

ACADEMIE DE VERSAILLES
UNIVERSITE DE VERSAILLES SAINT-QUENTIN EN YVELINES
UFR DES SCIENCES DE LA SANTE PARIS-ILE-DE-FRANCE-OUEST

ANNEE 2011

N°

THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN MEDECINE

PAR

HIRSCH, Pierre,
Né le 02/03/1982 à Versailles

Présentée et soutenue publiquement le 30/05/2011

TITRE : L'activité de la protéine ABCB1 est un facteur pronostique indépendant pour la réponse au traitement intensif chez 206 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde, en tenant compte des nouveaux marqueurs moléculaires.

JURY :

Président : M. le professeur Jean-Pierre MARIE

Directeur : M. le professeur Ollivier LEGRAND

DES d'Hématologie clinique

« Why then, lead on. O that a man might know
The end of this day's business ere it come;
But it sufficeth that the day will end,
And then the end is known. »

William Shakespeare, *Jules César*.

Remerciements :

A tous ceux qui m'ont donné, tout au long de mon internat, le goût de l'hématologie.

A Nicole CASADEVALL, Jean-François BERNAUDIN, Ollivier LEGRAND et Jean-Pierre MARIE, pour avoir accepté le rôle de membre du jury de cette thèse.

A Ruoping TANG, Fanny FAVA, Christophe MARZAC, Jean-Yves PERROT, Chantal BERNARD, Frédéric FEGER et Ollivier LEGRAND, pour leur aide dans ce travail.

A Céline et à l'équipe du Chatelard, hasard ou providence...

A ma famille et à mes amis, et à tous ceux qui m'ont encouragé dans ce travail.

Table des matières

I-	Introduction	7
A-	Généralités	7
	i. Définition	7
	ii. Epidémiologie	8
	iii. Facteurs étiologiques	8
	iv. Physiopathologie et histoire naturelle	9
	v. Traitements et objectifs	12
	vi. Résultats des traitements	19
B-	Facteurs pronostiques dans les LAM	21
	i. Facteurs liés au patient	21
	ii. Facteurs liés à la maladie	22
C-	Problématique	36
II-	Matériel et méthodes	37
A-	Patients et traitement	37
	i. Critères d'inclusion et d'exclusion	37
	ii. Traitements de première ligne	38
	iii. Traitement des rechutes	44
	iv. Suivi	44
B-	Données cliniques et biologiques	45
	i. Données recueillies au diagnostic	45
	ii. Données recueillies après congélation	48
	iii. Analyse statistique	52
III-	Résultats	54
A-	Caractéristiques des patients	54
B-	Relations entre l'activité d'ABCB1 et les autres caractéristiques	56
	i. Dans l'ensemble des patients	56
	ii. Dans la population à cytogénétique normale	56
C-	Impact pronostique de l'activité d'ABCB1	57
	i. Dans l'ensemble des patients	57
	ii. Dans la population à cytogénétique normale	58
D-	Facteurs pronostiques dans la population générale	59
	i. Obtention de la RC	59
	ii. Survie sans maladie	60
	iii. Survie globale	60
E-	Facteurs pronostiques dans la population à cytogénétique normale	62
	i. Obtention de la RC	62
	ii. Survie sans maladie	63
	iii. Survie globale	64
F-	Facteurs pronostiques dans la population à cytogénétique normale sans FLT3/ITD et sans mutation de NPM1	65
	i. Obtention de la RC	65
	ii. Survie sans maladie	66
	iii. Survie globale	66
G-	Pronostic en fonction de FLT3/ITD et d'ABCB1	68
	i. Dans la population à cytogénétique normale	68

ii. Dans la population jeune à cytogénétique normale	69
IV- Discussion	70
A- Intérêt de la sonde JC-1	70
B- Relations entre ABCB1 et les autres marqueurs	71
C- Intérêt pratique de l'étude de la fonctionnalité d'ABCB1	73
D- Facteurs pronostiques	74
E- ABCB1 comme cible thérapeutique	76
V- Conclusion	77
Annexe 1 : Classification OMS des LAM	78
Annexe 2 : Classification FAB des LAM	80
Annexe 3 : Echelle d'activité de l'ECOG	81
Annexe 4 : Critères d'inclusion dans les protocoles AML 10 et AML 12	82
Annexe 5 : Critères d'inclusion dans le protocole AML 13	83
Références bibliographiques	84

Table des figures

Figure 1 : Exemples d'anomalies moléculaires dans les LAM	11
Figure 2 : Survie globale dans les LAM selon les tranches d'âge	20
Figure 3 : Survie globale dans les LAM en fonction du risque cytogénétique	23
Figure 4 : Principe des tests de fonctionnalité d'ABCB1	33
Figure 5 : Survie en fonction de l'activité d'ABCB1 dans l'ensemble des patients	58
Figure 6 : Survie en fonction d'ABCB1 dans la population à cytogénétique normale	58
Figure 7 : Survie globale en fonction de l'activité d'ABCB1 et de FLT3/ITD dans la population à cytogénétique normale	68
Figure 8 : Survie globale en fonction de l'activité d'ABCB1 et de FLT3/ITD dans la population jeune à cytogénétique normale	69

Résumé

L'activité de la protéine ABCB1 est un facteur pronostique connu dans les leucémies aiguës myéloïdes, mais n'a jamais été évaluée en comparaison des marqueurs moléculaires de découverte plus récente, comme les duplications de *FLT3*, les mutations de *NPM1*, les mutations de *CEBPA*, ou l'expression de *BAALC*. Par ailleurs, les relations entre ces derniers marqueurs et l'activité d'ABCB1 ont été très peu étudiées. Cette étude rétrospective sur 206 patients atteints de leucémie aiguë myéloïde, et traités de manière homogène, évalue les relations entre l'activité d'ABCB1 et ces marqueurs moléculaires, et évalue si cette activité reste un facteur pronostique indépendant pour la réponse au traitement.

Dans cette étude, 20% des patients présentent une haute activité d'ABCB1. Cette activité est associée à un compte leucocytaire plus bas, à l'absence de mutation de *NPM1*, et à une haute expression de *BAALC* et de CD 34. Les facteurs pronostiques indépendants retrouvés pour la survie globale dans la population générale sont l'âge, la cytogénétique, les duplications de *FLT3*, et l'activité d'ABCB1. En cas de cytogénétique normale, l'âge, le compte leucocytaire et l'activité d'ABCB1 sont les seuls facteurs pronostiques indépendants pour la survie sans maladie ; l'âge, les duplications de *FLT3*, et l'activité d'ABCB1 sont les seuls facteurs pronostiques indépendants pour la survie globale. L'absence de duplication de *FLT3*, associée à une faible activité d'ABCB1, définit un groupe de patients de pronostic significativement plus favorable.

L'activité d'ABCB1 reste un facteur pronostique indépendant dans les leucémies aiguës myéloïdes, et devrait être évaluée chez tous les patients au diagnostic.

Mots clés : Leucémie aiguë myéloïde, pronostic, ABCB1, FLT3, NPM1, CEBPA, BAALC.

Index des abréviations :

ABC : « ATP binding cassette »

ABL : *Abelson*

BAALC : « *Brain and acute leukemia, cytoplasmic* »

BCRP : « Breast cancer resistance protein »

CEBPA : « CAAT/enhancer binding protein alpha »

CSH : Cellules souches hématopoïétiques

DFS : Survie sans maladie

DMSO : Diméthylsulfoxyde

ECOG : « Eastern cooperative oncology group »

EFS : Survie sans évènement

EORTC : Organisation européenne pour la recherche et le traitement du cancer

ERG : « *Ets related gene* »

FLT3 : « Fms like tyrosine kinase 3 »

FLT3/ITD : Duplication interne en tandem de *FLT3*

ICT : Irradiation corporelle totale

Id1 : « Inhibitor of differenciation » 1

IDH : Isocitrate déshydrogénase

IV : Intra veineux

LA : Leucémie aiguë

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LDH : Lactate déshydrogénase

LRP : « Lung resistance protein »

MDR : « Multi drug resistance »

MRP : « Multi drug resistance associated protein »

NPM1 : Nucléophosmine

OMS : Organisation mondiale de la santé

OS : Survie globale

PBS : « Phosphate buffered saline »

PgP : Glycoprotéine P

PO : Per os

RC : Rémission complète cytologique

I- Introduction

A. Généralités

i. Définition

La leucémie aiguë (LA) est une maladie clonale des précurseurs hématopoïétiques, qui vont perdre leur capacité normale de différenciation, et acquérir des capacités anormales de prolifération. Ces précurseurs hématopoïétiques anormaux, appelés blastes, vont envahir la moelle osseuse, aux dépens des lignées hématopoïétiques normales, ce qui conduit à un défaut de production d'hématies, de plaquettes et de leucocytes.

D'après la classification des tumeurs du système hématopoïétique publiée en 2008 par l'organisation mondiale de la santé (OMS) (1) (*annexe 1*), le diagnostic de LA est porté, sauf exceptions, par une proportion de blastes dans la moelle osseuse supérieure à 20 % des cellules nucléées. La LA sera dite myéloïde (LAM) si ces blastes sont d'origine myéloïde, ce qui peut être affirmé par des caractères cytologiques (notamment par la présence de corps d'Auer dans le cytoplasme des blastes), par des caractères cytochimiques (coloration à la myéloperoxydase ou au noir Soudan), ou par une analyse en cytométrie de flux. On peut, avec cette dernière technique, affirmer le diagnostic de LAM si 20 % des blastes expriment des marqueurs myéloïdes spécifiques (notamment CD 33, CD 13 ou la myéloperoxydase), en l'absence d'expression de certains marqueurs lymphoïdes B ou T (notamment CD 3, CD 19, ou CD 22) (1, 2).

Il faut cependant noter plusieurs exceptions à cette définition. En effet, quand plus de 80 % des cellules nucléées de la moelle sont de lignée monocytaire, le diagnostic de LA monocytaire (ou monoblastique) pourra être retenu. De même, le diagnostic d'érythroleucémie sera porté si plus de 50 % des cellules nucléées médullaires appartiennent à la lignée érythroïde, et si au moins 20 % des cellules n'appartenant pas à cette lignée sont des

myéloblastes. Les LA mégacaryoblastiques, de diagnostic souvent difficile, seront affirmées par la présence d'un nombre de blastes supérieur à 20 %, dont au moins la moitié appartiennent à la lignée mégacaryocytaire, définie par la présence de marqueurs spécifiques en cytométrie de flux (CD 41, CD 42 ou CD 61).

D'autre part, la présence de certaines anomalies cytogénétiques spécifiques dans la population de cellules blastiques (t(15;17)(q22;q12), inv(16)(p13.1q22), ou t(8;21)(q22;q22)), suffit à affirmer le diagnostic de LAM, même si le compte des blastes est inférieur à 20 %.

Enfin, dans le cas particulier des sarcomes myéloïdes, tumeurs solides constituées de cellules blastiques myéloïdes, l'envahissement de la moelle, bien que fréquent, n'est pas systématiquement retrouvé. Si on ne parle pas de LAM dans cette dernière situation, l'attitude thérapeutique sera cependant quasiment identique.

ii. Epidémiologie

D'après l'analyse du registre américain des cancers, les LAM représentent environ 25 % de toutes les leucémies de l'adulte. Elles restent cependant des maladies très rares, avec une incidence ajustée à l'âge de 3,5 /100 000 habitants/an sur la période de 2003 à 2007, ce qui représente moins de 3 % de la totalité des cancers (3). Sur la même période, l'incidence est discrètement plus élevée chez les hommes que chez les femmes (4,3 /100 000 habitants /an contre 2,9 /100 000 habitants /an) et augmente avec l'âge (1,7 /100 000 habitants /an avant 65 ans et 15,7 /100 000 habitants / an après 65 ans). L'âge moyen au diagnostic est de 67 ans aux Etats-Unis (3).

iii. Facteurs étiologiques

Certains facteurs environnementaux favorisant l'apparition des LAM ont été identifiés, comme l'exposition aux radiations ionisantes (radiothérapie ou autres), ou au benzène.

L'exposition à d'autres facteurs chimiques (toxiques industriels, solvants...) est également probablement en cause, mais ces derniers n'ont pas été formellement déterminés.

L'utilisation de certains produits de chimiothérapie, et notamment des agents alkylants et des inhibiteurs de la topoisomérase II, peut également mener au développement secondaire d'une LAM (4-7). Les LAM secondaires aux traitements par radiothérapie ou chimiothérapie sont considérées comme des entités particulières dans la classification de l'OMS (1).

De plus, certaines pathologies hématologiques, comme les syndromes myélodysplasiques, les syndromes myéloprolifératifs, ou les aplasies médullaires, peuvent aussi prédisposer à l'apparition de LAM. Enfin, certains syndromes génétiques congénitaux sont associés à une fréquence plus élevée de LAM, comme par exemple le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome de Kostman, la maladie de Fanconi, ou le syndrome de Li-Fraumeni (8). Les LAM secondaires aux syndromes myélodysplasiques et les LAM associées au syndrome de Down sont des entités à part dans la classification de l'OMS (1).

