatory changes in the lungs during the acute lung injury (ALI). ALI and its most severe manifestation, the acute respiratory distress syndrome (ARDS), are a clinical syndrome defined by an acute hypoxemic respiratory failure accompanied by bilateral pulmonary infiltrates consistent with oedema and normal cardiac filling pressures [1-3]. This information has led to hypotheses about mechanisms of injury [1-3]. However, these hypotheses have been difficult to test in humans because of too many clinical variables and confounding factors.

Animal models provide a bridge between patients and the laboratory bench [4]. Indeed, despite some limitations, studies using animal models of ALI/ARDS remain essential because, to date, there is no substitute for animal models as a tool to generate information about the pathophysiology of lung injury and to test novel therapeutic interventions in complex biological systems. The oleic acid model (OA) was successfully used in mouse to reproduce ALI and set up a model of lung inflammation [5, 6]. The OA model produces the basic characteristics of ALI: early and rapidly reversible patchy inflammatory lung injury with permeability changes and impairment in gas exchange and lung mechanics [4]. Oleic acid has a direct toxicity to endothelial cells. Endothelial injury is followed by epithelial injury. Injection of OA leads to membrane damage and necrosis [4]. A major advantage of this model is its reproducibility; the administration of the same dose of OA by the same route to different animals is followed by a reproducible pulmonary injury [4].

Following OA injection, the pathophysiological events differ from organ to organ, and between organs and peripheral blood. The cellular compositions of each compartment, the micro-environment, and the leukocyte recruitment rate have an important influence on local inflammation and response [7]. During inflammation, a subtle balance exists between pro- and anti-inflammatory, and the time-dependent balance is the consequence of a complex network of up- and down-regulating signals. It has been previously shown that the gene expression patterns were significantly different when studied simultaneously in two different organs during inflammation, as shown by a study comparing Peripheral Blood Mononuclear Cells (PBMC) and spleen immune cell functions in a murine burn model [14]. In the central nervous system (CNS), inflammation may appear as a result of local insult or as part of the systemic immune response. In brain, glial cells, especially microglia and astrocytes can induce and also regulate and are themselves regulated by inflammatory immune response (Finsen and Owen 2011). This inflammation in brain has been found following sepsis, malarial infection, surgery, burn, organ injury and had also observed in chronic illness like diabetes, obesity and rheumatoid arthritis. It is also a component of neurodegenerative diseases, such as Alzheimer's disease, multiple sclerosis and Parkinson's disease. Nevertheless, the mechanism underlying the passage of inflammation from the periphery into the CNS remains unclear (Fung et al 2012). These studies show the need to consider gene expression in blood and different organs simultaneously. Indeed, the inflammation status observed at the PBMC level alone in organisms undergoing lung inflammation does not allow for correct assessment of the inflammatory status of each organs of the whole organism. The actual immune status at the tissue level has to be taken into consideration.

We have previously characterized changes in gene expression over time following OA-induced lung inflammation [5]. Gene expression patterns in lung were analyzed using a 9900 cDNA mouse microarray (MUSV29K) and a set of 1000 genes whose expression level significantly changed during a 24h time-course was identified. Subsequent functional annotation allowed us to find pathways related to pro- and anti-inflammatory stages.

In the present study, our first objective was to use the OA-induced ALI model previously described [5] to characterize lung, blood and brain inflammation, using a transcriptional approach to visualize the expression variation and pathway involved during the inflammation wave. In doing so, we provided an important database for future transcriptional studies of diseases associating inflammation. The second

objective is to compare the expression profile and pathways commonly activated or repressed in blood, lung and brain during the sterile inflammation activation/repression time courses, in order to set up a tool to analyse precisely the effect of an infection in a second hit.

Results and discussion

- *Experimental design*

We choose to work on Wild-type female C57Bl/6J mice, 7 weeks old, based on previous studies related to their transcriptional response to pathogens [5, XX PR plasmodiumPR 2006/2007]. We took in count that strain of mice may affect the transcriptome response, as shown by Cavrra et al [39]. We studied 32 mice divided into 6 groups. Each group was identified according to the incubation time: 1h, 1h30, 3h, 4h, 18h and 24h including mice injected with physiological serum or OA (figure 1). During our previous work, we had identified in this strain the OA incubation time corresponding to the pro- and the anti-inflammatory stages [5]. We found that, in the lung, the pro-inflammatory stage occurred 1h to 1h30 after OA injection, and that the anti-inflammatory stage reached a maximum level 18h to 24h after OA injection. The response to the OA administration was also followed by a transitional prostration of the mice, occurring 1h30 after injection and lasting for several hours. The mice came to a standstill in one corner of the cage and started shivering. The survival rate was 100% after 24h incubation. Since we used the same protocol as previously set up in the OA-induced ALI model described in [5], we confirmed here that we induced ALI in mice.

- *Identification of differentially expressed genes during the inflammatory waves*

After RNA extraction of PBMC, brain and lung of each treated mouse, we performed a microarrays analyzed in order to study transcriptional changes associated with the lung, brain and PBMC inflammatory process following the flow chart summarized in figure 2. We searched for a set of genes differentially expressed in these tissues at different incubation times after adjusting for the effect of liquid injection. To this purpose, we used the multi-class Significant Analysis of Microarrays (SAM) procedure [15], applying a false discovery rate of 0% (figure 2 and figure sup 1), yielding 1520, 960 and 437 significant probes in PBMC, lung and brain, respectively. Those probes corresponded to 821, 495 and 212 genes in PBMC, lung and brain, respectively (figure 2 and tables sup1, sup2 and sup3).

Figure 3 shows the Venn diagram, *i.e.* the number of common genes between the three compartments and the one of specific genes. Unexpectedly, none of genes of our selection was found commonly modulated in our three compartments, and we found only 34, 24 and 6 genes commonly modulated between brain-lung, lung-PBMC and brain-PBMC respectively.

We also performed unsupervised hierarchical clustering of these selected group of genes based on the similarities of their expression profiles over the time-course (figure sup1). The Cluster software [16] classified these genes on their expression profile into 8 clusters for PBMC and 6 clusters for lung and Brain (figure sup1).

- *Identification of time-dependent pathways inflammation*

To get a comprehensive overview of functional patterns during the inflammation progress in PBMC, lung and brain, a bioinformatics-based analysis using ingenuity Pathway Analysis software (IPA; Ingenuity Systems, www.ingenuity.com) associated with manual and literature-based analysis was carried out to characterize different signatures. This was done by combining most informative canonical pathways identified using IPA, genes having the strongest association with the inflammation phenotype. Among the clustered identified by HCL, the IPA analysis with a FDR of 5% identified the most significant clustered in each transcriptome analysis leading to one cluster, number 2 for lung, number 1 for brain and two cluster number 2 and 4 for the PBMC (figure 4). The sup table 4 provides a list of genes belonging to the clusters from Figure 4 and selected for the functional annotation (table sup 4). Table 1 shows the ingenuity

canonical pathways identified with their P value. Among the 32 canonical pathways with a significant p value (FDR5%) found in the lung cluster, sixteen are highly significant (up to 10^{-6}). All the significant canonical pathways (n=16) found in the brain cluster were included in selected lung pathways, among them 11 being highly significant (up to 10^{-6}). Among the common genes between brain and lung, 21 out of 34 belonged to the LXR/RXR activation pathway; the acute phase response signalling and the coagulation system (see figure 5-7 and table1). Astoundingly, we found only 5 significant canonical pathways in PBMC, which showed modest P values. Only the LXR/RXR canonical pathway, which corresponded to the cluster 2, was detected in blood, lung and brain (table 1, 2).

In table 2, among the selected canonical pathways, we focused on some of them and grouped in three main categories: acute response grouping 5 canonical pathways (LXR/RXR activation, acute phase response signalling, LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR Function, atherosclerosis signalling and PXR/RXR activation); coagulation system grouping 4 canonical pathways (coagulation system, intrinsic and extrinsic prothrombin-activation pathway and clathrin-mediated endocytosis signalling); and macrophage activities grouping 2 canonical pathways (IL-12 signalling and production in macrophages and production of nitric-Oxide and reactive oxygen species in macrophages) (table 2-a). 21 genes out of 83 of the brain cluster 1, 20 genes out of 186 of the lung cluster 2, and 6 genes out of 242 of the PBMC cluster 2 participate respectively at the identification of these 3 main categories. Seven genes identified in brain and lung belonged to the 3 main categories (Alb, Apoa1, Apob, Apoc1, Apoc3, Apof, Pon1), seven others genes (Cyp4a14, Fabp1, Fga, Fgb, Fgg, F2 and Kng1) belonged to acute response and coagulation system categories, and seven belonged to only the coagulation system in brain and lung compartments, and twenty three belonged only to the acute response in our three compartments (lung, Brain and PBMC). (table 2-b)

Amongst the significant canonical pathways grouped in acute response, only the activation of the LXR / RXR heterodimer pathway (Liver X receptors / Retinoid X receptors) was considered significant in lung, brain and PBMC with p values 10^{-20} , 10^{-16} and 10^{-3} , respectively. The second most significant pathway in the brain and the third in the lung (p value 10^{-15} in both organs) was the acute phase response triggered non-specifically aggression inflammatory response (figure 5 et 6), and the third most significant pathway, second in lung and fifth in brain with a p value of 10^{-16} and 10^{-8} respectively, was the coagulation system.

Among the twenty nine genes supporting the identification of LXR / RXR pathway, eight genes were found common in the lung and brain (Ahsg, Alb, Apoc1, Ambp, Gc, Hpx, Kng1, and serpina1) (figure 5). Many studies have shown the role of this nuclear receptor in the regulation of lipid metabolism as well as that of inflammation (Ogawa et al 2005).

The LXR/RXR activation, which was common to the three compartments studied, regulates the expression of genes involved in inflammation, **innate and adaptive immune responses, apoptosis, and phagocytosis**. LXRs involve the regulatory process of macrophages and other immune cells (**Liu and al 2012 – ogwa and all, 2005 – joseph and al, 2003 à vérifier**). As anti-inflammatory transcription factors, it was suggested that this is a consequence of transcriptional silencing of the pro inflammatory transcription factor nuclear factor (NK-kB) (zelcer and al 2006 // jakonsson and al 2012).

The acute phase response pathway, which is triggered by interleukin 6, IL- 1b and TNF, was the second most significant pathway in the brain and the third in the lung. In our results, 8 common transcripts involved in this pathway were found regulated over the time in these two organs (Figure 6). Such response occurs in the early time after infection, tissue injury or stress (Gabay et al 1999), and is transient. It is likely that the same components (APP : Acute Phase Protein) are involved in both the acute phase and the chronic diseases associated with inflammation (Venteclef et al 2011). Numerous studies have focused on the functions and regulation of some of the proteins involved in the response, such as CRP , serum amyloid A (SAA) , haptoglobin (HP) , plasminogen activator inhibitor 1 (PAI -1) and fibrinogen (Box 1). Our results, revealed the presence of transcripts corresponding to genes proteins SAA and HP in the brain. These genes appeared to be particularly involved at several levels of the inflammatory process but also have an important role in the metabolic changes that occur during infection (Venteclef et al 2011).

In the coagulation pathway, among the eleven genes supporting the identification of this pathway only five were identified in brain and common with lung (Fgb, Fgg, Kng1, Serpina1, Serpinc1) (Figure 7)

The major factor triggering the coagulation is the presence of tissue factor may be expressed on the surface of many cells such as endothelial cells and monocytes after stimulation by cytokines. There is cross-talk between inflammation and coagulation systems whereby inflammation leads to activation of coagulation, but coagulation also considerably affects inflammatory activity. Activation of coagulation and fibrin deposition as a consequence of inflammation and can be viewed as an essential part of the host defence of the body, and can be considered to an effort of organism to limit invading entity and the consequent inflammatory response to a limited area (Levi et al 2013). May be that the strong activation of the coagulation system limits the inflammatory response to tissue such as the lung and brain, leading to a limited inflammation response in blood. An exaggerated or insufficiently controlled response may lead to a situation in which coagulation and thrombosis contribute to disease. For example, the occurrence of systemic coagulation activation in combination with microvascular failure that results from the systemic inflammatory response to severe infection or sepsis and that contributes to multiple organ dysfunctions (Levi et al 1999). In the other way, coagulation factors (such as thrombin or activated protein C) may activate specific cell receptors on mononuclear cells or endothelial cells, which may affect, for example, cytokine production or inflammatory cell apoptosis (Levi et al 2013).

- Chronology of the inflammatory response

The kinetic of the major pathway involved in acute response, the coagulation system and the macrophage activities selected in the table 2, are summarised in figure 8a. In Lung as in Brain the response wave of the whole pathway were similar in each organ with a time shift in brain to reach the higher expression response at 4h. Indeed, the first higher response in lung was obtained at 1h.30 after OA injection, then a second one was at 4h after a strong down regulation consequence of the anti-inflammatory response. Thus, the balance between pro-and anti-inflammatory seems to oscillate to come back to the normal homeostasis at 24 hours. Conversely, in brain we observed a progressive response to OA injection starting at 1h30 to reach the pic at 4h and coming down rapidly to reach an anti-inflammatory pic at approximately 18h, come back to the normal homeostasis around 24h with a tendency to increase again following an oscillation effect. We observed that the slope of the curve which signed the release of anti-inflammatory then pro-inflammatory molecules, underlined a very strong effect of these responses. In addition, a certain level of pro-inflammatory must be reach to switch-on the anti-inflammatory response, which is then rapid and strong (a steep slope) leading to a second wave of pro-inflammatory response with a slop proportional to this "new" danger signal to progressively come back to the normal homeostasis. In brain, the delay to get the first response to OA injection is probably the effect of the blood-brain barrier or the result of a two steps responses obtained by a tight control of the inflammatory components release at the beginning to avoid a strong anti-inflammatory kickback. Indeed, it is traditionally considered that the Blood-Brain barrier is an impermeable membrane (Barker and Billingham, 1977). Nevertheless, accumulating studies showed the involvement of CNS in response to both acute and chronic peripheral disease (Dantzer 2004, Emmer et al 2009).

Curiously, the only common pathway found between lung, brain and PBMC, is the LXR/RXR activation pathway, which do not responses like in lung and brain (figure 8b). Indeed, we do not observe a significant response to the OA until 3h where the expression of this pathway in lung is the lowest. Then, at the highest expression level of this pathway (4h) in lung and brain, we observed the lowest response in PBMC. Interestingly, during the last phase from 4h to 24h the expression of this pathway increased at a similar speed that the one observed in brain.

The coagulation system was suppressed 1h after injection of oleic acid in the two organs and seems to follow the same mechanism of balance in the lung and the brain like the pathway of LXR / RXR activation. As for the activation pathway of LXR / RXR in the lung, the coagulation system responded quickly, 1h30 after injection of oleic acid and likely oscillated to reach the equilibrium.

The acute phase response was highly overexpressed at 1h30 in the lung to cope with the tissue injury caused by the injection of oleic acid and also followed the same pendulum to return to equilibrium. In the brain, we also observed the activation of this pathway, which was as intense at 4h as that of the lung at 1h. This underlines once again that the blood-brain barrier delays or protects against an inflammatory response that can be harmful if not or poorly controlled (Anthony et al 2012). Unlike the brain, the lung is a trade organ that reacts quickly and strongly against aggression. Nevertheless, its response to a small-scale aggression caused by oleic acid dose is regulated, and the mice fully recovered.

4- Conclusion

In this study, we assessed gene expression profiles in mouse lung, brain and PBMC associated with a lung inflammation during a 24h time-course. Overall, our microarray analysis provides a global and detailed overview of critical transcriptional events occurring in blood, brain and lung. The analysis of gene functional annotation revealed several major features. First, many genes were up or down regulated over the time in lung, brain, and blood. Second, the analysis revealed pathways clearly related to inflammation mainly in lung and brain; this confirms previous results in lung (Lesur et al), and provides new ones in brain, indicating a strong inflammation in the brain, and a limited inflammation in the blood; this indicates that blood gene expression profiles poorly reflect those observed in lung and brain. Third, all the pathways identified in the brain were also identified in the lung, although a few common genes were characterized; it should also be stressed that there was a delay response in the brain. Further experiments should be performed to compare the transcriptional response of mice injected with OA and the one of mice infected by pathogens, such as bacteria or Plasmodium; this should lead to identify genes related to inflammation related to a non-infectious process and those related to an infectious process. In addition, our results may help in assessing the effect of pre-existing non-infectious inflammation in mice infected by pathogens causing lung or brain pathology.

Materials and Methods

5.1 – Experimental groups

Wild-type female C57Bl/6J mice, 7 weeks old, were obtained from Janvier and housed in a specific pathogen-free animal facility. C57Bl/6J mice have been chosen because it is the most widely used inbred strain. We studied 32 mice divided into 6 groups (figure 1). Each group included three or two mice given physiological serum and 3 mice given OA. Each group was identified according to the incubation time: 1h, 1h30, 3h, 4h, 18h and 24h. During our previous work, we defined our time-points on lung expression profiles during inflammation, by performing real-time PCR on TNF α , Il10, Il4 and Il6 to identify the OA incubation time corresponding to the pro- and the anti-inflammatory stages [5]. All experimental procedures involving animals were approved by the veterinary office of the Ministry of Agriculture, France (authorization number: 13-27).

5.2- Injections

Female C57Bl/6J mice were anesthetized with 5% Xylazine – 20% Ketamine (0,1ml/10g). We injected 200 μ l of physiological serum in the control mouse at each time-point and 200 μ l of OA (1,2 μ l/g body weight, sigma #27728-1L-R) in the other 18 mice of our study. Administration of physiological serum and OA was done through the tail vein with a 0.3-ml insulin syringe (BD #320837).

5.3- Blood sampling and PBMC isolation

Each group of mice was sacrificed 1h, 1h30, 3h, 4h, 18h or 24h after injection of OA or physiological serum by exsanguination through the eye vein. 200 to 900 μ L of whole blood was collected in tubes containing

100µL EDTA 0.5M. PBMC were isolated using a ficoll gradient 1.084 (Ficoll-Paque Premium 1.084, GE Healthcare #17-5446-02). Cells were resuspended in 500 µL PBS and counted, allowed us to recover an average quantity of 1.9×10^6 PBMC for 600 µl of blood.

5.4- RNA extraction

Total RNA from PBMC was isolated using the Mouse RiboPure-Blood RNA isolation kit (Ambion, #AM1951). Total RNA from brain and lung were isolated using trizol. The quality of RNA was confirmed on the Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent, #G2938C) using the RNA 6000 Nano chips (Agilent, #5067-1511), and the concentration of RNA was determined by reading absorbance at 260/280 nm.

5.5- Microarray design

Sample amplification, labeling, and hybridization essentially followed the one-color microarray-based gene expression analysis (low input quick amp labeling) protocol (version 6.5, May 2010) recommended by Agilent Technologies. In brief, 200 ng (brain and lung sample) or 25 ng (PBMC sample) of 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 hr. Hybridization was performed into whole mouse genome microarray slides (8×60K G4852A, Agilent Technologies, Santa Clara, CA) containing 62,976 oligonucleotide probes at 65°C for 17 hr. 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). The microarray data are available from the Gene Expression Omnibus [41] (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

5.6- Microarray data acquisition and analysis

Ninety six mRNA samples (one per blood, brain and lung for each mouse) from thirty two mice were run individually on 96 microarrays. All microarrays were done at our core facility [42]. After image acquisition, data were processed as described in figure 1. Quantile normalization was applied to sample data to correct for global intensity and dispersion.

Microarray data were statistically analyzed using the TIGR MeV (MultiExperiment Viewer) V4.3.01 software [46]. First, we adjusted the levels of gene expression for the effect of liquid injection; in other words, we subtracted the median of gene expression value observed in mice injected with physiological serum from each gene expression value observed in mice treated by OA. Significant Analysis of Microarrays (SAM) procedure was further applied to look for time specific variation in gene expression in the dataset [15]. At each time-point, gene expressions in control samples (physiological serum injection) were subtracted from gene expressions in OA samples.