Dans une très large majorité de cas cependant, aucun facteur étiologique n'est retrouvé (9).

iv. Physiopathologie et histoire naturelle

Les LAM sont la conséquence d'un dérèglement du programme génétique au niveau des précurseurs des cellules hématopoïétiques. Il est couramment admis, même si la véracité de ce modèle n'est pas démontrée chez l'homme, que les LAM résultent d'un processus de cancérogenèse en plusieurs étapes, associant à un premier événement, responsable d'un blocage de maturation des précurseurs, un second événement, responsable d'une augmentation de leur capacité de prolifération (10).

Plusieurs arguments soutiennent cette théorie. Premièrement, dans des modèles animaux de pathologie hématologique, la greffe à des souris immuno-déficientes de précurseurs

hématopoïétiques modifiés, porteurs d'une anomalie génétique unique connue pour avoir un rôle dans les LAM, va aboutir soit à un blocage de maturation des lignées hématopoïétiques (par exemple, en cas de surexpression de *PU.1*), soit à un accroissement des capacités de prolifération cellulaire, mimant un syndrome myéloprolifératif (par exemple, en cas de mutation activatrice du récepteur au « stem cell factor » (*c-Kit*)). Une anomalie génétique unique ne suffit jamais à induire de LAM dans ces modèles murins, mais l'association à un second événement génétique est toujours nécessaire au développement de ce tableau (10-13).

De même, chez les patients atteints de LAM, on retrouve souvent plusieurs anomalies génétiques ou moléculaires concomitantes. Par exemple, l'association fréquente de la translocation réciproque des chromosomes 8 et 21 ($t(8;21)(q22;q22)$), qui aboutit au transcrite de fusion *AML1-ETO*, et à un blocage de maturation, et des mutations de *c-Kit*, qui aboutissent à une activation constitutive du signal sous-jacent, et à une plus grande prolifération, pourrait partiellement expliquer la physiopathologie de ces maladies (10).

Il est donc classique de distinguer deux types d'événements moléculaires ou génétiques dans les LAM (*figure 1*). Les mutations de classe I, qui sont des anomalies menant à une activation anormales des voies de transduction du signal de récepteurs cytokiniques, aboutissent à une augmentation des capacités de prolifération cellulaire. On compte notamment dans ce groupe les mutations de *N-Ras*, de *K-Ras*, les mutations et les duplications en tandem de la « *FMS like tyrosine kinase 3* » (*FLT3*), et les mutations de *c-Kit*. Les mutations de classe II sont, quant à elles, des anomalies de facteurs de transcription ou d'éléments du complexe de transcription, qui aboutissent à un blocage de la maturation, ou à l'acquisition de capacités d'auto renouvellement cellulaire. On peut, par exemple, citer dans ce groupe la présence d'un transcrite de fusion *PML-RAR α* , associé aux translocations $t(15;17)(q22;q12)$, d'un transcrite de fusion impliquant le « core binding factor » (CBF) (*CBF β -MYH11* ou *AML1-ETO*) (1), les

mutations de la *nucléophosmine (NPM1)*, ou les mutations de la « *CAAT/enhancer binding protein alpha* » (*CEBPA*) (10, 14).

L'association de ces deux événements moléculaires va permettre aux cellules blastiques d'acquies un avantage sélectif par rapport aux cellules hématopoïétiques normales, et ainsi d'empêcher le déroulement normal de l'hématopoïèse.

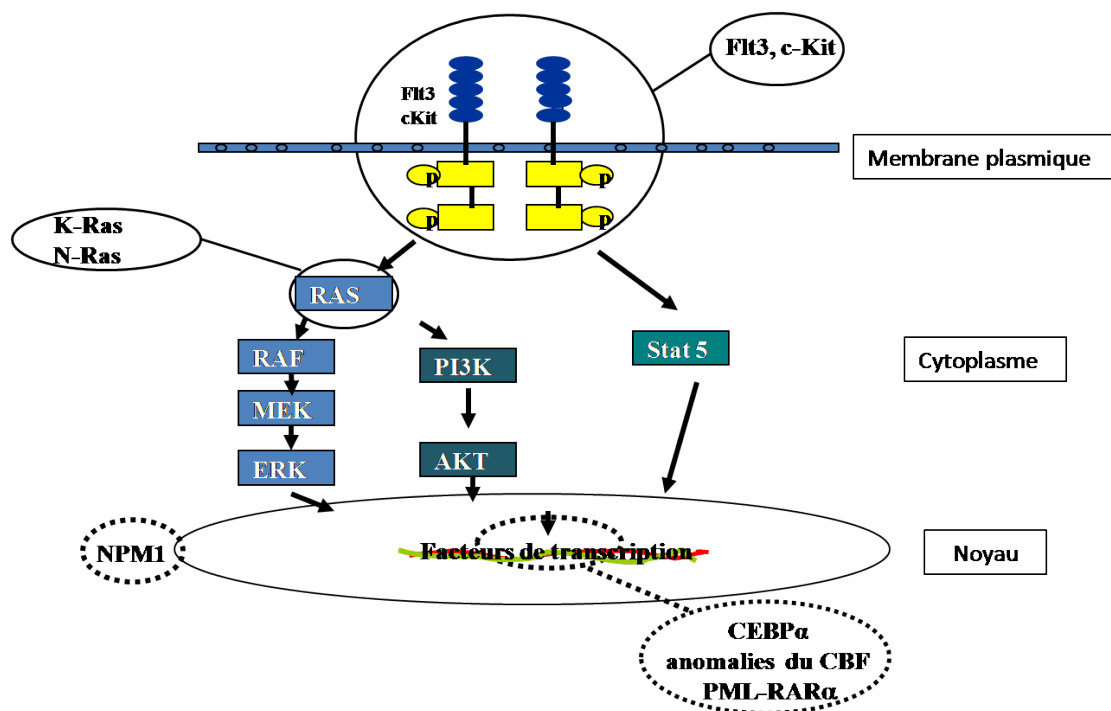


Figure 1 : Exemples d'anomalies moléculaires impliquées dans les LAM, et des voies de signalisations sous-jacentes. Les anomalies de classe I sont entourées en trait plein, les anomalies de classe II sont entourées en trait discontinu.

En l'absence de traitement spécifique, l'évolution des LAM est spontanément défavorable à très court terme, avec un décès par infection ou par hémorragie sévère dans les semaines qui suivent le diagnostic (9, 15, 16).

v. Traitements et objectifs

1. Objectifs des traitements et évaluation de leur efficacité

Les critères d'évaluation de l'efficacité des traitements (ou « critères de Cheson »), détaillés dans cette section, ont été établis par un panel international d'experts en 1990, et réévalués en 2003. Ils servent toujours de référence internationale dans les LAM (17).

Le premier objectif dans le traitement des LAM est l'obtention de la rémission complète cytologique (RC), définie par l'association (a) d'une proportion de blastes inférieure à 5 % des cellules nucléées de la moelle osseuse, avec absence de corps d'Auer dans leur cytoplasme, (b) de l'absence de localisation extra-médullaire de la maladie, et (c) de la normalisation de la numération globulaire sanguine, c'est-à-dire de l'association d'un compte de polynucléaires neutrophiles supérieur à 1000 / μ l, et d'un compte de plaquettes supérieur à 100 000 / μ l. Ces trois critères doivent être réunis pour affirmer la RC.

Cet objectif pourrait être complété par la nécessité d'obtention d'une réponse cytogénétique complète, correspondant à l'absence d'anomalie cytogénétique dans les cellules blastiques, en présence d'une anomalie initiale, après l'analyse d'au moins 20 mitoses. Un dernier objectif serait l'obtention d'une décroissance moléculaire, voire d'une rémission moléculaire, de définition variable en fonction des marqueurs et des techniques utilisables pour leur quantification. Cette décroissance moléculaire correspondrait à la diminution, voire à la disparition, d'une anomalie moléculaire détectée au diagnostic (par exemple, des transcrits de fusion *PML-RAR α* ou *AML1-ETO*).

Le traitement initial permettant l'obtention de la rémission complète est appelé traitement d'induction, et consiste le plus souvent en l'association d'une anthracycline et d'aracytine.

L'objectif de la seconde phase du traitement, une fois la RC obtenue, est son maintien de la manière la plus prolongée possible. Cette phase de traitement, appelée traitement de consolidation, peut consister en une ou plusieurs cures de chimiothérapie, et en une éventuelle greffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) autologues ou allogéniques (connue également sous le nom d'intensification thérapeutique).

Un échec du traitement peut donc être défini de plusieurs façons : (a) la présence d'une maladie résistante, définie par l'absence d'obtention de la RC après un traitement adapté ; (b) le décès pendant l'aplasie, c'est-à-dire après la fin d'un traitement adapté, alors que le patient est toujours cytopénique ; (c) le décès de cause indéterminée, c'est-à-dire avant la fin d'un traitement adapté, ou après la fin du traitement sans évaluation permettant d'affirmer la RC ; (d) la rechute, définie par la réapparition de blastes dans le sang, la présence de plus de 5 % de blastes dans la moelle, ou le développement d'une maladie extra-médullaire, le tout chez un patient ayant précédemment atteint la RC.

Il n'existe pas de définition précise de la guérison des LAM, c'est-à-dire pas de seuil de durée de rémission complète permettant d'affirmer cette guérison, étant donné la possibilité de rechute tardive. Cependant, la majorité des rechutes se produisent dans les trois ans qui suivent l'obtention de la RC (9). Pour évaluer l'efficacité des traitements, on utilise donc préférentiellement comme critères le taux d'obtention de la RC, c'est-à-dire le rapport du nombre de patients atteignant la RC après un traitement au nombre de patients ayant reçu le traitement, et différentes mesures de survie. Parmi ces dernières, la survie globale (OS) est mesurée depuis la date du diagnostic, jusqu'à la date du décès, quelle qu'en soit la cause ; la survie sans rechute (DFS) est mesurée depuis la date d'obtention de la RC, jusqu'à la date de rechute ou de décès, quelle qu'en soit la cause ; enfin, la survie sans évènement (EFS) est mesurée de la date du diagnostic, jusqu'à la date d'échec du traitement, de rechute ou de décès, quelle qu'en en soit la cause.

2. Patients de moins de 60 ans

a. Traitement d'induction

Depuis les années 1960, le traitement d'induction standard (ou « 3+7 ») consiste en l'association de daunorubicine à la dose de 30 à 45 mg/m²/j pendant 3 jours, et d'aracytine en administration continue à la dose de 100 à 200 mg/m²/j pendant 7 jours. Ce traitement permet l'obtention de la RC chez environ 60 à 80 % des patients (18, 19). Très peu d'améliorations ont été apportées depuis lors. La seule modification ayant permis une amélioration globale du pronostic est l'augmentation des doses de daunorubicine à 60 mg/m²/j ou plus (20). Les tentatives de substitution des anthracyclines par des dérivés moléculaires proches (idarubicine ou mitoxantrone à la dose de 10 à 12 mg/m²/j), ou d'adjonction d'un autre produit de chimiothérapie (thioguanine, étoposide, fludarabine...) n'ont pas démontré d'amélioration majeure sur le taux de RC ou sur l'OS, malgré parfois une amélioration de la DFS. L'utilisation de thérapies ciblées par anticorps anti CD 33 couplés à un cytotoxique (Gemtuzumab) n'a pas permis non plus d'amélioration du pronostic global, sauf chez les patients de risque cytogénétique favorable (21). Les résultats encourageants, dans certaines études, de l'injection concomitante à la chimiothérapie de facteurs de croissance (GM-CSF ou G-CSF) (22, 23), également appelée « priming », n'ont pas été confirmés (9, 19, 24).

b. Traitement de consolidation

Le bénéfice d'un traitement complémentaire après l'obtention de la RC a été démontré, avec une survie globale très limitée pour les patients n'ayant reçu qu'une induction seule (25). Ces traitements complémentaires peuvent consister soit en une chimiothérapie intensive, soit en une greffe de cellules souches hématopoïétiques (autologues ou allogéniques), soit en l'association de ces dernières.

i. Chimiothérapie intensive

La chimiothérapie intensive est le traitement de consolidation le plus souvent proposé aux patients. Comme pour l'induction, la drogue essentielle de ce traitement est l'aracytine. Le nombre optimal de cycles à administrer n'est pas défini, mais certaines études ont démontré que la répétition prolongée des cures de chimiothérapie (au-delà de quatre cures) n'améliorait pas la survie globale (26).