Before partitioning the genes, we performed a hierarchical clustering of the samples in TMEV V4.3.01 using average linkage clustering metrics and Pearson correlation for the distance. This analysis partitioned the samples into 6 groups: group 1 (1h), group 2 (1h30), group 3 (3h), group 4 (4h), group 5 (18h) and group 6 (24h). Hierarchical clustering (average linkage clustering metrics and Pearson correlation for the distance) was then applied to the genes using the Cluster software and results were visualized with the Treeview software [16]. We identified biological annotations for the clusters using IPA (Ingenuity Pathways Analysis), which represents a tool providing curated information from the literature for human, mouse and rat models about canonical pathways, regulated transcription factors and their targets, and possibly regulated molecular networks, including signal transduction cascades (of which some contribute to human cancer and other diseases) [www.ingenuity.com].

PBMC – Lung - Brain

C57BL6/J femelle of 7 weeks old

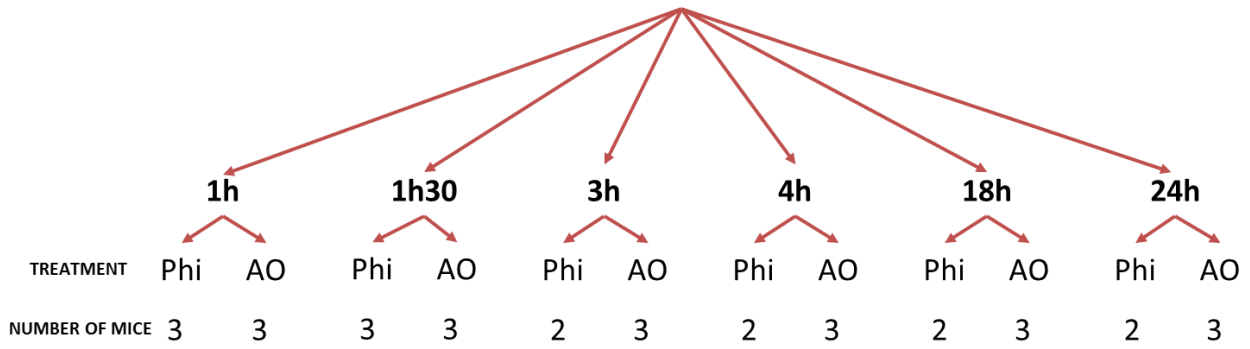


Figure 1: Experimental design of the experiment.

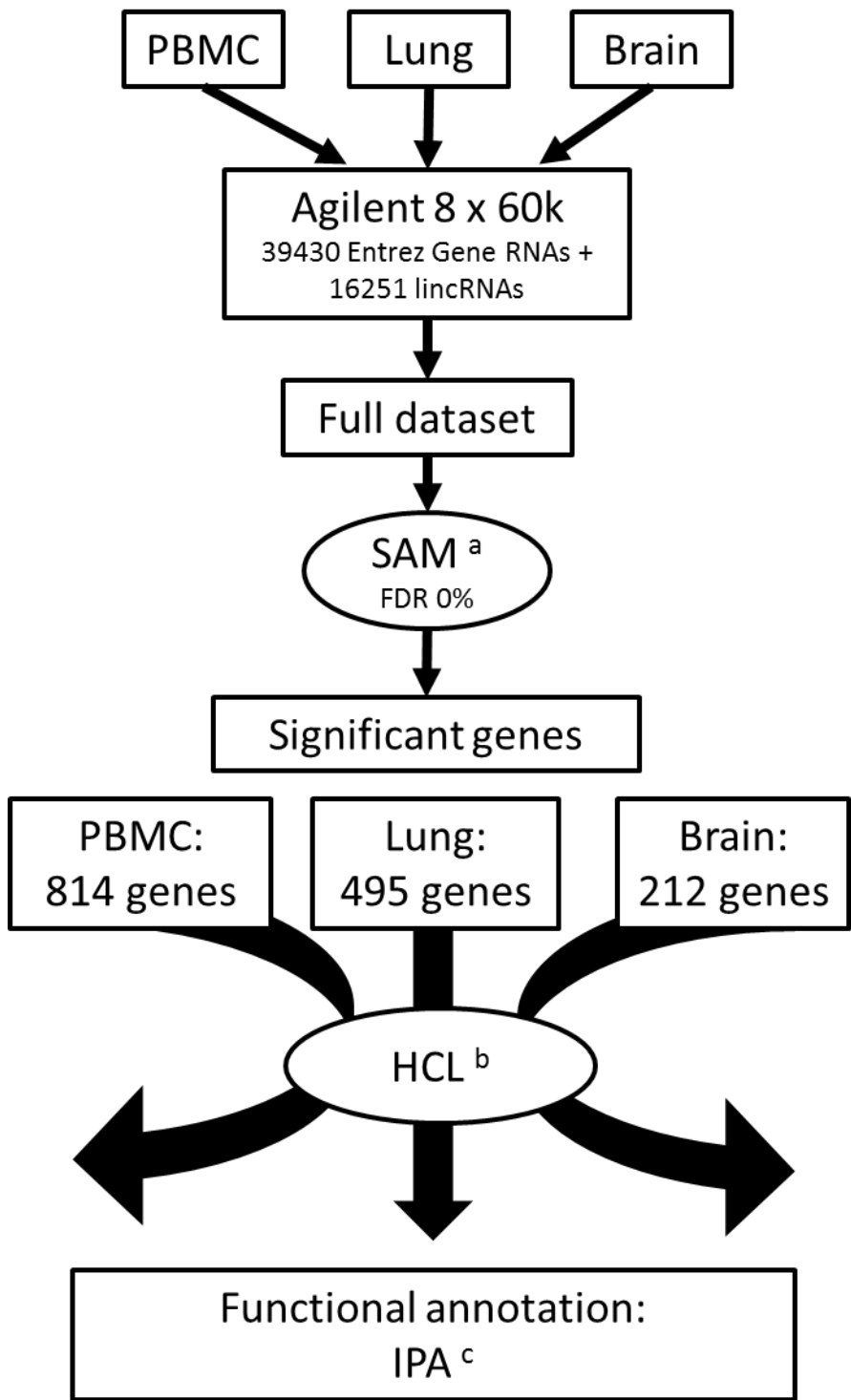


Figure 2: Schematic outline of data analysis.