De plus, la nature et les doses des chimiothérapies à utiliser ne sont pas clairement définies. L'intérêt d'utiliser des hautes doses d'aracytine en monothérapie a été montré dans les LAM à cytogénétique favorable, et, dans une moindre mesure, dans les LAM à caryotype intermédiaire (9, 27), mais cette intensification des doses ne change pas le pronostic des LAM à caryotype défavorable. Par ailleurs, peu d'études randomisées ont démontré que l'utilisation de ces hautes doses d'aracytine n'était pas inférieure à celle d'une association d'aracytine à dose standard et d'une anthracycline (27, 28), et les différences de toxicité entre ces régimes de chimiothérapie ont été mal évaluées. Le nombre optimal et la nature des produits à utiliser pour les chimiothérapies de consolidation dans les LAM restent donc très discutés.

ii. Greffe de CSH allogéniques

La greffe de CSH allogéniques (ou allogreffe de CSH) peut théoriquement être pratiquée immédiatement après le traitement d'induction, ou après la réalisation de chimiothérapie de consolidation. L'utilisation d'un donneur de CSH familial géno-identique, et d'un conditionnement standard, associant de fortes doses de cyclophosphamide à une irradiation corporelle totale (ICT) de 12 Gy, permet de combiner l'effet cytotoxique du traitement contre la LAM et un effet immunologique potentiel du greffon contre la leucémie (GVL). Cette procédure est associée à un taux de rechute plus faible chez les patients. Malheureusement, le bénéfice est limité par le taux élevé de mortalité qui lui est lié, et par le potentiel effet du

greffon contre l'hôte (GVH). Elle devrait donc être réservée aux patients dont les chances de survie avec un traitement par chimiothérapie seule, ou par chimiothérapie et greffe de CSH autologues, sont plus faibles que les chances de survie avec une allogreffe de CSH. Plusieurs études montrent que cette procédure n'apporte de bénéfice que chez les patients à risque cytogénétique intermédiaire ou élevé. Les patients à risque cytogénétique favorable ne bénéficient pas de ce geste. Les patients à cytogénétique normale et avec des mutations de *NPM1* sans duplication de *FLT3* n'en bénéficieraient pas non plus, mais cette dernière donnée n'a été validée que sur un groupe de faible effectif (24, 29).

En cas d'absence de donneur géno-identique, d'autres sources de CSH peuvent être utilisées, et notamment des donneurs phéno-identiques pour le système HLA. Les résultats sur la survie sont alors comparables aux résultats obtenus avec un donneur géno-identique (19, 24). Les techniques plus récentes utilisant d'autres sources de CSH, comme le sang placentaire ou les donneurs intra-familiaux haplo-identiques, restent à évaluer.

Du fait de l'apparition des procédures à conditionnement atténué, qui engendrent une moindre toxicité, et de la diversité de sources possibles de donneurs, la place exacte de l'allogreffe à l'heure actuelle doit être réévaluée, notamment chez les sujets plus âgés. Cependant, il apparaît essentiel d'identifier de puissants facteurs pronostiques de probabilité de réponse à la chimiothérapie, afin de ne réserver cette thérapeutique potentiellement toxique qu'aux seuls patients susceptibles d'en tirer un bénéfice.

iii. Greffe de CSH autologues

Les greffes de CSH autologues (ou autogreffes de CSH), comme les allogreffes de CSH, peuvent être proposées après une ou plusieurs cures de chimiothérapie de consolidation. Ce geste consiste en l'administration de chimiothérapie à doses myélo-ablatives, plus ou moins associée à une ICT, à visée anti-tumorale, puis en la réinjection de CSH autologues afin de permettre la récupération d'une hématopoïèse normale. Cette option thérapeutique paraît valable en cas de LAM de risque favorable ou intermédiaire, mais son évaluation a en fait été très limitée dans les différentes études, à cause du faible effectif de patients inclus dans les différents sous-groupes (19). Dans une des seules larges études sur le sujet, le bénéfice apporté par une autogreffe de CSH paraît au moins identique à celui des chimiothérapies de consolidation, avec une amélioration de la DFS pour les patients traités par autogreffe, sans traduction sur l'OS. L'autogreffe, malgré une moindre toxicité, est dans cette étude cependant moins efficace que l'allogreffe de CSH (30). La place exacte de l'autogreffe de cellules souches dans le traitement des LAM reste donc elle aussi à préciser (19, 24).

3. Patients de plus de 60 ans

Les stratégies de traitement à proposer aux sujets plus âgés sont encore plus discutées. En effet, du fait d'une trop grande toxicité, il est impossible d'administrer à cette population des traitements d'intensité aussi importante que celle utilisée pour les sujets plus jeunes.

On distingue cependant habituellement, au sein de cette population, un premier groupe, constitué par les patients âgés de 60 à 74 ans, chez qui, sous réserve d'un état général conservé, et de l'absence de comorbidité majeure, on peut proposer un schéma de traitement comparable à celui des sujets jeunes. Une induction, à base d'anthracyclines pendant 3 jours et d'aracytine pendant 7 jours reste alors classique. Des différents essais thérapeutiques réalisés dans cette population, il est par contre très difficile de tirer des recommandations sur

les traitements à administrer après la RC. Même si l'administration d'au moins une cure de consolidation reste un standard, la nature, l'intensité et le nombre de ces cures reste à déterminer (24, 31-33). Enfin, la place de l'allogreffe de CSH dans ce groupe reste à évaluer. En effet, depuis le développement des conditionnements d'intensité atténuée, qui permettent une diminution de la mortalité liée au geste, l'allogreffe de CSH devient une option thérapeutique valable jusqu'à l'âge de 65 à 70 ans. Cependant, là encore, du fait des nombreux biais de recrutement dans les études, et des faibles effectifs, liés aux comorbidités des patients, la place de ce geste doit être précisée (24, 34).

Le second groupe est constitué des patients âgés de 75 ans ou plus. Chez ces patients, étant donné le très faible taux de réponse et les toxicités associées au traitement par chimiothérapie intensive, un traitement d'intensité réduite doit être proposé, notamment en cas de comorbidités, ou d'altération de l'état général. Il a été démontré que des injections d'aracytine à faibles doses étaient plus efficaces qu'un traitement par hydroxyurée (35), mais le bénéfice associé reste malgré tout très limité, avec une médiane de survie inférieure à six mois. L'utilisation d'autres produits de chimiothérapie est en cours d'évaluation.

Par ailleurs, en l'absence d'altération de l'état général, et en l'absence d'autre critère de mauvais pronostic, il semblerait qu'une partie de cette population puisse bénéficier d'un traitement plus intensif, comprenant au moins une induction par « 3+7 », notamment en cas de cytogénétique favorable, de mutations de *NPM1* et d'absence d'expression de la protéine ABCB1 (24, 36). Dans cette tranche d'âge, une évaluation stricte des autres facteurs de mauvais pronostic, et notamment des comorbidités associées à chaque patient paraît indispensable avant de recommander ce traitement. Le développement de stratégies alternatives à évaluer dans le cadre d'essais thérapeutiques de grande envergure paraît indispensable.

4. Autres thérapeutiques

De nombreuses molécules, en complément ou en alternative aux traitements standards, ont été testées avec plus ou moins de succès, ou sont en cours d'évaluation. Parmi elles, le gentuzumab, anticorps anti CD 33 couplé à un cytotoxique, semble avoir un intérêt, notamment chez les sujets âgés, à doses réduites et en monothérapie, avec une survie plus longue qu'avec l'utilisation d'aracytine à faibles doses. Son bénéfice global est par contre limité chez les sujets plus jeunes aux LAM de risque cytogénétique favorable (21, 37). L'utilisation d'inhibiteurs des protéines ABC, à plus ou moins larges spectres, comme la quinine, la ciclosporine, ou le PSC 833, ont eu des résultats variables selon les études, mais globalement limités (38-41). Les modulateurs épigénétiques, comme les inhibiteurs de la méthyltransférase (5-azacytidine), semblent également avoir un intérêt, et prolonger la survie globale chez les sujets âgés, notamment en cas de faible envahissement médullaire (42). Enfin, des thérapeutiques plus ciblées comme les inhibiteurs de FLT3 (AC220 ou PKC412), ou les inhibiteurs de la voie mTOR (rapamycine) sont en cours d'évaluation.

vi. Résultats des traitements

Malgré l'amélioration de la prise en charge globale des patients, le pronostic des LAM reste très sévère, en particulier chez les sujets âgés. En effet, même si la survie globale s'est améliorée dans les années 2000, par rapport aux années 1980, celle-ci reste d'environ 19,5 % à 5 ans et d'environ 17 % à 10 ans, d'après les analyses du registre américain (3), avec un pronostic toujours très défavorable chez les sujets âgés.

D'après l'analyse du registre suédois des cancers (*figure 2*), l'OS à 10 ans est plus élevée dans les populations plus jeunes, aux environs de 47 % pour les patients de moins de 35 ans et diminue rapidement avec l'âge : aux environs de 30 % dans la tranche d'âge de 35 à 54 ans, de moins de 20 % pour la tranche 55-64 ans, et de moins de 5 % pour les patients de plus de 65

ans (43). Les très mauvais résultats retrouvés dans cette dernière tranche d'âge peuvent sans doute être en partie reliés à l'impossibilité de proposer un traitement optimal à la maladie, en raison des trop grandes toxicités qui lui seraient associées, et par une probable plus grande complexité génétique de ces maladies.

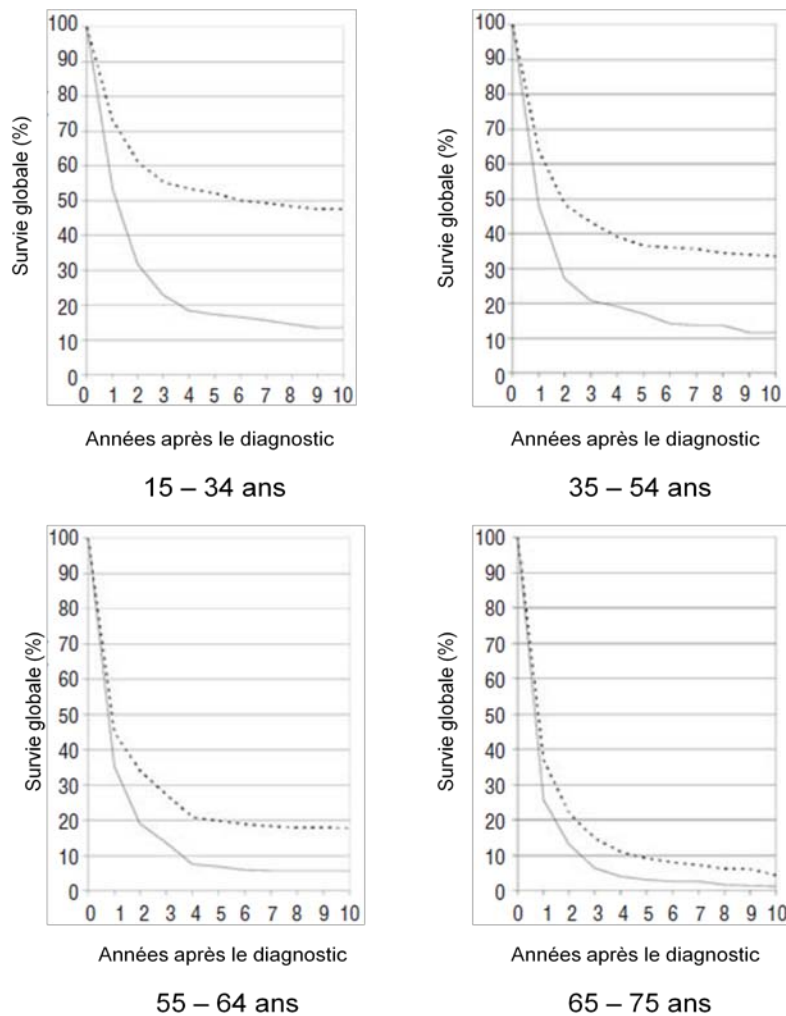


Figure 2 : Survie globale dans les LAM selon les tranches d'âge et d'après les données du registre suédois des cancers. Les lignes continues représentent les patients traités entre 1980 et 1984 et les lignes discontinues représentent les patients traités entre 2000 et 2004. (Adapté d'après Pulte et al.)

Cependant, au sein de chacune de ces tranches d'âge, les résultats des traitements restent hétérogènes. De très nombreux facteurs cliniques et biologiques, reflétant la grande diversité des LAM, ont été identifiés ces dernières années. Ils permettent d'estimer au mieux la

probabilité de réponse au traitement dès le diagnostic, d'adapter en conséquence le traitement, en proposant une éventuelle intensification par greffe de CSH allogéniques, ou d'éventuels traitements ciblés contre les anomalies moléculaires retrouvées.

B. Facteurs pronostiques dans les LAM

i. Facteurs pronostiques liés au patient

Comme déjà rappelé dans la partie précédente, l'âge reste un des principaux facteurs pronostiques des LAM. Même en tenant compte des autres facteurs, les patients plus âgés ont un pronostic global défavorable en comparaison des patients plus jeunes (44, 45) (*figure 2*). Cependant, même dans cette population, on note une grande diversité dans la survie, en fonction des autres facteurs pronostiques connus (45).

L'existence de comorbidités, comme une insuffisance rénale sévère, une insuffisance cardiaque, une insuffisance hépatique ou une obésité, est associée à un moins bon pronostic (46), du fait de l'impossibilité d'administrer un traitement adapté. Plus largement, la présence d'une altération de l'état général, reflétée par un score élevé sur l'échelle de l'ECOG (reprise par l'OMS) (47) (*annexe 3*), est un des facteurs pronostiques les plus importants (48). Le taux d'albumine au diagnostic, globalement corrélé à l'état général, permet également d'évaluer le pronostic dans les LAM.

Récemment, l'influence du niveau socio-économique a été mise en évidence, à partir d'une étude du registre suédois des cancers. Le pronostic des LAM serait plus défavorable chez les « cols bleus » que chez les « cols blancs » (49). De même, certaines études américaines ont démontré que le pronostic était moins favorable chez les sujets noirs que chez les blancs, avec un taux plus bas de RC et une OS plus courte, pouvant faire suspecter l'influence de facteurs socio-génétiques sur la réponse au traitement (50). Le tabagisme actif serait également un facteur de mauvais pronostic dans les LAM (51, 52).

ii. Facteurs pronostiques liés à la maladie

1. Chimiorésistance

La résistance de la maladie à la chimiothérapie, c'est-à-dire l'absence d'obtention de la RC après un traitement adapté, ou la rechute, est associée à un pronostic très sévère. Elle démontre en effet, par définition, le peu de sensibilité de la maladie au traitement. Même si un deuxième traitement intensif peut être administré dans cette situation, la probabilité d'y répondre est faible, et la survie globale de ces patients est très limitée (53, 54).

2. Paramètres reflétant la masse tumorale

Dans de multiples études, certains paramètres biologiques, qui reflètent une masse tumorale importante, ont été associés à un pronostic défavorable. Parmi eux, les deux principaux sont le nombre de leucocytes circulants au diagnostic, et le taux de lactate déshydrogénase (LDH) circulante. Les seuils à adopter pour considérer ces facteurs comme utiles au pronostic sont variables selon les études. Une étude récente (55) retrouve ces facteurs simples comme ayant une valeur pronostique indépendante, même en tenant compte des marqueurs moléculaires.

3. Cytogénétique

L'influence majeure du caryotype des cellules blastiques sur le pronostic global des LAM a été démontrée au début des années 1980 (56), puis confirmée dans plusieurs très larges études multicentriques dans les années 2000 (57-59). D'après ces différentes études, il apparaît que les patients peuvent être séparés en trois groupes en fonction de l'analyse cytogénétique initiale. A ces trois groupes est associée une survie globale plus ou moins longue (*figure 3*) : environ 55 % à 5 ans pour le groupe favorable, 40 % pour le groupe intermédiaire, et 10 % pour le groupe défavorable (58). La cytogénétique est maintenant une des pierres d'angle de la classification de l'OMS des LAM parue en 2008 (1).

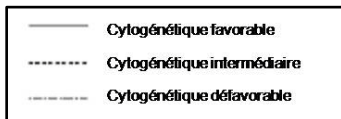
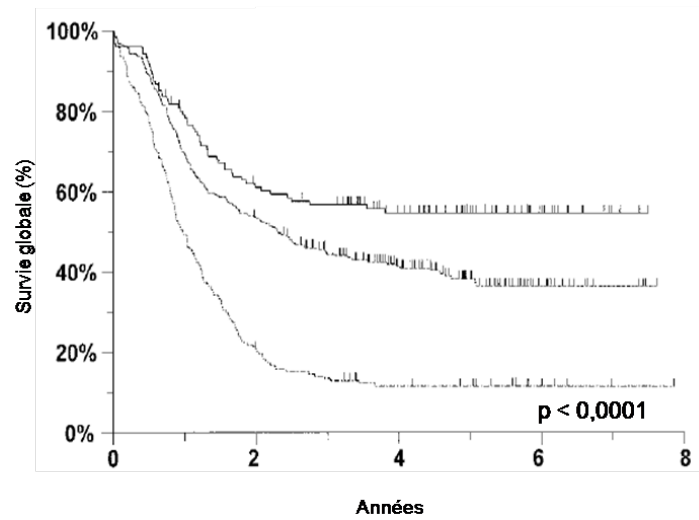


Figure 3 : Survie globale dans les LAM en fonction du risque cytogénétique. (Adapté d'après Marilyn et al.)

a. Anomalies associées à un pronostic favorable

Toutes les études ont retrouvé les mêmes anomalies :

- Translocation réciproque des chromosomes 8 et 21 (t(8;21) (q22 ; q22))
- Inversion péricentrique du chromosome 16 (inv(16) (p13.1q22)) ou translocation du chromosome 16 (t(16;16) (p13.1q22))
- Translocation réciproque des chromosomes 15 et 17 (t(15;17) (q22 ; q12))

b. Anomalies associées à un pronostic défavorable

Certaines anomalies ont été retrouvées par toutes les études :

- Délétion du bras long du chromosome 5 (5q-) et monosomie 5 (5-)
- Monosomie 7 (7-), et délétion du bras long du chromosome 7 (7q-)
- Translocation réciproque du chromosome 6 et du chromosome 9 (t(6 ;9)(p23 ;q34))
- Translocation réciproque du chromosome 9 et du chromosome 22 (t(9 ;22)(q34 ;q11))
- Inversion péricentrique du chromosome 3 (inv(3)(q21q26.2))
- Caryotype complexe, défini par l'association de 3 anomalies chromosomiques différentes, à l'exclusion des anomalies de bon pronostic.

D'autres anomalies comme les différentes atteintes du chromosome 11 (avec remaniements du gène *MLL*), ou la translocation t(1 ;22)(p13 ;q13), ou d'autres, ont pu être retrouvées dans certaines études, mais non confirmées par d'autres, et sont souvent considérées comme de pronostic intermédiaire.

c. Caryotypes associés à un pronostic intermédiaire

Les patients porteurs d'un caryotype normal, ou de toute autre anomalie qui ne correspond pas à celles décrites précédemment, ont été considérés, dans les différentes études, comme ayant à un pronostic intermédiaire. Cependant, au sein de ce groupe, la pratique clinique a montré que les résultats des traitements étaient très hétérogènes. Ce constat a conduit au développement de nouveaux marqueurs en biologie moléculaire, notamment pour tenter de prévoir au mieux la réponse au traitement.

4. Biologie moléculaire

Les principales anomalies moléculaires décrites dans les LAM, et notamment en cas de cytogénétique normale, et leurs valeurs pronostiques sont résumées dans le tableau 1.

Anomalie moléculaire	Fréquence dans les LAM à caryotype normal	Pronostic associé
FLT3/ITD	20 – 30 %	Défavorable
FLT3/TKD	10 %	Défavorable ou absence de valeur associée
Mutations de NPM1	40 – 60 %	Favorable si cytogénétique normale avec absence de FLT3/ITD
Mutations de CEBPA	8 – 20 %	Favorable si cytogénétique normale avec absence de FLT3/ITD (limitation aux doubles mutations ?)
MLL/PTD	5 – 11 %	Défavorable
Mutations d'IDH1	14 – 16 %	Défavorable si cytogénétique normale avec absence de FLT3/ITD et présence de mutation de NPM1
Mutations d'IDH2	11 – 21 %	Défavorable si cytogénétique normale avec absence de FLT3/ITD et présence de mutation de NPM1
Mutations de DNMT3A	33 %	Défavorable
Mutations de TET2	23 %	Défavorable si cytogénétique normale avec absence de FLT3/ITD et présence de mutations de NPM1 ou de CEBPA
Surexpression de BAALC	Non évaluable	Défavorable en cas de cytogénétique normale
Surexpression d'ERG	Non évaluable	Défavorable en cas de cytogénétique normale
Surexpression de MN1	Non évaluable	Défavorable en cas de cytogénétique normale
Surexpression d'Id1	Non évaluable	Défavorable chez les sujets jeunes
Surexpression d'Evi1	Non évaluable	Défavorable

Tableau 1 : Principales anomalies moléculaires décrites dans les LAM et valeur pronostique associée. La fréquence de surexpression des différents marqueurs n'est pas évaluable en raison d'une quantification relative dans chaque étude. La surexpression a été définie, dans les différentes études, soit par une expression du marqueur supérieure à la médiane ou au troisième quartile de l'ensemble de la population étudiée, soit par référence à une lignée cellulaire utilisée comme normalisation.

a. Duplication en tandem de FLT3

La « fms-like protéine kinase 3 » est une protéine trans-membranaire à activité tyrosine kinase (60, 61), normalement exprimée au niveau des progéniteurs hématopoïétiques. Il s'agit d'un récepteur à un facteur de croissance, nommé ligand de FLT3 (62), pouvant être également exprimé dans les cellules leucémiques (63). Son activation conduit à une cascade de phosphorylations intra-cytoplasmiques, aboutissant à une prolifération cellulaire accrue, et à une résistance à l'apoptose (64). Or, dans de nombreuses études à partir de lignées cellulaires de LAM, les duplications en tandem du domaine juxta-membranaire (*FLT3/ITD*) conduisent à une activation constitutive de FLT3, et à l'activation des voies de prolifération sous-jacentes (65) (*figure 1*). Ces duplications en tandem ont été décrites chez 20 à 30 % des patients atteints de LAM (29, 66-69) et associées à un pronostic défavorable (67, 68), en particulier chez les patients à cytogénétique normale (29). La recherche de *FLT3/ITD* est hautement recommandée dans la classification OMS des LAM de 2008 (1). Il existe également des mutations dans le domaine tyrosine kinase de FLT3 (*FLT3-TKD*), mais leur rôle dans la pathogénie des LAM et leur implication pronostique est encore discutée, avec un impact sur la survie contradictoire selon les différentes études (70, 71).

b. Mutations de NPM1

La nucléophosmine (NPM1) est une protéine chaperon, de localisation préférentiellement nucléaire, capable de faire la navette entre le cytoplasme et le noyau des cellules, qui joue un rôle dans la régulation de la transcription, et qui assure le transport et l'assemblage des particules pré-ribosomales dans le cytoplasme. NPM1 agit également comme contrôle de la voie de la protéine p53 (72). Plusieurs types de mutations de *NPM1*, localisées au niveau de l'exon 12 (73, 74), ont été identifiées chez les patients atteints de LAM. Elles ont comme conséquence l'accumulation intra cytoplasmique de la protéine (73), et la perte de sa fonction

normale, par défaut de localisation nucléaire. Les trois types A, B et D représentent à eux trois plus de 90 % des mutations de *NPM1* (73-75). Ces dernières sont retrouvées dans environ 25 % de l'ensemble des LAM (74), et dans 40 à 60 % des LAM à caryotype normal (29, 69, 73, 75). Dans la plupart des études, la présence de mutations de *NPM1*, dans les LAM à caryotype normal, et en l'absence de *FLT3/ITD*, confère un pronostic favorable (29, 69, 73, 75), mais certaines ne retrouvent pas cette implication pronostique (69, 74, 76). Les LAM avec présence de mutations de *NPM1* sont considérées comme une entité provisoire particulière dans la classification OMS des LAM de 2008 (1).

c. Mutations de CEBP alpha

La « CAAT/enhancer binding protein alpha » (CEBPA) est un facteur de transcription, qui joue un rôle essentiel dans la maturation finale de la lignée granulocytaire (77, 78). Sa délétion, dans des modèles murins, conduit à l'absence totale de granuleux matures (79). Des mutations dans un des trois domaines actifs de *CEBPA* (domaine leucine zipper, ou domaines trans-activateurs TAD1 et TAD2), conduisant à une perte d'activité, ont été décrites chez environ 10 % à 15 % des patients atteints de LAM (80, 81) et dans 8 à 20 % des LAM à cytogénétique normale (29, 82-84). Elles ont été associées, dans ce dernier sous-groupe, à un pronostic favorable, en l'absence de *FLT3/ITD* (29, 69, 81, 83-85). Certaines études n'ont ensuite retrouvé de valeur pronostique aux mutations de *CEBPA* qu'en cas d'atteinte des deux allèles, une mutation simple n'ayant pas de valeur en soi (86-88). Ces doubles mutations ne sont retrouvées que dans 3 à 4 % des LAM à caryotype normal, réduisant l'intérêt pratique de l'utilisation de *CEBPA* comme marqueur pronostique (86-88). Les LAM avec présence de mutation de *CEBPA* sont considérées comme une entité provisoire particulière dans la classification OMS des LAM de 2008 (1).

d. Expression de BAALC

La protéine BAALC (« Brain And Acute Leukemia, Cytoplasmic »), de fonction inconnue, est retrouvée dans les tissus dérivés du neurectoderme, dans les précurseurs hématopoïétiques normaux, ainsi que, de manière aberrante, dans des cellules de patients porteurs de LAM (89). La surexpression de *BAALC*, dans les LAM à caryotype normal, a été associée à un pronostic défavorable, d'abord chez les sujets de moins de 60 ans (90-92), puis chez les sujets plus âgés (93). Par ailleurs, les patients avec un haut niveau d'expression de *BAALC* ont un risque plus important d'être porteurs d'autres anomalies biologiques, comme par exemple de *FLT3/ITD*, de mutation de *CEBPA*, ou d'une haute expression de « *l'Ets related gene* » (*ERG*). Une haute expression de *BAALC* est également associée à une absence de mutation de *NPM1* (92). A noter que, dans une étude comparant la valeur pronostique de plusieurs marqueurs biologiques dans la LAM, et incluant notamment l'expression de *BAALC* et l'expression d'*ERG*, *BAALC* n'avait pas de valeur pronostique indépendante (94). L'étude de l'expression de *BAALC* dans les LAM est peu réalisée en pratique courante, du fait des difficultés de standardisation des techniques, et de la difficulté de déterminer une valeur seuil définissant la surexpression.

e. Autres marqueurs

De nombreuses autres anomalies moléculaires ont été décrites ces dernières années dans les LAM, en particulier en cas de cytogénétique normale, et ont été associées à une valeur pronostique pour la réponse au traitement. Ces différentes anomalies sont retrouvées avec des fréquences très variables. On peut citer notamment, les mutations des gènes de l'isocitrate déshydrogénase 1 (*IDH1*) et 2 (*IDH2*) (95-97), les mutations des gènes *DNMT3A* (98), *TET2* (99), ou *N-RAS* (100), les duplications partielles du gène *MLL* (101), la surexpression de *ERG* (102, 103), la surexpression d'*Id1* (104), la surexpression de *MNI* (105), ou la surexpression de *Evi1* (106).