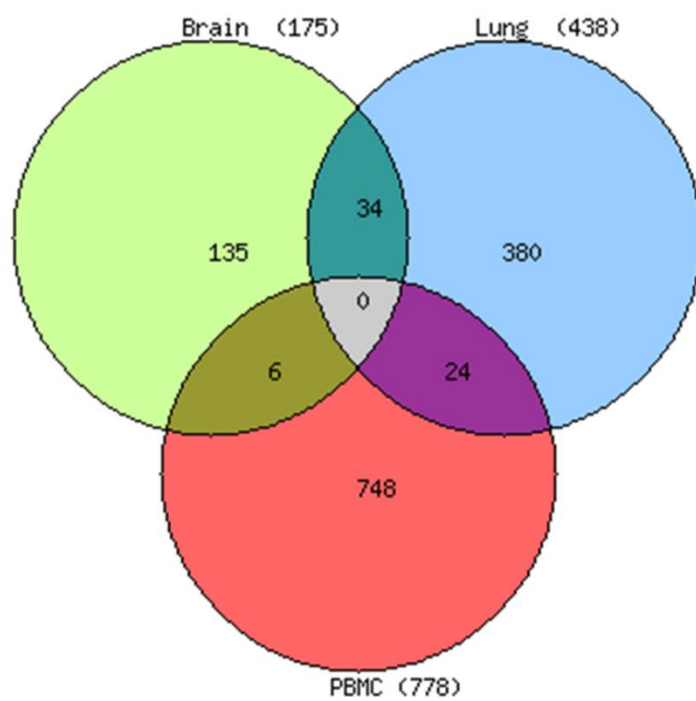


Figure 3: Venn diagram

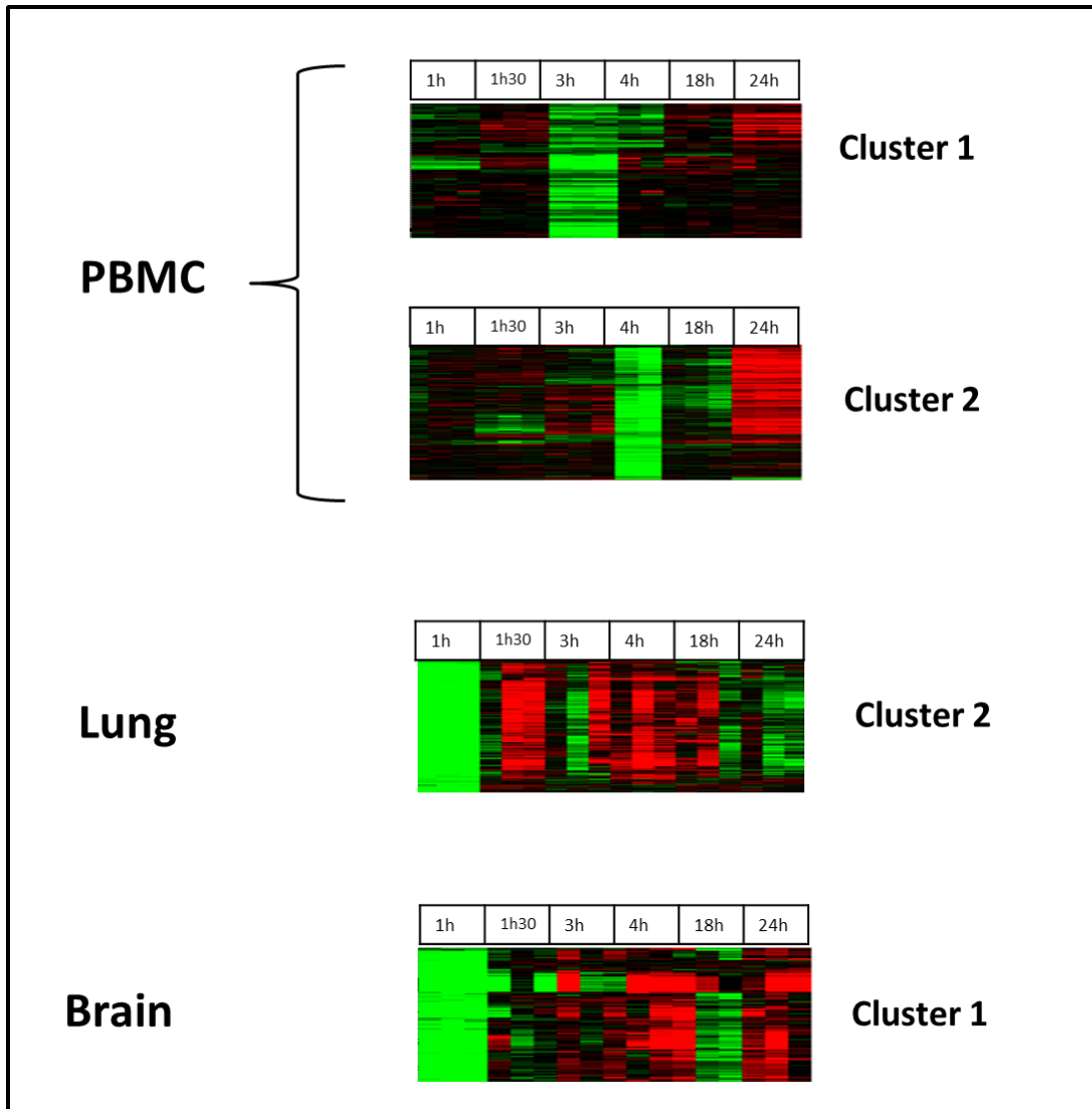
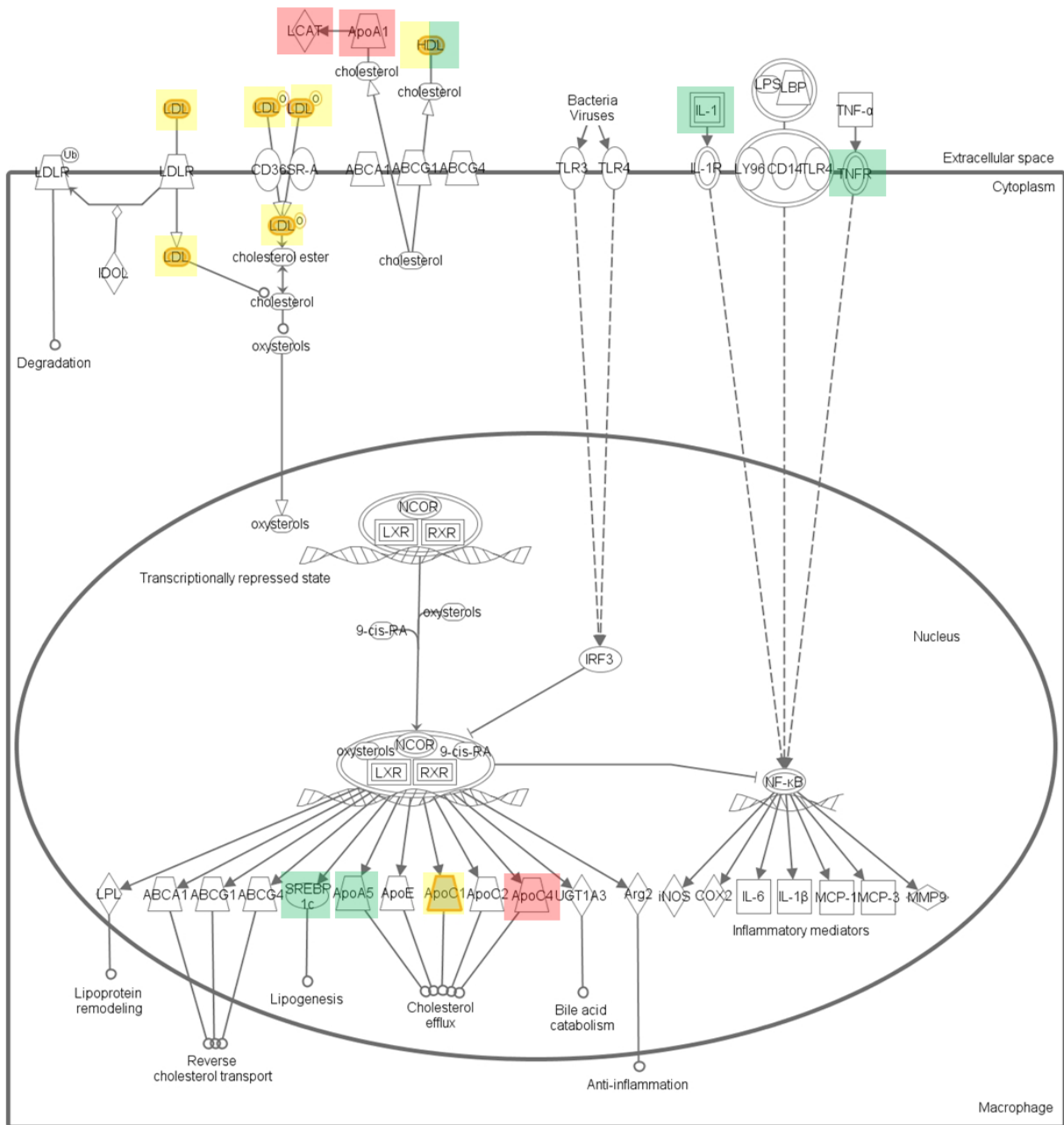


Figure 4: Cluster selected after correction of multitesting of functional IPA annotations.



Brain

APOC1	KNG1	PON1	ALB	HPX	C3	ITIH4	SAA1	AHSG	AMBP	SERPINA1	GC
-------	------	------	-----	-----	----	-------	------	------	------	----------	----

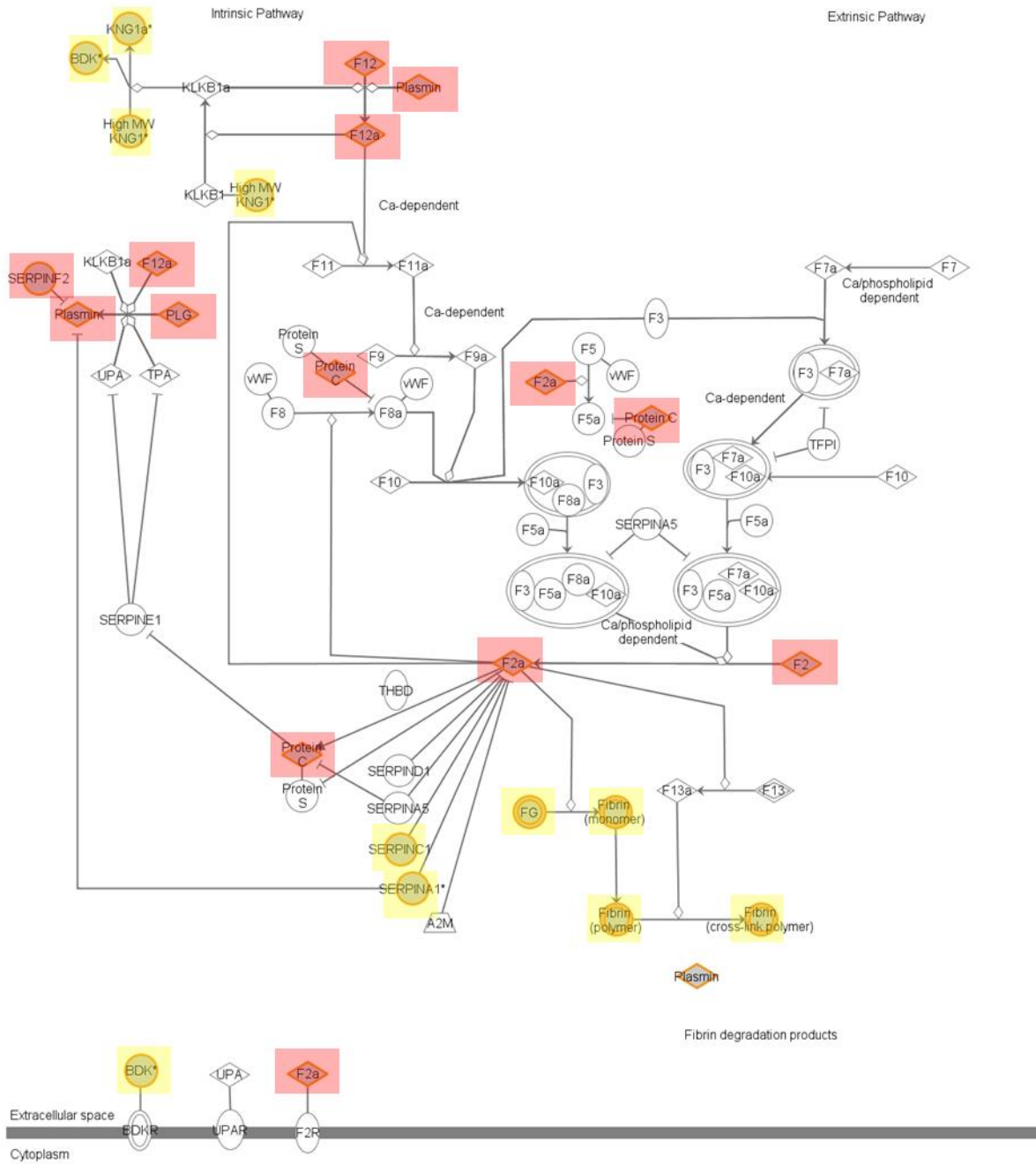
Lung

TTR	HPX	APOB	APOH	APOA1	APOF	VTN	APOC4	AHSG	AMBP	SERPINF2	APOC1
KNG1	ALB	LCAT	APOC3	SERPINA1	FGA	GC					

PBMC

SREBF1	TNFRSF1A	NGFR	APOA5	IL1F10	PLTP
--------	----------	------	-------	--------	------

Figure 5: Canonical pathway of LXR/RXR activation.



© 2000-2012 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

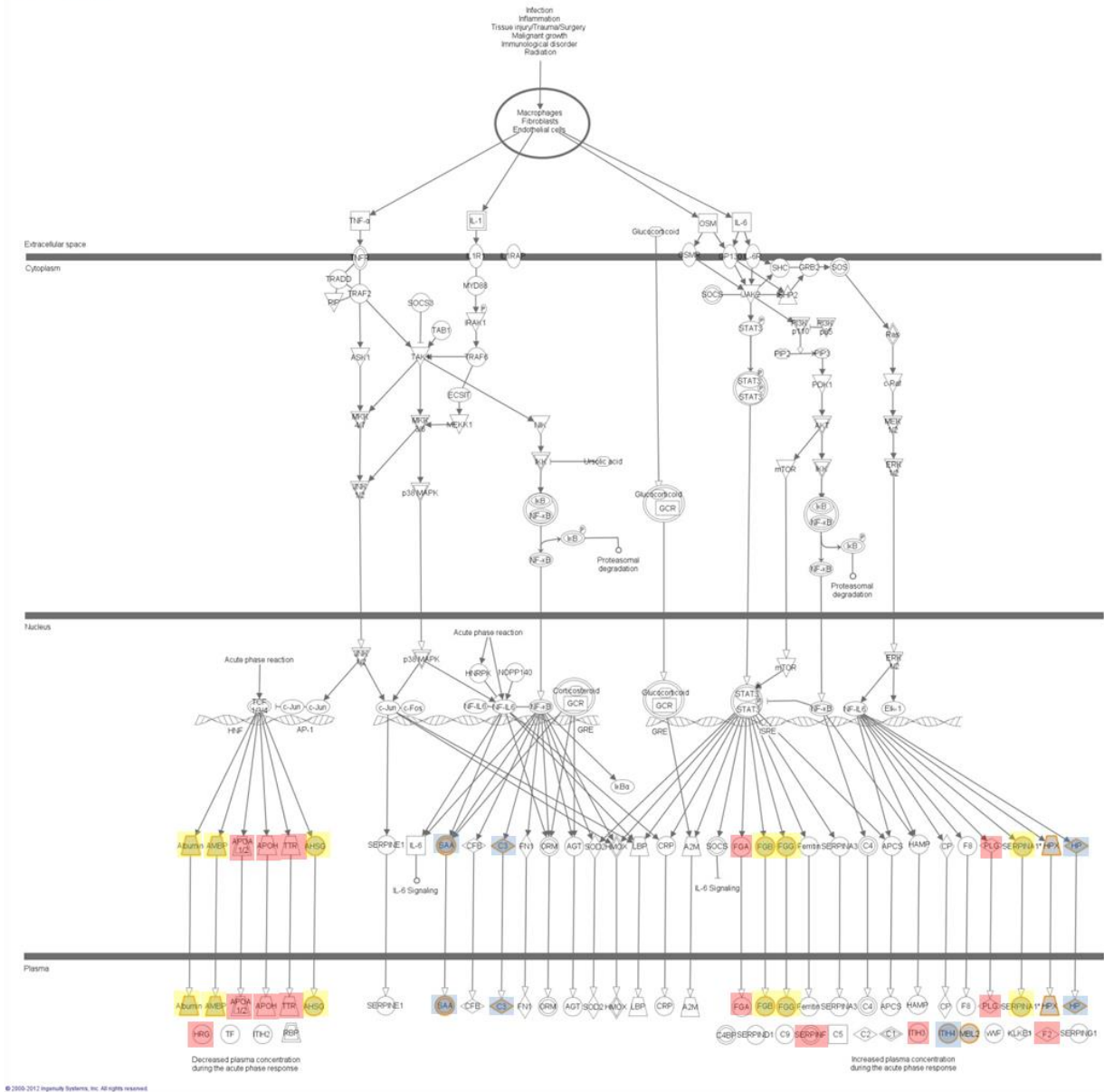
Brain

FGB	FGG	KNG1	SERPINA1	SERPINC1
-----	-----	------	----------	----------

Lung

F12	F2	FGA	FGB	FGG	KNG1
PLG	PROC	SERPINA1	SERPINC1	SERPINF2	

Figure 7: Canonical pathway of coagulation system.



Lung

AHSG	ALB	AMBP	APOA1	APOH	F2	FGA	FGB	FGG	HPX	HRG	ITIH3	MBL2	PLG	SERPINA1	SERPINF2	TTR
------	-----	------	-------	------	----	-----	-----	-----	-----	-----	-------	------	-----	----------	----------	-----

Brain

AHSG	ALB	AMBP	C3	FGB	FGG	HP	HPX	ITIH4	MBL2	SAA1	SERPINA1
------	-----	------	----	-----	-----	----	-----	-------	------	------	----------

Figure 6: Canonical pathway of acute phase response signaling.

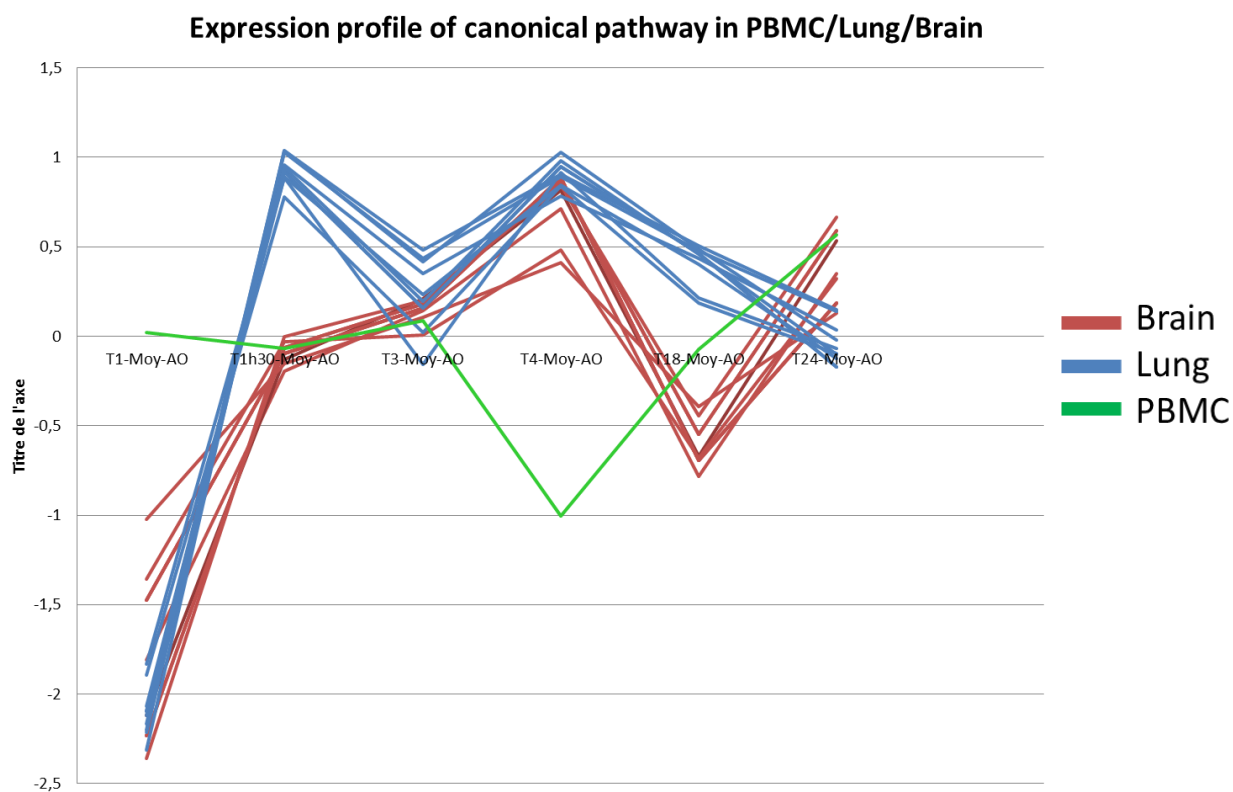


Figure 8: Expression profile of canonical pathway in PBMC, lung and brain.