En plus de ces anomalies impliquant différents gènes, l'expression de certains microARN (miRNA) a également une valeur pronostique dans les LAM (107).

Etant donné le nombre croissant de marqueurs, et leur corrélation, il paraît difficile, à l'heure actuelle, de proposer une classification claire, ou un arbre décisionnel simple, à partir de ces anomalies (69). Certaines équipes proposent cependant l'établissement de scores pronostiques, en tenant compte de différents paramètres cliniques, biochimiques, cytogénétiques ou moléculaires, afin de prévoir la probabilité de réponse au traitement. Malheureusement, ces scores peuvent s'avérer difficiles à utiliser en pratique quotidienne, notamment du fait des difficultés à définir des seuils adaptés pour la surexpression des différents marqueurs (55).

5. Les protéines ABC

a. Généralités

Dans de nombreuses lignées cellulaires dérivées de cancers solides ou de leucémies, il a été observé, au cours des années 1980, l'existence de résistances croisées à plusieurs produits de chimiothérapies. Ce phénomène a été appelé phénotype MDR (pour « Multi Drug Resistance ») (108) et a d'abord été relié à la présence, dans la membrane plasmique, de la glycoprotéine P (Pgp) (109), résultant de l'expression du gène *MDR1* (110-112). Ensuite, d'autres protéines comme la protéine MRP (« Multi drug Resistance associated Protein ») (113) ou la protéine BCRP (« Breast Cancer Resistance Protein ») (114) ont été décrites comme participant au phénotype MDR. Ces trois protéines appartiennent à la même famille des transporteurs ABC (« ATP Binding Cassette »), constituée, dans l'espèce humaine, de quarante-neuf membres au total. Il s'agit de protéines transmembranaires, possédant des capacités d'efflux de différentes molécules en dehors du milieu intra cellulaire, et notamment de différents produits de chimiothérapie (115). Le défaut d'accumulation des cytotoxiques dans le cytoplasme serait à l'origine du phénotype MDR, et de la sensibilité diminuée à la chimiothérapie. D'autres protéines d'efflux, qui n'appartiennent pas à la famille des protéines ABC, peuvent également avoir un impact sur la chimio résistance, comme par exemple la protéine LRP (« Lung Resistance Protein ») (116).

De manière physiologique, de nombreuses protéines de la famille ABC sont exprimées dans les cellules hématopoïétiques les plus immatures (définies par le phénotype CD 34+ CD 38-). Bien qu'également présentes dans les cellules souches non hématopoïétiques, l'expression des protéines ABC est plus diversifiée dans les CSH (117), faisant supposer un rôle particulier pour elles dans la fonction de ces cellules. Cette expression diminue au cours de la maturation cellulaire (118, 119), ce qui permet, d'autre part, de postuler, pour ces protéines, un rôle de

protection des CSH contre les xénobiotiques, afin de permettre le maintien d'un compartiment hématopoïétique normal malgré l'exposition aux toxiques.

b. ABCB1

La protéine ABCB1, également connue sous le nom PgP, ou de MDR1, a été la première protéine reliée au phénotype MDR dans les cancers humains (109). Il s'agit d'une protéine membranaire de 170 kDa, qui fonctionne comme une pompe transmembranaire. Elle possède une activité ATPase (120, 121), et la capacité d'effluer en dehors du cytoplasme différents produits de chimiothérapie, dont certains sont utilisés dans le traitement des LAM, comme notamment les anthracyclines, l'amsacrine, la mitoxantrone, les alcaloïdes de la pervenche, et l'étoposide. Son expression par transfection d'ADN complémentaire dans des lignées cellulaires sensibles est suffisante à l'obtention du phénotype MDR (122).

Le rôle de l'expression d'*ABCB1* dans la LAM a été très étudié dans les années 1990. La proportion de patients exprimant *ABCB1* est variable selon les études, du fait des différentes techniques de mesure utilisées (de 20 à 70 % des patients), et est globalement associée à un pronostic défavorable, avec une diminution franche du taux de RC et/ou de l'OS, chez les patients jeunes. Cet effet est encore plus marqué chez les patients âgés (123-125). L'expression d'*ABCB1* a été associée, dans les différentes études, à l'expression membranaire de CD 34 (123, 125), et au caractère secondaire des LA (125).

Du fait du caractère pronostique de l'expression d'*ABCB1*, et de l'existence de nombreuses drogues permettant de moduler son activité, comme par exemple la ciclosporine ou le verapamil, (126, 127), ABCB1 a rapidement été définie comme une cible thérapeutique potentielle dans la LAM.

De nombreux tests étudiant le caractère fonctionnel d'*ABCB1* ont été développés. Ces différents tests utilisent des sondes fluorescentes, substrats d'*ABCB1*, associées à des

inhibiteurs plus ou moins spécifiques d'ABCB1. La mesure, en cytométrie de flux, de la différence d'intensité de fluorescence de cellules incubées avec la sonde, en présence ou en l'absence d'un inhibiteur, permet de déduire le caractère fonctionnel ou non de la protéine sur les cellules testées. L'absence de différence dans les niveaux de fluorescence reflète donc l'absence de fonctionnalité, et la présence d'une grande différence reflète un haut niveau fonctionnel (*figure 4*). La performance de ces tests va donc dépendre de la spécificité des sondes, c'est-à-dire de leur capacité à être effluées par d'autres mécanismes, et de la spécificité des modulateurs utilisés. Parmi les différents tests, on peut citer l'utilisation de DIOC2 +/- Ciclosporine A, de DIOC2 +/- PSC833, de daunorubicine +/- ciclosporine A (128), de rhodamine 123 +/- ciclosporine A ou de JC-1 +/- ciclosporine A (129).

Une forte activité d'ABCB1 sur les cellules blastiques au diagnostic a été reliée à un pronostic global défavorable pour les patients. Il est par ailleurs intéressant de noter que, malgré une bonne corrélation globale entre les tests fonctionnels d'ABCB1 et son niveau d'expression, certains patients montrent une discordance entre ces deux paramètres, avec une possibilité de haute expression sans fonctionnalité, ou au contraire d'une forte fonctionnalité, sans expression importante (128). La mesure de l'activité d'ABCB1, directement corrélée à l'accumulation intra-cytoplasmique des drogues, paraît un meilleur reflet de la chimiorésistance que celle de son expression. De plus, la possibilité de l'association d'une forte activité à une faible expression d'ABCB1 a suggéré que d'autres mécanismes d'efflux pouvaient être impliqués dans le phénotype MDR, et que les tests d'activité utilisés n'étaient en fait pas spécifiques d'ABCB1, mais pouvaient refléter également l'activité d'autres transporteurs. En effet, même si la plupart des tests précédemment cités ont initialement été développés pour ABCB1, leur caractère spécifique à ce transporteur n'a jamais été totalement démontré.

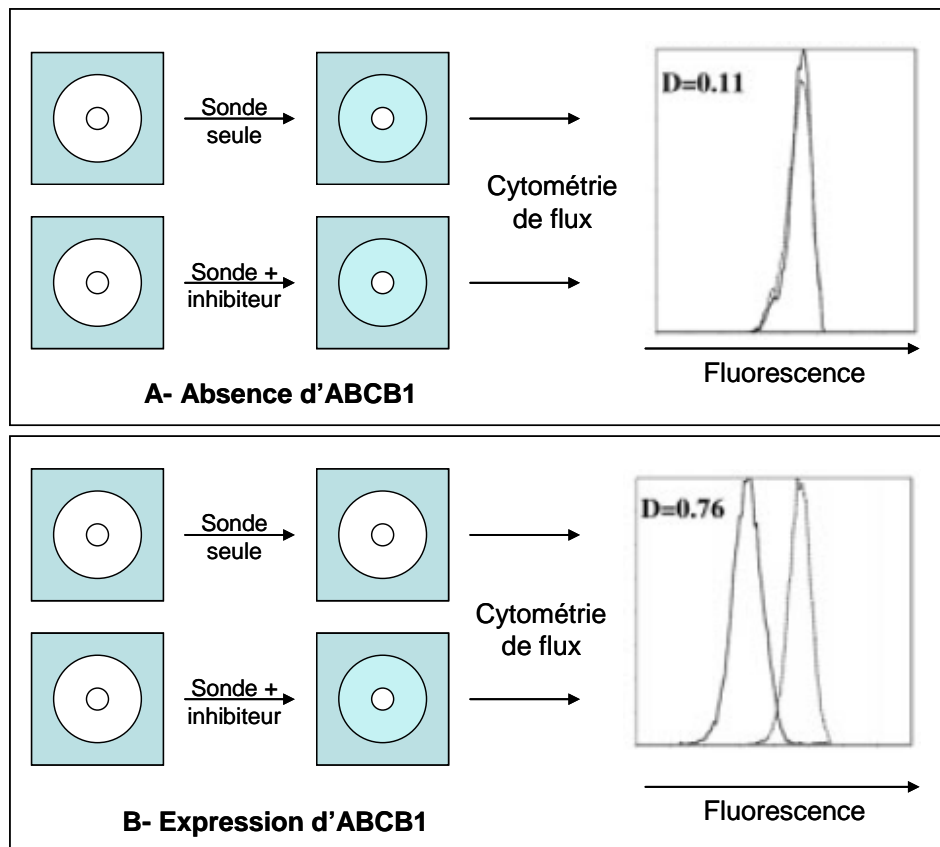


Figure 4 : Principe des tests de fonctionnalité d'ABCB1. Partie A : en l'absence d'activité d'ABCB1, l'incubation des cellules leucémiques en présence d'une sonde spécifique d'ABCB1, ou d'une sonde et d'un inhibiteur spécifiques aboutit à l'accumulation intra cytoplasmique de la sonde par défaut d'extrusion. Les courbes de fluorescence cytoplasmique, mesurée en cytométrie de flux, sont superposables. Partie B : en cas d'expression et d'activité d'ABCB1, les sondes spécifiques, en l'absence d'inhibiteur spécifique, sont effluées en dehors du cytoplasme, résultant à l'absence de fluorescence intra cytoplasmique. En présence de sonde et d'inhibiteur spécifiques d'ABCB1, la sonde s'accumule dans le cytoplasme, résultant en une fluorescence intra cytoplasmique importante. Les courbes de fluorescence ne seront pas superposables. La différence entre les courbes de fluorescence est évaluée par le test de Kolmogorov-Smirnov (valeur D).

c. ABCC1

La protéine ABCC1, connue également sous le nom de MRP1 a été identifiée en 1992, à partir d'une lignée de cancer pulmonaire résistante aux anthracyclines (113). Son expression par transfection d'ADN complémentaire dans des lignées sensibles suffit à leur conférer une résistance aux anthracyclines, aux alcaloïdes de la pervenche, aux épipodophyllotoxines, aux camptothécines et au méthotrexate (130, 131). Son implication dans la résistance à la chimiothérapie dans les LAM, et son rôle pronostique, ont été beaucoup plus discutés que pour ABCB1 (132). La moitié des études montre qu'une forte activité d'ABCC1, testée par la

calcéine AM, est associée à une diminution du taux de RC (133, 134). L'impact sur la survie globale est encore plus discuté, mais a été démontré dans certaines études, s'intéressant soit à son expression, soit à sa fonctionnalité (133, 135). D'autres études, au contraire, n'ont montré aucun impact (136-138).

d. ABCG2

La protéine ABCG2, appelée également BCRP a été isolée en 1998, à partir d'une lignée de cancer du sein résistante à la chimiothérapie (114). Son expression par transfection d'ADN complémentaire dans des lignées cellulaires cancéreuses sensibles est suffisante pour leur conférer une capacité d'efflux de la daunorubicine, de la doxorubicine, de la mitoxantrone et du topotecan (114, 139). L'expression d'*ABCG2* sur des cellules de LAM a été démontrée en 2000 (140), mais, comme pour les autres protéines ABC, les niveaux d'expression retrouvés sont très variables selon les techniques utilisées (141, 142). L'expression d'*ABCG2* a été reliée à un pronostic défavorable dans les LAM en cas de traitement d'induction comprenant de la daunorubicine ou de la mitoxantrone (143) et également dans une série de patients traités par idarubicine (144). Des tests d'activités d'*ABCG2* ont été développés selon le même principe que pour les autres protéines ABC (mitoxantrone + fumitremogine C). Une forte activité a été retrouvée dans environ 30 % des LAM, et associée à un pronostic défavorable (145), avec un taux plus bas de RC et une survie globale plus courte.

e. Les autres protéines ABC

D'autres membres de la famille des protéines ABC, parmi les quarante-neuf décrits chez l'homme, ont démontré leur capacité à effluer les cytotoxiques dans des modèles de lignées de cancers solides, et leur implication pronostique dans la réponse à la chimiothérapie (146, 147). Le rôle de ces autres protéines ABC a globalement été peu étudié dans les LAM, mais il est probable que certaines d'entre elles soient impliquées dans la chimiorésistance. En effet,

une étude de profils d'expression génique a montré la présence de nombreux membres de la famille des transporteurs ABC dans les cellules leucémiques (119), et une autre étude, la surexpression de quatre « nouveaux » membres de cette famille dans la moelle d'enfants atteints de LAM par rapport à des moelles d'enfants sains (148). De plus, une étude récente a montré que les expressions d'*ABCG1* et d'*ABCB6* étaient également associées à un pronostic défavorable dans les LAM de l'adulte (149). Enfin, on peut citer la protéine *ABCC3*, capable d'effluer plusieurs drogues, dont l'étoposide et le méthotrexate, et dont l'implication pronostique a été démontrée par des tests d'expression et de fonctionnalité dans les LAM (145, 150).

f. Protéines ABC et autres marqueurs moléculaires

Les relations entre l'expression ou la fonctionnalité des protéines ABC, et en particulier d'*ABCB1*, et l'expression des autres marqueurs biologiques ont été très peu étudiées. On ne retrouve pas, dans la littérature, d'étude discutant des relations entre les protéines ABC et les mutations *NPM1*, les mutations de *CEBPA*, ou l'expression de *BAALC*. Les relations entre *FLT3/ITD* et *ABCB1* ont, quant à elles, été partiellement étudiées. Dans les deux seules études menées sur le sujet, il a été retrouvé un taux de *FLT3/ITD* beaucoup plus faible dans les populations avec une haute expression ou une haute fonctionnalité d'*ABCB1* (135), et la présence simultanée de *FLT3/ITD* et d'une haute fonctionnalité d'*ABCB1* a été associée à un pronostic très défavorable (151).