In PBMC we show LXR/RXR Activation pathway. In the lung and brain we observe the expression profile pathways: Acute Phase Response Signaling, Clathrin-mediated Endocytosis Signaling, Coagulation System, Extrinsic Prothrombin Activation Pathway, IL-12 Signaling and Production in Macrophages, Intrinsic Prothrombin Activation Pathway, LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function, LXR/RXR Activation, Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages, PXR/RXR Activation

Ingenuity Canonical Pathways	p-value		
	Lung	Brain	PBMC
LXR/RXR Activation	1,26E-20	2,00E-16	1,26E-03
Coagulation System	2,51E-16	2,24E-08	
Acute Phase Response Signaling	1,58E-15	7,94E-15	
Nicotine Degradation III	6,31E-14	2,63E-08	
Melatonin Degradation I	2,51E-13	5,01E-08	
Nicotine Degradation II	5,01E-13	7,08E-08	
Estrogen Biosynthesis	6,31E-13	2,57E-10	
Bupropion Degradation	6,31E-13	1,91E-09	
Acetone Degradation I (to Methylglyoxal)	2,00E-12	3,55E-09	
Extrinsic Prothrombin Activation Pathway	6,31E-12	8,51E-06	
Intrinsic Prothrombin Activation Pathway	1,00E-11	7,24E-07	
Atherosclerosis Signaling	7,24E-09	2,19E-04	
LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function	3,39E-07	1,91E-05	
FXR/RXR Activation	4,27E-06		
IL-12 Signaling and Production in Macrophages	4,27E-06	3,89E-04	
Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	4,79E-06	1,20E-03	
Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	4,17E-05	1,26E-03	
Complement System	8,32E-05		
PXR/RXR Activation	1,26E-04	7,76E-04	
Xenobiotic Metabolism Signaling	1,58E-04		
Histidine Degradation III	2,00E-04		
Histidine Degradation VI	2,00E-04		
Methylglyoxal Degradation III	2,82E-04	1,07E-03	
Urea Cycle	3,31E-04		
Retinol Biosynthesis	7,08E-04		
Role of Tissue Factor in Cancer	8,71E-04		
PPAR α /RXR α Activation	1,17E-03		
Methionine Salvage II (Mammalian)	1,62E-03		
Retinoate Biosynthesis I	1,91E-03		
Wnt/ β -catenin Signaling			9,77E-04
NF- κ B Signaling			1,91E-04
Hepatic Fibrosis / Hepatic Stellate Cell Activation			3,55E-04

Table 1 :

a	LXR/RXR Activation Acute Phase Response Signaling LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function Atherosclerosis Signaling PXR/RXR Activation	*	acute response
	Coagulation System Intrinsic Prothrombin Activation Pathway Extrinsic Prothrombin Activation Pathway Clathrin-mediated Endocytosis Signaling	\$	coagulation system
	IL-12 Signaling and Production in Macrophages Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages	#	macrophage activities

b	Brain Cluster 1		Lung Cluster 2		PBMC Cluster 2	
	Alb	* \$ #	Alb	* \$ #	Apoa5	*
	Apoc1	* \$ #	Apoa1	* \$ #	Il1f10	*
	Pon1	* \$ #	Apob	* \$ #	Ngfr	*
	Kng1	* \$	Apoc1	* \$ #	Pltp	*
	Cyp4a14	* \$	Apoc3	* \$ #	Srebf1	*
	Fabp1	* \$	Apof	* \$ #	Tnfrsf1a	*
	Fgb	* \$	F2	* \$		
	Fgg	* \$	Fga	* \$		
	Ahsg	*	Kng1	* \$		
	Ambp	*	Abcb11	*		
	C3	*	Ahsg	*		
	Gc	*	Ambp	*		
	Hp	*	Apoh	*		
	Hpx	*	Sult2a1	*		
	Itih4	*	Gc	*		
	Mbl2	*	Hpx	*		
	SERPINA1	*	Lcat	*		
	Cyp2b10	\$	Plg	\$		
	Cyp2c29	\$	Proc	\$		
	Cyp3a11	\$	F12	\$		
	Serpinc1	\$				

Table 2

Acknowledgements

We thank Valérie Gall for technical support and Aurélie Bergon for informatics support. This work was supported by grants from Conseil Régional Provence Alpes Côte d'Azur, Société Française.

References

- [1] Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE (1967) Acute respiratory distress in adults. *Lancet* 2: 319-323.
- [3] Dushianthan A, Grocott MP, Postle AD, Cusak R (2011) Acute respiratory distress syndrome and acute lung injury. *Postgrad Med J* 87(1031):612-622.
- [4] Matute-Bello G, Frevert CW, Martin TR (2008) Animal models of acute lung injury. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 295: L379-399.
- [5] Lesur I, Textoris J, Lorigod B, Courbon C, Garcia S, Leone M, Nguyen C (2010) Gene expression profiles characterize inflammation stages in the acute lung injury in mice. *PLoS One* 5(7):e11485.
- [6] Li J, Li G, Hu JL, Fu XH, Zeng YJ, Zhou YG, Xiong G, Yang N, Dai SS, He FT (2011) Chronic or high dose acute caffeine treatment protects mice against oleic acid-induced acute lung injury via an adenosine A2A receptor-independent mechanism. *Eur J Pharmacol.* 654(3):295-303.
- [7] Cavaillon JM, Annane D (2006) Compartmentalization of the inflammatory response in sepsis and SIRS. *J Endotoxin Res* 12(3):151-70.
- [14] Schwacha MG, Schneider CP, Chaudry IH (2002) Differential expression and tissue compartmentalization of the inflammatory response following thermal injury. *Cytokine* 17: 266-274.
- [15] Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 98: 5116-5121.
- [16] Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95: 14863-14868.
- [39] Cavarra E, Fardin P, Fineschi S, Ricciardi A, De Cunto G, Sallustio F, Zorzetto M, Luisetti M, Pfeffer U, Lungarella G, Varesio L (2009) Early response of gene clusters is associated with mouse lung resistance or sensitivity to cigarette smoke. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 296(3):L418-29.
- [41] GEO repository. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>
- [46] TMeV: <http://www.tm4.org/mev.html>

8- Figure Legends

Figure 1: Experimental design of the experiment.

We studied 32 mice C57BL6/J, female, 7 weeks old. We divided these mice into 6 groups based on the incubation time (1h, 1h30, 3h, 4h, 18h, and 24h). In each group, mice are divided into 2 subgroups depending on the injection: OA or physiological serum. 32 samples have been hybridized on microarray for each organ, brain, lung and PBMC. We performed 96 hybridizations.

Figure 2: Schematic outline of data analysis.

^a We compared gene expression between six groups: 1h / 1h30 / 3h / 4h / 18h / 24h.

^b HCL: Hierarchical Clustering

^c IPA: Ingenuity Pathways Analysis

We considered the full dataset for each organ to identify genes significantly differentially expressed between the six classes previously described. The genes identified with SAM have been clustered using the Cluster software and each cluster was independently functionally annotated using IPA.

Figure 3: Venn diagram

We compared the lists without duplicate genes between each organ.

No gene is found in the three organs and a little number (6,24 and 34) were respectively found between brain-PBMC, lung-PBMC and brain-lung.

Figure 4: Cluster selected after correction of multi-testing of functional IPA annotations.

Cluster 1 and 2 of PBMC contain 37 and 242 genes respectively. Cluster 1 of brain contains 83 genes. Cluster 2 of lung contains 186 genes.

Figure 5: Canonical pathway of LXR/RXR activation.

We represent genes present in this pathway and in our results. Yellow is the genes present in lung and brain. Blue is a genes present only in brain, red is the genes only present in lung and green is the genes present in PBMC

Figure 6: Canonical pathway of acute phase response signaling.

We represent genes present in this pathway and in our results. Yellow is the genes present in lung and brain. Red is a genes present only in lung and blue represent genes present only in brain.

Figure 7: Canonical pathway of coagulation system.

We represent genes present in this pathway and in our results. Yellow is the genes present in lung and brain. Red is a genes present only in lung.

Figure 8: Expression profile of canonical pathway in PBMC, lung and brain.

In PBMC we show LXR/RXR Activation pathway. In the lung and brain we observe the expression profile pathways: Acute Phase Response Signaling, Clathrin-mediated Endocytosis Signaling, Coagulation System, Extrinsic Prothrombin Activation Pathway, IL-12 Signaling and Production in Macrophages, Intrinsic Prothrombin Activation Pathway, LPS/IL-1 Mediated Inhibition of RXR Function, LXR/RXR Activation, Production of Nitric Oxide and Reactive Oxygen Species in Macrophages, PXR/RXR Activation

Table 1 : Canonical pathway obtained through IPA for genes present in all clusters after multi-testing correction (FDR 5%). In red common canonical pathways between lung and Brain.

Table 2: **a** : Canonical pathway grouped into three major pathways acute response grouping 5 canonical pathways (LXR/RXR activation, acute phase response signalling, LPS/IL-1 mediated inhibition of RXR Function, atherosclerosis signalling and PXR/RXR activation); coagulation system grouping 4 canonical pathways (coagulation system, intrinsic and extrinsic prothrombin-activation pathway and clathrin-mediated endocytosis signalling); and macrophage activities grouping 2 canonical pathways (IL-12 signalling and production in macrophages and production of nitric-Oxide and reactive oxygen species in macrophages).

b : Genes belonging to the three major pathways identified in a.

A

Figure sup1: Unsupervised hierarchical clustering of 1520, 960 and 437 significant probes in PBMC, lung and brain, respectively were classified into 8 clusters in PBMC, and 6 clusters into Lung and Brain.

Tables sup 1, sup2 and sup3: (or Table sup1: shown the 821,495 and 212 genes selected after applying a false discovery rate of 0% in PBMC, lung and brain respectively. For each organs the entrez number and the corresponding name genes are indicated.

Table sup 4: List of gene names identified in PBMC, Lung and Brain of the most significant clusters used for the functional annotation.

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 aplastante, 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, 17 209 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⁺ circulant au moins égal à 10/μl 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 × 10⁶/kg. Par sécurité, le nombre optimal est fixé à 5 × 10⁶/kg^[3]. La marge de sécurité est assez large ; en effet, pour les doses de CD34⁺ supérieures à 0,5 × 10⁶/kg, les délais médians de reconstitution de l'hématopoïèse ne varient que très peu. Ils passent de 11 jours (0,5 à 2,5 × 10⁶/kg) à 8 jours (> 12,5 × 10⁶/kg) pour un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 0,5 G/l, et de 12 jours (0,5 à 2,5 × 10⁶/kg) à 8 jours (> 12,5 × 10⁶/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, légalidomide), 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 μg/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 μg/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 (Mozobtl[®], AMD3100) est une molécule qui inhibe l'interaction entre SDF-1 et CXCR4. Il est habituellement utilisé à la dose de 240 μg/kg par voie sous-cutanée, en association avec le G-CSF à la dose de 10 μg/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 × 10⁶ 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 × 10⁶ 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 pléxtafor, 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 naltuzumab induit une augmentation significative des CSH circulantes. On a pu observer chez les patients traités par le naltuzumab 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 pléxtafor^[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'autorenouveaulement 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 en fin de compte préférer la technique en vasep 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 pléxtafor 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 cytomegalovirus 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 transcrite 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'hémapathie, 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 cytomegalovirus, 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'ibrutinomab 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'ode 131-

tositumomab est techniquement complexe à mettre en œuvre, en France au moins, car l'ode 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		
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 : avis 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
	Sclérodémie	Optionnel
	Polyarthrite rhumatoïde	Optionnel
	Lupus érythémateux disséminé	Optionnel
	Maladie de Crohn	Optionnel
Tumeurs solides	Sclérose en plaques	Optionnel
	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 : avis 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^[26,27]. 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^[28,29] : 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 précèderont 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 supérieure 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^[24]. 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^[52] 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^[53] 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^[52] 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^[55]. 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^[56].