C. Problématique

Nous étudierons, dans le présent travail, les relations entre l'activité d'ABCB1, la présence de *FLT3/ITD*, des mutations de *NPM1* et de *CEBPA*, et l'expression de *BAALC*. Nous étudierons également si l'activité d'ABCB1 reste un facteur pronostique indépendant dans une cohorte de 206 patients traités pour LAM.

II- Matériel et méthodes

A- Patients et traitement

i. Critères d'inclusion et critères d'exclusion

Tous les patients suivis dans le Département d'Hématologie de l'Hôtel-Dieu de Paris de 1996 à 2008 et traités pour une LAM dans les protocoles thérapeutiques de l'Organisation Européenne pour la Recherche et le Traitement du Cancer (EORTC) AML 10, AML 12 et AML 13, ou selon ces protocoles, étaient incluables dans cette étude. Parmi ces patients, tous ceux pour lesquels du matériel cellulaire ou génétique (ADN et ARN) était disponible en tumorotheque (Tumorotheque Leucémies, Hôtel-Dieu, APHP, n°579) ont été inclus. Un consentement éclairé pour la conservation et l'utilisation du matériel cellulaire a été signé au moment de son recueil, au moment du diagnostic. Les critères d'inclusion et d'exclusion détaillés dans les protocoles AML 10, AML 12 et AML 13 sont consultables en annexe (*annexe 4 et 5*).

Les patients âgés de 15 à 60 ans inclus dans cette étude ont été traités dans les protocoles AML 10 ou AML 12, selon la période d'ouverture des protocoles. Dans ces deux études, les patients suivis pour un syndrome myélodysplasique ou pour un syndrome myéloprolifératif chronique avant le diagnostic de LA étaient exclus.

Les patients âgés de 61 ans ou plus ont été traités dans le protocole AML 13. Dans ce protocole, les patients ayant reçu une chimiothérapie antérieure, ou suivis pour un syndrome myéloprolifératif chronique, leucémie myéloïde chronique y compris, étaient exclus.

En cas de refus de participation aux études de l'EORTC, les patients ont été traités selon le bras de référence des études proposées, à la période correspondant à l'ouverture de celles-ci.

Les patients pour lesquels il existait un critère d'exclusion aux différents protocoles, sans contre-indication formelle au traitement, ont également été traités selon le bras de référence

de ces mêmes protocoles. Enfin, les patients traités à une période pendant laquelle ces différents protocoles n'étaient pas ouverts ont été traités selon le bras de référence des différents protocoles.

Tous les patients porteurs de LA promyélocytaire (LAM 3 selon la classification FAB) ont été exclus de l'étude, en raison du caractère spécifique du traitement, ainsi que les patients porteurs d'une translocation t(9;22)(q34 ;q11).

Au total, 206 patients âgés de 16 à 81 ans, ont été inclus dans cette étude.

ii. Traitements de première ligne

1. Patients âgés de moins de 60 ans

a. Le protocole AML 10

Dans ce protocole, le traitement consistait en une chimiothérapie d'induction comprenant les drogues suivantes :

- ARACYTINE IV : 25 mg/m² en bolus à J1, et 100 mg/m²/j en perfusion continue de J1 à J10
- ETOPOSIDE IV : 100 mg/m²/j de J1 à J5
- Une des 3 anthracyclines suivantes, selon la randomisation :
 - DAUNORUBICINE IV : 50 mg/m²/j à J1, J3 et J5
 - MITOXANTRONE IV : 12 mg/m²/j à J1, J3 et J5
 - IDARUBICINE IV : 10 mg/m²/j à J1, J3 et J5

En cas d'absence de rémission complète, un second traitement d'induction, identique au premier était administré.

		J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Aracytine	25 mg/m ²	x									
Aracytine	100 mg/m ²	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
Etoposide	100 mg/m ²	x	x	x	x	x					
Selon randomisation											
Daunorubicine	50 mg/m ²	x		x		x					
ou											
Mitoxantrone	12 mg/m ²	x		x		x					
ou											
Idarubicine	10 mg/m ²	x		x		x					

Tableau 2 : Résumé du traitement d'induction dans le protocole AML 10

En cas d'obtention de la rémission complète, un traitement unique de consolidation était administré, qui comprenait les drogues suivantes :

- ARACYTINE IV : 500 mg/m²/12h de J1 à J6
- Une anthracycline identique à celle de la cure d'induction (selon la randomisation) :
 - DAUNORUBICINE IV : 50 mg/m²/j de J4 à J6
 - MITOXANTRONE IV : 12 mg/m²/j de J4 à J6
 - IDARUBICINE IV : 10 mg/m²/j de J4 à J6

		J1	J2	J3	J4	J5	J6
Aracytine	500 mg/m ² /12h	x	x	x	x	x	x
Selon randomisation							
Daunorubicine	50 mg/m ²				x	x	x
ou							
Mitoxantrone	12 mg/m ²				x	x	x
ou							
Idarubicine	10 mg/m ²				x	x	x

Tableau 3 : Résumé du traitement de consolidation dans le protocole AML 10

Une intensification thérapeutique était pratiquée dans les suites (*voir paragraphe c*).

b. Le protocole AML 12

Dans ce protocole, le traitement consistait en une chimiothérapie d'induction comprenant les drogues suivantes :

- DAUNORUBICINE IV : 50 mg/m²/j à J1, J3 et J5
- ETOPOSIDE IV : 100 mg/m²/j de J1 à J5
- ARACYTINE IV à une des deux posologies suivantes (selon la randomisation) :
 - 25mg/m² en bolus à J1, suivi de 100 mg/m²/j en perfusion continue de J1 à J10
 - 3 g/m²/12h à J1, J3, J5 et J7

		J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10
Etoposide	100 mg/m ²	x	x	x	x	x					
Daunorubicine	50 mg/m ²	x		x		x					
Selon randomisation											
Aracytine	25 mg/m ²	x									
Aracytine	100 mg/m ²	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
ou											
Aracytine	3 g/m ² /12h	x		x		x		x			

Tableau 4 : Résumé du traitement d'induction dans le protocole AML 12

En cas d'absence de rémission complète, un second traitement d'induction, identique au premier était administré.

En cas d'obtention de la rémission complète, un traitement unique de consolidation était administré, qui comprenait :

- DAUNORUBICINE IV : 50 mg/m²/j de J4 à J6
- ARACYTINE IV : 500 mg/m²/12h de J1 à J6

		J1	J2	J3	J4	J5	J6
Aracytine	500 mg/m ² /12h	x	x	x	x	x	x
Daunorubicine	50 mg/m ²				x	x	x

Tableau 5 : Résumé du traitement de consolidation dans le protocole AML 12

Une intensification thérapeutique était pratiquée dans les suites (*voir paragraphe c*), suivie, selon une seconde randomisation d'un traitement d'entretien par injection d'interleukine 2, ou d'une période d'observation simple.

c. Intensification thérapeutique

Dans les 2 protocoles AML 10 et AML 12, une intensification thérapeutique était systématiquement proposée.

En cas d'existence d'un donneur géno-identique, chez les patients âgés de moins de 45 ans, et en l'absence de contre-indication, on proposait une greffe de cellules souches hématopoïétiques allogéniques.

En l'absence de donneur géno-identique, et chez les patients âgés de plus de 45 ans, on proposait une greffe de cellules souches autologues, avec recueil de cellules souches périphériques à la sortie d'aplasie de la cure de consolidation, et sans traitement particulier sur les cellules obtenues.

Dans les 2 cas, le conditionnement consistait en l'administration des traitements suivants :

- Irradiation corporelle totale (ICT) : 12 Gy, fractionnés de J-8 à J-5
- BUSULFAN PO : 4 mg/kg/j en cas d'impossibilité d'ICT, de J-8 à J-5
- CYCLOPHOSPHAMIDE IV : 60 mg/kg/j à J-4 et J-3

En cas d'allogreffe de cellules souches, la prophylaxie de la maladie du greffon contre l'hôte était assurée par de la ciclosporine. Au total, dans cette étude, 46 patients ont reçu une greffe de CSH allogéniques en première RC.

2. Patients de plus de 60 ans : AML 13

Dans ce protocole, le traitement consistait en une chimiothérapie d'induction comprenant :

- MITOXANTRONE IV : 7 mg/m²/j à J1, J3 et J5
- ARACYTINE IV: 100 mg/m²/j de J1 à J7 en administration continue
- ETOPOSIDE IV : 100 mg/m²/j de J1 à J3
- LENOGRASTIM 150 µg/m² : pendant la chimiothérapie et/ou après la fin de la chimiothérapie, selon randomisation.

		J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	... J28
Mitoxantrone	7 mg/m ²	x		x		x					
Aracytine	100 mg/m ²	x	x	x	x	x	x	x			
Etoposide	100 mg/m ²	x	x	x							
Selon randomisation											
Lenograstim	150 µg/m ²								x	x	x
Lenograstim	150 µg/m ²	x	x	x	x	x	x	x			

Tableau 6 : Résumé du traitement d'induction dans le protocole AML 13

En cas d'absence de rémission complète, une seconde cure, identique à la première était administrée.

En cas d'obtention de la rémission complète, une cure de consolidation était pratiquée et comportant selon la randomisation :

Soit :

- IDARUBICINE IV : 8 mg/m²/j à J1, J3 et J5
- ETOPOSIDE IV : 100 mg/m²/j de J1 à J3
- ARACYTINE IV: 100 mg/m²/j de J1 à J5 en administration continue

		J1	J2	J3	J4	J5
Aracytine IV	100 mg/m ²	x	x	x	x	x
Idarubicine IV	8 mg/m ²	X		x		x
Etoposide IV	100 mg/m ²	X	x	x		

Tableau 7 : Résumé du premier bras de consolidation dans le protocole AML 13

Soit :

- IDARUBICINE PO : 20 mg/m²/j à J1, J3 et J5
- ETOPOSIDE PO 50 mg/m²/12h de J1 à J3
- ARACYTINE SC: 50 mg/m²/12h de J1 à J5

		J1	J2	J3	J4	J5
Aracytine SC	50 mg/m ² /12h	x	x	x	x	x
Idarubicine IV	20 mg/m ²	x		x		x
Etoposide PO	50 mg/m ² /12h	x	x	x		

Tableau 8 : Résumé du second bras de consolidation dans le protocole AML 13

Une intensification thérapeutique par autogreffe de CSH pouvait éventuellement être proposée aux patients âgés de moins de 70 ans et selon leur état général (modalités identiques que pour les protocoles AML 10 et AML 12).

iii. Traitement des rechutes

En cas de rechute, la majorité des patients a reçu un traitement de seconde ligne associant une anthracycline (IDARUBICINE ou DAUNORUBICINE), associée à de l'ARACYTINE IV à fortes doses. Une partie des patients a été traitée par un anticorps anti CD33 associé à de la chimiothérapie (gemtuzumab). Suivant l'âge, l'état général, la disponibilité d'un donneur non géno-identique, et l'obtention de la rémission complète, une intensification thérapeutique par allogreffe de CSH a été proposée aux patients.

iv. Suivi

Après la fin du traitement, les patients ont été suivis régulièrement sur les plans cliniques et biologiques. Le temps de suivi médian des patients inclus dans cette étude est de cinq ans.

B- Données cliniques et biologiques

i. Données recueillies au diagnostic

Les données cliniques des patients ont été recueillies le jour du diagnostic, incluant l'âge, le sexe, les antécédents de chimiothérapie ou d'autre pathologie hématologique prédisposante (syndrome myéloprolifératif chronique ou syndrome myélodysplasique), et l'état général (défini par le score de l'ECOG). La numération globulaire et la formule sanguine ont été recueillies le jour du diagnostic. Les analyses cytologiques sanguines et médullaires, les analyses cytogénétiques, les analyses phénotypiques en cytométrie en flux, et les tests de fonctionnalité d'ABC1 sur les cellules tumorales (JC-1) ont été réalisées sur les échantillons sanguins ou médullaires frais, prélevés au diagnostic, et avant tout traitement.

1. Analyse cytologique

Une analyse cytologique des échantillons sanguins et médullaires a été pratiquée systématiquement au laboratoire de cytologie, après coloration des frottis au May Grünwald-Giemsa, pour affirmer le diagnostic. La maladie des patients a été classée selon la classification franco américaine et britannique (152) (*annexe 2*) et/ou selon la classification de l'OMS (1) (*annexe 1*).

2. Analyse cytogénétique

Le caryotype des cellules blastiques a été déterminé au diagnostic, à partir de cultures cellulaires d'échantillons sanguins ou médullaires bloquées en métaphase, par la méthode conventionnelle en bandes G. L'interprétation des caryotypes a été pratiquée selon le système international de nomenclature cytogénétique. La normalité du caryotype a été retenue après l'examen d'au moins 20 cellules en métaphase sans anomalie. Les patients ont été divisés en trois groupes selon le pronostic associé aux anomalies cytogénétiques comme décrit dans

l'introduction (*paragraphe I.B.ii.3.*) (57-59). Chez deux patients, l'analyse n'a pas pu être pratiquée en raison de l'échec de la technique.

3. Analyse en cytométrie de flux

Un immunophénotypage complet des cellules blastiques sanguines ou médullaires a été systématiquement pratiqué au diagnostic afin de confirmer le diagnostic de LAM. Chaque marqueur testé a été considéré comme exprimé quand la recherche était positive dans au moins 20 % des cellules blastiques. Chez 35 patients, l'information concernant l'expression du CD 34 n'a pas été retrouvée.

4. Fonctionnalité d'ABCB1

a. La sonde JC-1

La sonde JC-1 (ou 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanine iodide), qui est un substrat d'ABCB1, est une carbocyanine pouvant former des cristaux liquides. Une des propriétés de cette sonde, liée à l'agrégation des cristaux liquides, est d'émettre une fluorescence de longueur d'onde différente en fonction de sa concentration. Après excitation (avec un faisceau de longueur d'onde de 490 nm) et en basse concentration (sous forme de monomères), la sonde JC-1 émet en effet une fluorescence de longueur d'onde moyenne de 537 nm (bande verte). Au-delà d'une concentration critique, les cristaux de JC-1 s'agrègent, et émettent, en plus de la bande verte, une fluorescence de longueur d'onde moyenne de 597 nm (bande rouge). En l'absence d'extrusion de JC-1, le dépassement des concentrations critiques intracellulaires entraîne la cristallisation, et on peut donc observer les 2 bandes de fluorescence. A l'inverse, sur les cellules résistantes par hyperactivité d'ABCB1, la concentration intracellulaire de sonde JC-1 diminue par extrusion, ne dépassant pas la concentration critique de cristallisation, ce qui ne permet pas d'observer la bande de fluorescence rouge. L'application de cette propriété permet, en utilisant la sonde JC-1 en

présence ou non d'un inhibiteur d'ABCB1, un test très sensible de la fonctionnalité d'ABCB1 (153). Tout comme pour les autres tests fonctionnels développés pour ABCB1, son caractère entièrement spécifique n'a pas été démontré.

b. Mesure de la fonctionnalité d'ABCB1

La fonctionnalité d'ABCB1 a été mesurée en cytométrie de flux au moment du diagnostic, sur des cellules sanguines ou médullaires, en utilisant la sonde JC-1 (129, 153) et la ciclosporine, selon le principe décrit dans l'introduction (*figure 4*). Après un lavage avec un tampon phosphate salin (PBS), les cellules, à la concentration de 5×10^5 /ml ont été séparées en 2 groupes : le premier a été incubé à 37°C pendant 15 minutes en présence de sonde JC-1 à la concentration de $0,1 \mu\text{M}$, et d'un modulateur d'ABCB1 (ciclosporine à la concentration de $2 \mu\text{M}$) ; le second groupe a été incubé dans les mêmes conditions avec la sonde JC-1 et en l'absence de modulateur. Après deux lavages en PBS, la fluorescence cellulaire a été mesurée avec un cytomètre de flux équipé d'un laser à Argon d'une longueur d'onde de 488 nm et de trois détecteurs de fluorescence : FL1 (filtre de bande passante à 530 nm), FL2 (filtre à 585 nm) et FL3 (filtre à 650 nm). La fluorescence a été étudiée sur les canaux FL1 et FL2 pour la détection des formes monomériques et agrégées de JC-1. La population blastique a été définie par l'expression faible du CD45 (détectée sur le canal FL3 par l'utilisation d'un anticorps spécifique) et l'étude de la fonctionnalité d'ABCB1 a été limitée à cette population. Le résultat a été exprimé sous forme d'une variable D, générée par le test de Kolmogorov-Smirnov, qui compare les fonctions de distribution de fluorescence recueillies sur les populations cellulaires d'intérêt entre les 2 groupes (en présence ou en l'absence de ciclosporine). D est compris entre 0 (absence de différence) et 1 (absence de recouvrement). Une valeur de D supérieure ou égale à 0,6 a été considérée comme le reflet d'une haute fonctionnalité d'ABCB1 (129).

ii. Données biologiques recueillies après congélation

1. Congélation et stockage du matériel

Les échantillons de cellules mononucléées ont été isolés au diagnostic à partir du sang ou de la moelle osseuse des patients selon le protocole suivant : dilution des échantillons en RPMI, puis séparation des cellules mononucléées par centrifugation en gradient de densité (MSL) et deux lavages en RPMI. Les cellules ont ensuite été congelées après dilution secondaire à raison de 20 millions de cellules par ampoule comprenant 500 µl de RPMI, 400 µl de sérum de veau fœtal et 100 µl de DMSO. Après refroidissement progressif jusqu'à - 80 ° C, les cellules ont été stockées dans l'azote liquide.

Une partie des cellules a été congelée en milieu spécifique pour permettre l'extraction secondaire des ARN, et une autre partie en culot sec pour permettre l'extraction des ADN.

2. Détection de FLT3/ITD

L'ADN des cellules a été extrait à partir des échantillons congelés de sang ou de moelle osseuse en utilisant les kits Nucleon® (GE Healthcare™) et en suivant le protocole du fournisseur.

Une partie des exons 13 et 15 et l'intégralité de l'exon 14 de *FLT3* ont été amplifiées par 35 cycles de PCR (94° C pendant 30 secondes, 60° C pendant 1 minute puis 72° C pendant 1 minute), en utilisant 250 ng d'ADN génomique, 0,3 µM de chacune des amorces ITD sens TGGTGTTTGTCTCTTCTTCATTGT et ITD anti-sens GTTGCGTTCATCACTTTTCCAA, 750 µM de désoxynucléotides tri phosphate, 5 mM de MgCl₂, 1,25 UI de Taq GOLD polymérase et du tampon GOLD 1 (Perkin Elmer Life™ and Analytical Sciences™) dans un volume total de 50 µl. Les produits d'amplification ont ensuite été recueillis, puis soumis à une migration sur un gel d'Agarose à 2 %. Avec cette méthode, les fragments sauvages de *FLT3* mesurent 240 paires de bases, et les fragments de *FLT3/ITD* sont plus longs. Pour cette

étude, les échantillons montrant l'absence ou une très faible détection des fragments de *FLT3/ITD* ont été considérés comme négatifs ; les échantillons avec une détection marquée (avec un seuil de plus de 10 % d'allèle muté) ou prédominante des fragments de *FLT3/ITD* ont été considérés comme positifs.

3. Détection des mutations de NPM1

L'ADN complémentaire total (ADNc) des cellules a été synthétisé à partir de 1 µg d'ARN total, en utilisant un kit de transcription inverse à haute capacité (Applied Biosystems™), et en suivant le protocole du fournisseur. Des amorces spécifiques pour l'exon 12 de *NPM1* sens GGATGACTGACCAAGAGGCTATTC et anti-sens CAGAAATGAAATAAGACGGAAAATTTTTTAACAAATTGT, et 4 sondes spécifiques marquées avec un colorant fluorescent (FAM) et un quencher non fluorescent (NFQ) pour détecter la forme sauvage (FAM-CTCCACTGCCAGAGAT-NFQ) et les mutations de type A (FAM-CACTGCCAGACAGAGAT-NFQ), B (FAM-ACTGCCATGCAGAGAT-NFQ) et D (FAM-CTGCCAGGCAGAGAT-NFQ) de *NPM1*, ont été fournies par Applied Biosystems™. Une amplification par PCR quantitative en temps réel (TaqMan 7900HT; Applied Biosystems™) a été pratiquée, avec un cycle initial (50°C pendant 2 minutes et 95 °C pendant 10 minutes), puis 40 cycles (95°C pendant 15 secondes et 60°C pendant 1 minute), en utilisant 10 ng d'ADNc, 10 µl de TaqMan genotyping Master Mix®, et 1 µl d'amorces et de sondes. En l'absence de détection de fluorescence correspondant aux 3 sondes testant les mutations A, B, et D, la recherche de mutations de *NPM1* a été considérée comme négative sur l'échantillon. En cas de détection de fluorescence pour au moins l'une des 3 sondes testant les mutations de *NPM1*, la recherche de mutation de *NPM1* a été considérée comme positive sur l'échantillon. Tous les résultats ont été analysés avec le logiciel RQ manager® (Applied Biosystems™)

4. Détection des mutations de CEBPA

L'ADN des cellules a été extrait à partir des échantillons congelés de sang ou de moelle osseuse comme décrit précédemment (*paragraphe II.B.ii.2*). Les domaines TAD1, TAD2 et bZIP de *CEBPA* ont été amplifiés par PCR en utilisant des amorces spécifiques (TAD1 sens TCGGCCGACTTCTACGAGGC et anti-sens ACTTTGACTACCCGGGCGC ; TAD2 sens TACCTGGACGGCAGGCTGGA et anti-sens AGACCACCATGCACCTGCA ; bZIP sens AGAAGTCGGTGGACAAGAACAGCAA et anti-sens GTCAAGGCCATGGGCAACT) avec un cycle initial (10 minutes à 95°C), puis 30 cycles (95°C pendant 1 minute, 55° C pendant 40 secondes puis 72° C pendant 90 secondes), et un cycle final (5 minutes à 72°C), en utilisant 50 ng d'ADN total, 500 nM d'amorces spécifiques, 0,4 UI de Taq GOLD polymérase (Applied Biosystems™), 0,2 mM de chaque désoxynucléotide tri phosphate, dans un tampon de DMSO contenant 1,5 mM de MgCl₂. Deux µl de chacun des produits d'amplification ont ensuite été recueillis, et transférés dans 1 µl de marqueurs GeneScan® (AppliedBiosystems™) et 10 µl de formamide. Une étape de dénaturation par chauffage du mélange à 95°C pendant 5 minutes, et refroidissement immédiat sur glace a ensuite été pratiquée, suivie d'une électrophorèse capillaire (ABI 3130xl geneticalalyzer®, Applied Biosystems™), selon le protocole du fournisseur. Les données recueillies ont été analysées avec le logiciel GeneMapper® version 4.0. Les échantillons ont été considérés comme mutés pour *CEBPA* en cas de détection de mutation sur un ou plusieurs des domaines amplifiés pour chaque échantillon.

5. Mesure de l'expression de BAALC

La mesure de l'expression de *BAALC* a été réalisée en utilisant l'ADNc obtenu à partir des échantillons congelés de sang ou de moelle osseuse, comme décrit dans le paragraphe II.B.ii.3. *BAALC* et *Abelson (ABL)*, utilisé comme contrôle interne, ont été analysés en PCR

quantitative en temps réel (TaqMan 7900HT; Applied Biosystems™). Chaque échantillon a été analysé deux fois, sur une même plaque MicroAmp® à 96 puits. En cas de résultats discordants entre les deux tests, une troisième analyse a été pratiquée. Les conditions d'amplifications étaient les mêmes que celles décrites précédemment (cf paragraphe B.ii.3.), en utilisant des amorces et des sondes spécifiques de *BAALC* et d'*ABL* (séquences déposées désignées par Applied Biosystems™). La méthode de comparaison des « cycles de seuil » a été utilisée pour déterminer l'expression relative de *BAALC*. La différence des « cycles de seuil » $\Delta Ct = Ct_{BAALC} - Ct_{ABL}$ a été calculée pour chaque produit d'amplification, ainsi que la moyenne des deux mesures de ΔCt pour chaque échantillon ($\mu\Delta Ct = \Sigma\Delta Ct/2$). En cas d'absence d'amplification au bout de 40 cycles, l'expression de *BAALC* a été considérée comme nulle. Un des échantillons des patients a été utilisé arbitrairement comme contrôle, et inclus dans chaque test, comme standardisation. L'expression de *BAALC* dans ce contrôle a été arbitrairement fixée à 1. L'expression relative de *BAALC* dans les différents échantillons a été calculée selon la formule suivante :

$$\text{Expression relative}_{\text{échantillon}} = 2^{-\mu\Delta\Delta Ct}$$

$$\text{et } \mu\Delta\Delta Ct = \mu\Delta Ct_{\text{patient}} - \mu\Delta Ct_{\text{contrôle}}.$$

Tous les résultats ont été analysés avec le logiciel RQ manager® (Applied Biosystems™).

iii. Analyse statistique

1. Evaluation de l'efficacité des traitements

L'efficacité des traitements a été évaluée, selon les recommandations internationales décrites dans l'introduction, par la mesure du taux de rémission complète, de la survie sans maladie, et de la survie globale. Les données pour la DFS ont été censurées à la dernière date de suivi pour les patients connus pour être en vie et sans preuve de rechute, et les données pour l'OS ont été censurées à la dernière date de suivi pour les patients connus pour être en vie.