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-aurostatine 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 [73]. 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 AML10 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 FLT3/ITD, 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 [86]. 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 [85].

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^[99]. 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^[99]. 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^[23] 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 mésoenchymateuses 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 mésoenchymateuses 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'aplastie incluent alopécie, muette, 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 (2,5%)^[106]. L'état pulmonaire du patient avant la greffe et les examens fonctionnels respiratoires pré-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^[109]).

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 cytophèrese grâce aux facteurs de croissance hématopoïétiques classiques (G-CSF) et aux nouveaux agents de mobilisation, tel le pléixafor. 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'hémaphèrese, 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, Aliotti 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 I, 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, Pease 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, Dunho 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, Suiz 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. *Hematopoietic 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, Aittal M. All transplantation-eligible patients with myeloma should receive ASCT in first response. In: Anderson KC, Bauer KA, Tallman MS, Crowley 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] Girmius 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, Cuccini 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, Galieni 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, Maszi 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 I, 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, Tournilhac 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, Müller 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, Mobty 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-IM (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, Cottereau 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, Kuruwilla 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, Broccia 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 FLT3/ITD. *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, Voskoboinik 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] Litow 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, Litow 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, Ertmann R, et al. High-dose chemotherapy followed by autologous stem cell transplantation for metastatic rhabdomyosarcoma—a systematic review. *PLoS One* 2011;6:e17127.
- [98] Carro 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, Laphero 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-transplants.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 (regs.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'hémoaphérèses, 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. *BMC - Hématologie* 2016;**11**(2):1-13 [Article 13-060-A-10].

Disponibles sur www.em-consulte.com



Articles
dédiés



Iconographies
supplémentaires



Vidéos/
Animations



Documents
légaux



Information
au patient



Informations
supplémentaires



Auto-
évaluations



Cas
clinique



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 enrolment.

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 (caspofungin) in preventing IFIs in AML patients undergoing induction chemotherapy. Efficacy and safety of caspofungin 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 mucositis 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] Ascioglu 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, Piciocchi 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] Nachbar D, Angelova O, Orth-Holler D, Dittbacher 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, Poinsignon 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>.

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, e469; doi:10.1038/bcj.2016.78; published online 9 September 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, ICBS UMR5246, Villeurbanne, France; ⁶Department of Apheresis and Autotransfusion, APHM, Conception Hospital, Marseille, France

⁷Hematology laboratory, APHM, Hôpital de la Timone, Marseille, France; ⁸UMR 1062 NORF, 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 Baille, 13005 Marseille, France.

E-mail: rogic.costello@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 National de la Sécurité du Médicament (Ref. 1500548-11). 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 Ficol-Histopaque 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 (>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 6.10⁵ 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 fetal bovine serum, 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 DMATE (Advanced BioDesign, Lyon, France), cytarabine, daunorubicine and azacitidine (Sigma-Aldrich) was determined using different concentrations of the drugs. After 48 h, the growth inhibitory effect of the drug was analyzed using Resazurin (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 (1.10⁵ cells/ml) were incubated under control condition or treated with 1,3,5 10 μmol/l of DMATE overnight. Then, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) 1x 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 CelGenix medium (CelGenix 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+ leukemia peripheral blood mononuclear cells from AML patient were transplanted intravenously into NOD/SCID/IL2R^γ 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);

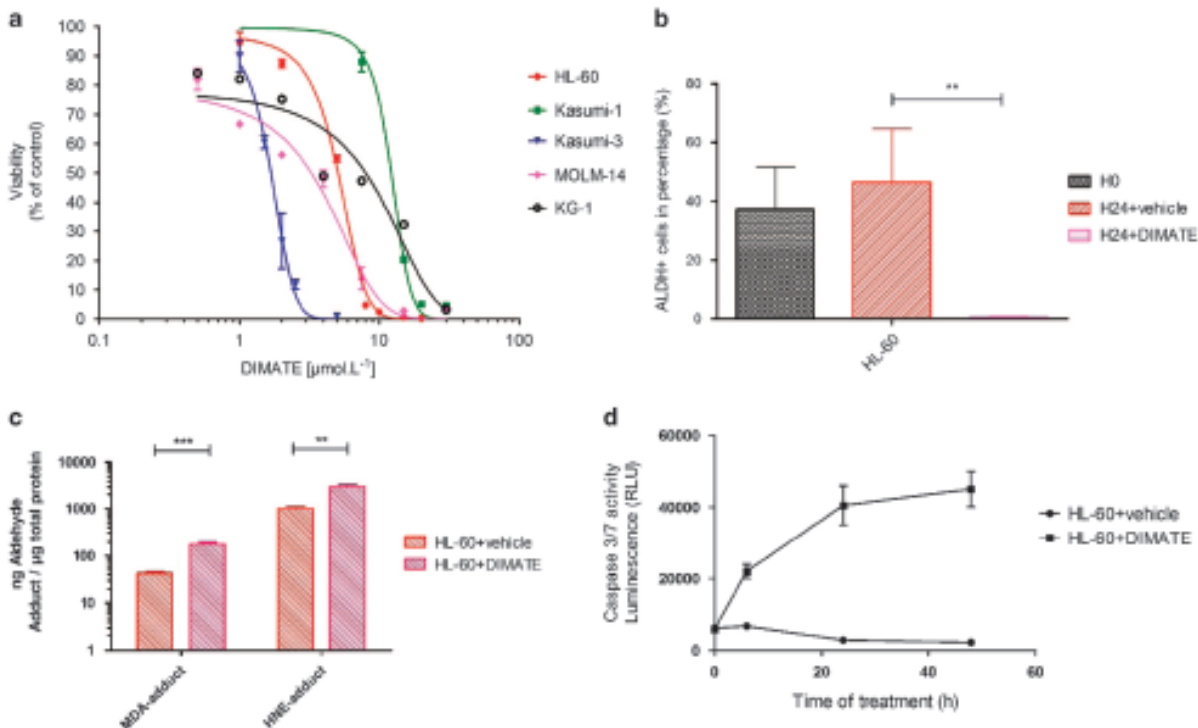


Figure 1. Inhibition of ALDH by DIMATE is cytotoxic on human AML cell lines by promoting apoptogenic aldehyde accumulation inducing apoptosis. (a) Viability assay of AML cells to increasing concentration of DIMATE. All experiments were performed in triplicates (n = 3). Values for all cell lines are showed 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.

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-

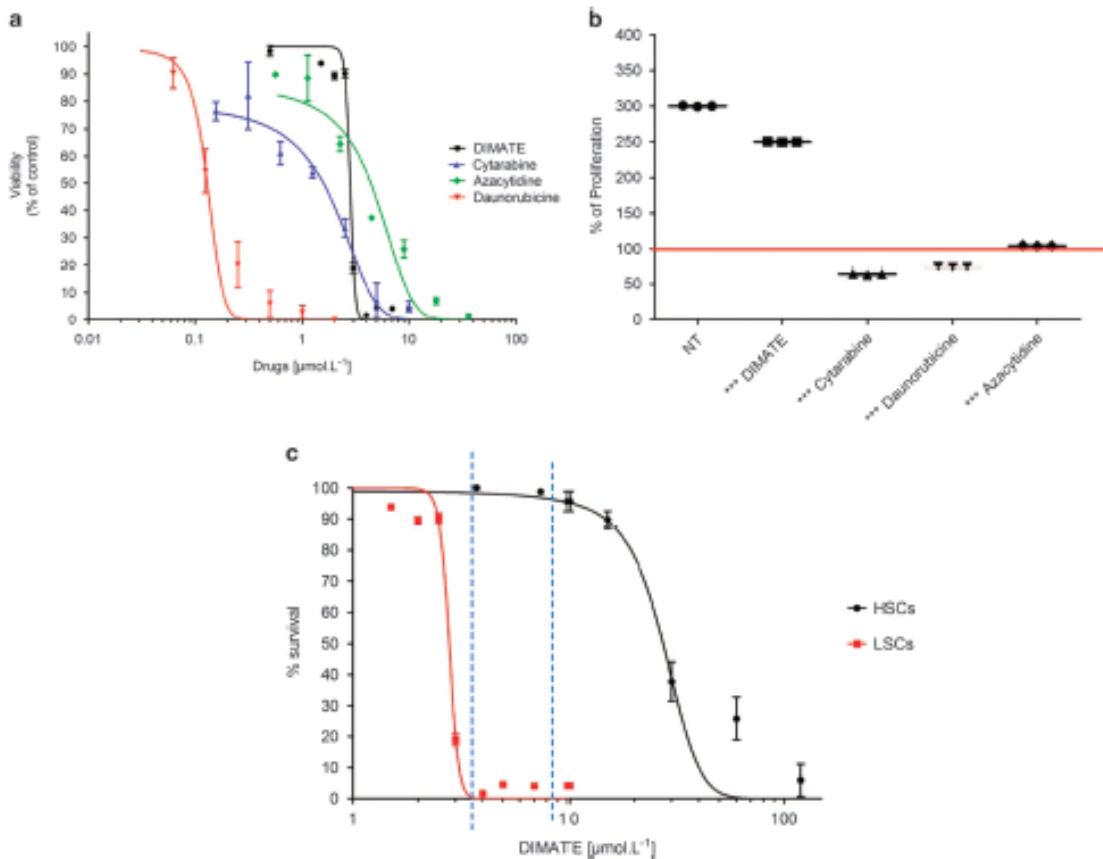


Figure 2. Cytotoxicity profile of DIMATE, daunorubicin, cytarabine and azacytidine on CD34+CD38- ALDH+ leukemic cells and CD34+CD38- healthy hematopoietic stem cell. (a) Cytotoxicity profiles of DIMATE, daunorubicin, cytarabine and azacytidine after 48 h of treatment for the CD34+CD38- ALDH+ leukemic 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 (Figure 3a). 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,

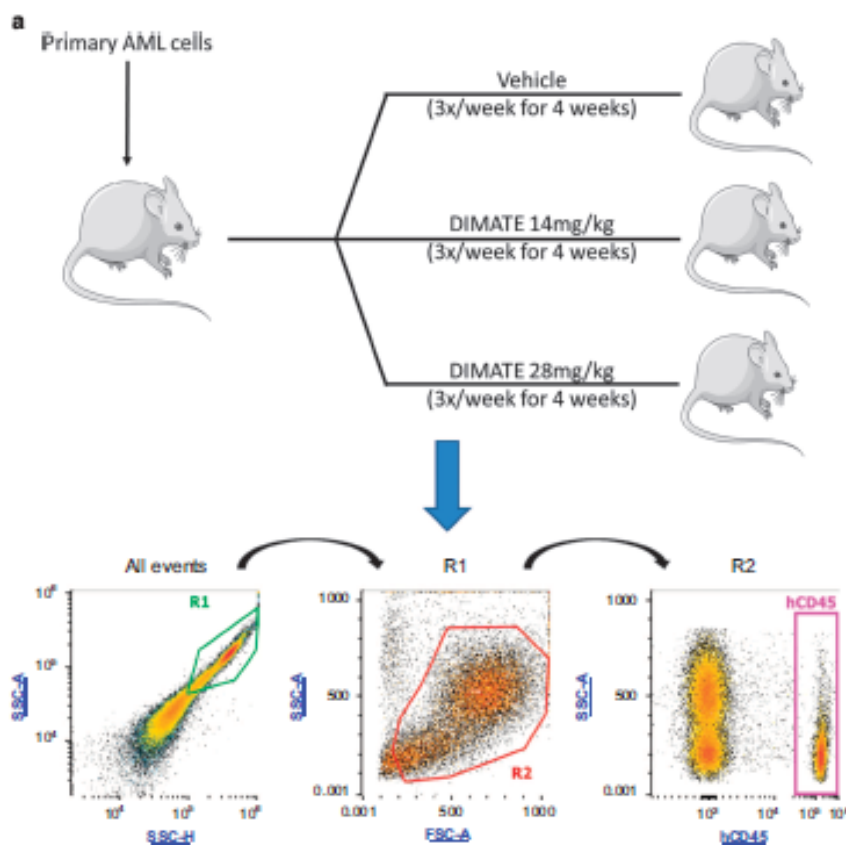


Figure 3. DIMATE shows potent activity against primary AML cells transplanted in NOG mice. (a) Experimental scheme and gating strategy in flow cytometry for hCD45+ and mCD45+ cells monitoring in blood, spleen and bone marrow for study of the antileukemic activity of DIMATE in immunodeficient mice engrafted 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 $P < 0.05$.

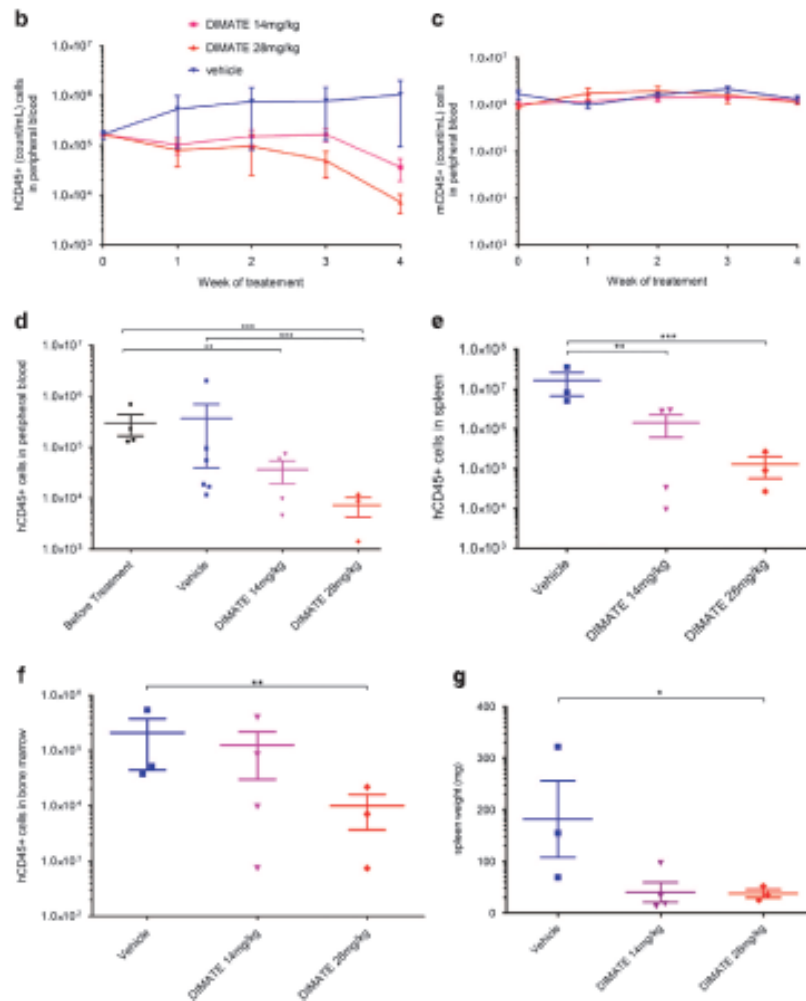


Figure 3. Continued

compared with untreated control mice, 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-2.²⁸ 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 (CROM U1064, 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, Wad 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 BH, 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 BH 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, Maital 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 care 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, Snard C, Vormoor J, Murdoch B, Huang T, Caceres-Cortes J et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* 1994; **367**: 645-648.
- 12 Geber JM, Smith BD, Ngwang B, Zhang H, Vala MS, Mosberger 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 Clin Oncol* 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 I, 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, Moyerse TE, Wirthlin L, Craft TP, Hombich 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 thioester inhibitors of aldehyde dehydrogenases 1&3: suppressors of apoptogenic aldehyde oxidation and activators of apoptosis. *Curr Med Chem* 2013; **20**: 527-533.
- 18 Casuto RA, Muzio G, Salvo RA, Maggioni M, Trambetta 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, Couvoisier C, Martinez RM, Chantepie J, Parot MJ et al. Aldehyde dehydrogenase inhibitors: alpha,beta-acetylenic N-substituted amino thioesters 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, Chantepie B, Dishayes C et al. Altered methional homeostasis is associated with decreased apoptosis in BA19 bcl2 murine lymphoid cells. *Biochem J* 1996; **313**(Pt 3): 973-981.
- 21 Costello RT, Mallet F, Gaugler B, Sainy D, Arnoldet C, Gstaaut 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, Aksay 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**: pii.
- 23 Corami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksay 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, Saff 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, Thelen 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, Kasunty H, Passagué E, Cazzio A, Weissman IL, Cleary ML. MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukaemias in mice. *Cancer Cell* 2003; **3**: 161-171.
- 27 Gal H, Amatiello N, Trakhterbot L, Jacob-Hirsch J, Margalit Q, 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 BM, 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 Passaguné E, Jamieson CHM, Allis 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 Rajajmakers MHGP, Mukharjee 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 Kado 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 Bichin J, Montero J, Berezovskaya A, Le BT, Kertész 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, Gilcz O, Li W, Shastril A, Gordon S, Bameyo L *et al*. I β CxCR2 pathway inhibition as a therapeutic strategy against MDS and AML stem cells. *Blood* 2015; **125**: 3144–3152.
- 35 Prost S, Rakozat F, Spentchian M, Ouzagdouh Y, Saliba J, Massonet G *et al*. Bostion 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>)

Résumé

À la fin du 20^e siècle, la première étude utilisant les microarrays pour étudier la leucémie aiguë a démontré l'utilité de cette technologie dans la mise en évidence de l'expression des gènes. La décennie suivante a montré que l'étude de l'expression des gènes est devenue un outil précieux dans la recherche en hémopathies malignes. De nos jours, il a été établi que l'expression des gènes est devenue un outil indispensable en recherche dans le domaine de la cancérologie et en particulier en onco-hématologie.

L'objectif général de cette thèse a été de mettre en évidence la contribution de l'approche transcriptomique dans la physiopathologie et le traitement des hémopathies malignes. En particulier, comment la technologie des microarrays nous a aidée à étudier diverses problématiques en onco-hématologie ; notamment : le décès lié aux complications infectieuses, l'incapacité à obtenir la rémission et le décès lié aux rechutes.

Dans la première partie, notre objectif était d'étudier les cellules *Natural killer* (Nk) chez les patients atteints de leucémie aiguë myéloïde (LAM). Nous avons comparé la signature transcriptomique des cellules Nk de patients LAM à celle des cellules Nk de sujet sains et suggéré que le facteur de transcription ETS-1 est un bon candidat capable de réguler les récepteurs activateurs NCR (natural cytotoxicity receptors) dont les gènes sont situés sur deux chromosomes différents, même si leur expression reste fortement coordonnée.

Dans la seconde partie, nous nous sommes intéressés à la prédiction du sepsis en utilisant une approche transcriptomique dans le cadre de l'autogreffe de cellules souches hématopoïétiques (auto-CSH). En utilisant le même modèle, dans la troisième partie, nous avons mis en évidence l'effet du melphalan en tant que chimiothérapie de conditionnement sur les cellules mononuclées du sang périphérique et identifié un marqueur potentiel de rechute précoce chez les patients atteints de myélome dans le cas de l'auto-CSH.

Enfin, dans la dernière partie, notre objectif a été d'analyser le profil d'expression génique des lymphomes B diffus à grandes cellules liés à l'infection par le VIH afin de vérifier ou pas l'existence des sous-types décrits chez les patients immunocompétents.