2. Comparaisons des patients selon la fonctionnalité d'ABCB1

L'association des différentes caractéristiques cliniques (âge, leucocytose initiale, sous-type FAB, existence d'une phase pré-leucémique) ou biologiques (expression de CD 34, groupe cytogénétique, présence de *FLT3/ITD*, de mutation de *NPM1*, de mutation de *CEBPA*, et expression de *BAALC*) avec la fonctionnalité d'ABCB1 a été évaluée en utilisant le test exact de Fisher, le test de Kruskal-Wallis ou le test de Mann-Whitney selon le caractère continu ou catégoriel des variables testées. Les différences observées ont été considérées comme statistiquement significatives pour une valeur de p inférieure à 0,05.

3. Probabilité de survie

Les différentes probabilités de survie (DFS et OS) ont été estimées par la méthode de Kaplan-Meier. Les différences entre les distributions de survie ont été évaluées en utilisant le test du log-rank. Ces différences ont été considérées comme significatives quand p était inférieur à 0,05. Les données de survie ont été censurées à la date de la greffe de CSH allogéniques pour les patients concernés.

4. Paramètres impliqués dans la survie

Des modèles de hasards proportionnels ont été construits pour évaluer si la fonctionnalité d'ABCB1 était associée à la survie, en tenant compte des autres variables. Toutes les variables testées en analyse univariée et associées à un p inférieur à 0,2 ont été incluses dans ces modèles. L'influence des variables a été considérée comme significative quand p était inférieur à 0,05.

III- Résultats

A. Caractéristiques des patients

Au total, 206 patients ont été inclus dans l'étude. Les principales caractéristiques des patients sont résumées dans le tableau 9 et celles des patients à caryotype normal dans le tableau 10.

L'âge médian au diagnostic était de 54,5 ans. La population était composée de 111 hommes (54%) et de 95 femmes (46 %). 19 patients (10%) étaient suivis préalablement pour une pathologie prédisposant à une LAM (myélodysplasie ou syndrome myéloprolifératif chronique).

Le compte médian des leucocytes au diagnostic était $15\ 000 \times 10^6/l$.

La répartition des patients selon la classification FAB était la suivante : M0 pour 10 patients (5%), M1 pour 43 patients (21%), M2 pour 52 patients (25%), M4 pour 29 patients (14%), M5 pour 40 patients (19%) et M6 pour 5 patients (2%).

Le caryotype était favorable pour 17 patients (8%), défavorable pour 32 patients (16%) et intermédiaire pour 155 patients (75 %) et 111 patients (54 %) avaient un caryotype normal.

Une mutation de *NPM1* a été retrouvée chez 44 patients (21 %) dont 38 avaient un caryotype normal. *FLT3/ITD* a été retrouvée chez 26 patients (13 %) dont 18 avaient un caryotype normal. Une mutation (ou plus) de *CEBPA* a été retrouvée chez 33 patients (16 %) dont 23 avaient un caryotype normal.

Caractéristique	Tous les patients (n=206)	Patients avec une forte activité d'ABCB1 (n= 42)	Patients avec une faible activité d'ABCB1 (n=164)	Comparaison entre les deux groupes
Age, en années : médiane (intervalle)	54,5 (16 – 81)	57,5 (17 – 78)	53 (16 – 81)	$p=0,15$
Leucocytes au diagnostic, $10^9/l$: médiane (intervalle)	15 (0,52 – 284)	7,1 (0,6 – 230)	19,4(0,52 – 284)	$p=0,01$
Sous type FAB ¹ : n (%)				$p=0,09$
M (non classé)	24 (12)	9 (22)	15 (9)	
M0	10 (5)	2 (5)	8 (5)	
M1	43 (21)	10 (24)	33 (21)	
M2	51 (25)	13 (30)	38 (24)	
M4	29 (14)	1 (2)	28 (17)	
M5	40 (19)	6 (15)	34 (22)	
M6	5 (2)	1 (2)	4 (2)	
Expression de CD34 ² : n (%)				$p=0,004$
CD 34 +	115 (67)	29 (87)	86 (62)	
CD 34 -	56 (33)	4 (13)	52 (38)	
Caryotype, n (%)				$p=0,21$
Favorable	17 (8)	2 (5)	15 (9)	
Intermédiaire	155 (75)	30 (71)	125 (76)	
Normal	111 (54)	21 (50)	90 (55)	
Autre	44 (21)	9 (21)	35 (21)	
Défavorable	32 (16)	10 (24)	22 (13)	
Echec	2 (1)	0 (0)	2 (1)	
Phase pré-leucémique ³ : n (%)				$p=0,55$
Oui	19 (10)	5 (12)	14 (9)	
Non	170 (90)	35 (88)	135 (91)	
Mutation de NPM1 : n (%)				$p=0,03$
NPM1 muté	44 (21)	4 (10)	40 (24)	
NPM1 sauvage	162 (79)	38 (90)	124 (76)	
Présence de FLT3/ITD : n (%)				$p=0,11$
Présence de FLT3/ITD	26 (13)	2 (5)	24 (14)	
Absence de FLT3/ITD	180 (87)	40 (95)	140 (86)	
Mutation de CEBPA : n (%)				$p=0,99$
CEBPA muté	33 (16)	7 (16)	26 (16)	
CEBPA sauvage	173 (84)	35 (84)	138 (84)	
Expression de BAALC ⁴ : médiane (intervalle)	0,287 (0,002-16,79)	0,564 (0,01-16,58)	0,225 (0,002-16,79)	$p=0,0079$

1: données indisponibles pour 4 patients
2: données indisponibles pour 35 patients

3: données indisponibles pour 17 patients
4: données indisponibles pour 5 patients

Tableau 9 : Principales caractéristiques des patients et comparaison selon l'activité d'ABCB1

B. Relations entre l'activité d'ABCB1 et les autres caractéristiques des patients

i. Dans l'ensemble des patients

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau 9.

Quarante deux patients (20%) avaient une forte activité d'ABCB1, et 164 (80%) une activité faible. Il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les 2 groupes pour le sexe, l'âge, l'existence d'une phase pré-leucémique, le sous-type FAB ou la distribution des caryotypes. Une forte activité d'ABCB1 était associée à un compte leucocytaire plus bas ($p=0,01$), à une expression plus importante de CD 34 ($p=0,004$) et de *BAALC* ($p=0,0079$), et à l'absence de mutation de *NPM1* ($p=0,03$). Il n'a pas été observé de différence entre les deux groupes pour la présence de mutation de *CEBPA* ($p=0,99$) ou de *FLT3/ITD* ($p=0,11$).

ii. Dans la population à cytogénétique normale

Les principaux résultats sont résumés dans le tableau 10.

Sur les 111 patients avec un caryotype normal, 21 (19 %) avaient une forte activité d'ABCB1, et 90 (81 %) une faible activité d'ABCB1. Dans cette population sélectionnée, il n'a pas été retrouvé de différence significative entre les 2 groupes pour le sexe, l'âge, l'existence d'une phase pré-leucémique, le compte leucocytaire, ou le sous-type FAB. Une forte activité d'ABCB1 était associée à une expression plus importante de CD 34 ($p=0,01$), avec une tendance non significative à une expression plus élevée de *BAALC* ($p=0,08$), et à l'absence de mutation de *NPM1* ($p=0,12$). Il n'a pas été observé de différence entre les deux groupes pour la présence de mutation de *CEBPA* ($p=0,37$) ou de *FLT3/ITD* ($p=0,51$).

Caractéristique	Patients avec un caryotype normal n= 111	Patients avec une forte activité d'ABCB1 n= 21	Patients avec une faible activité d'ABCB1 n= 90	Comparaison entre les 2 groupes
Age, années : médiane (intervalle)	56 (16 – 81)	56 (17 – 78)	55,5 (16 – 81)	<i>p</i> =0,75
Leucocytes au diagnostic, 10 ⁹ /l (range)	16 (0,52 – 211)	9,2 (1 – 163)	19,4 (0,52 – 211)	<i>P</i> =0,64
Sous types FAB : n (%) ¹				<i>P</i> =0,31
M (non classé)	8 (7)	2 (10)	6 (7)	
M0	6 (5)	1 (5)	5 (6)	
M1	31 (28)	6 (28)	25 (28)	
M2	25 (23)	7 (33)	18 (20)	
M4	17(15)	0 (0)	17 (19)	
M5	19 (17)	5 (24)	14 (16)	
M6	4 (4)	0 (0)	4 (4)	
Expression de CD 34 ² : n (%)				<i>p</i> =0,01
CD 34 +	52 (58)	14 (87)	38 (52)	
CD 34 -	37 (42)	2 (13)	35 (48)	
Phase préleucémique ³ : n (%)				<i>p</i> >0,99
Oui	8 (7)	1 (5)	7 (9)	
Non	96 (92)	19 (95)	77 (91)	
Mutation de NPM1 : n (%)				<i>p</i> =0,12
NPM1 muté	38 (34)	4 (19)	34 (38)	
NPM1 sauvage	73 (66)	17 (81)	56 (62)	
Présence de FLT3/ITD : n (%)				<i>p</i> =0,51
FLT3/ITD présent	18 (16)	2 (10)	16 (18)	
FLT3/ITD absent	93 (84)	19 (90)	74 (82)	
Mutation de CEBPA : n (%)				<i>p</i> =0,37
CEBPA muté	23 (21)	6 (29)	17 (19)	
CEBPA sauvage	88 (79)	15 (71)	73 (81)	
Expression de BAALC ⁴ : médiane (intervalle)	0,197 (0,002 – 16,79)	0,280 (0,01 – 13,56)	0,134 (0,002 – 16,79)	<i>p</i> =0,08

1 : données non disponibles pour 1 patients

2 : données non disponibles pour 22 patients

3 : données non disponibles pour 7 patients

4 : données non disponibles pour 2 patients

Tableau 10 : Principales caractéristiques des patients à cytogénétique normale et comparaison selon l'activité d'ABCB1

C. Impact pronostique de l'activité d'ABCB1

i. Dans l'ensemble des patients

Cent cinquante patients sur les 206 (73 %) ont atteint la RC. Une forte activité d'ABCB1 était un facteur de mauvais pronostic pour l'obtention de la RC : 59 % contre 76 % (*p*=0,03). La DFS à cinq ans, estimée par la méthode de Kaplan-Meier était de 36 ± 4 %, avec une tendance à être plus basse en cas de forte activité d'ABCB1 : 24 ± 8 % contre 39 ± 4 % (*p*=0,06). L'OS à cinq ans, était de 37 ± 3 % et significativement plus basse en cas de forte activité d'ABCB1 : 18 ± 8 % contre 42 ± 4 % (*p*=0,001). Les courbes de survie sont montrées sur la figure 5.

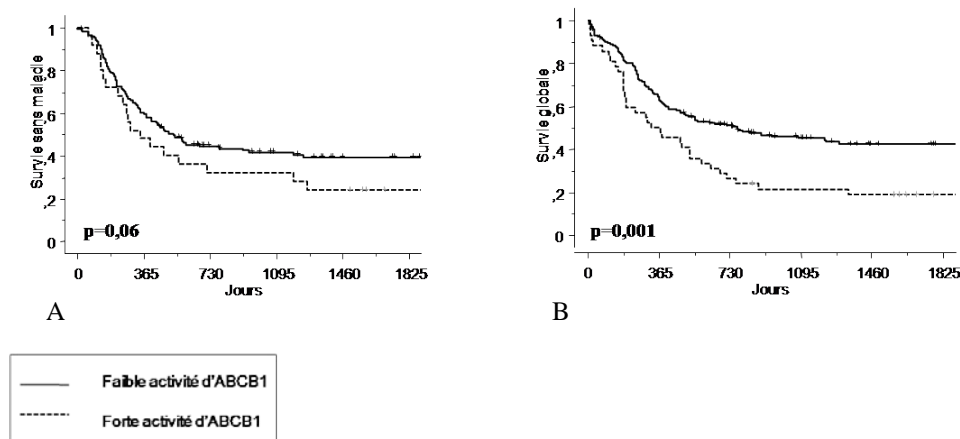


Figure 5 : Survie sans maladie (A) et survie globale (B) en fonction de l'activité d'ABCB1 dans l'ensemble des patients

ii. Dans la population à cytogénétique normale

Quatre vingt huit patients sur les 111 (79%) ont atteint la rémission complète. De manière inattendue, l'activité d'ABCB1 n'était pas un facteur pronostic pour l'obtention de la RC dans ce groupe : 71 % contre 80 % ($p=0,38$). La DFS à cinq ans, estimée par la méthode de Kaplan-Meier était de 40 ± 5 %, et significativement plus basse en cas de forte activité d'ABCB1 : 20 ± 10 % contre 45 ± 6 % ($p=0,02$). L'OS à cinq ans était de 42 ± 5 %, et significativement plus basse en cas de forte activité d'ABCB1 : 19 ± 9 % contre 48 ± 5 % ($p=0,003$). Les courbes de survie sont montrées sur la figure 6.

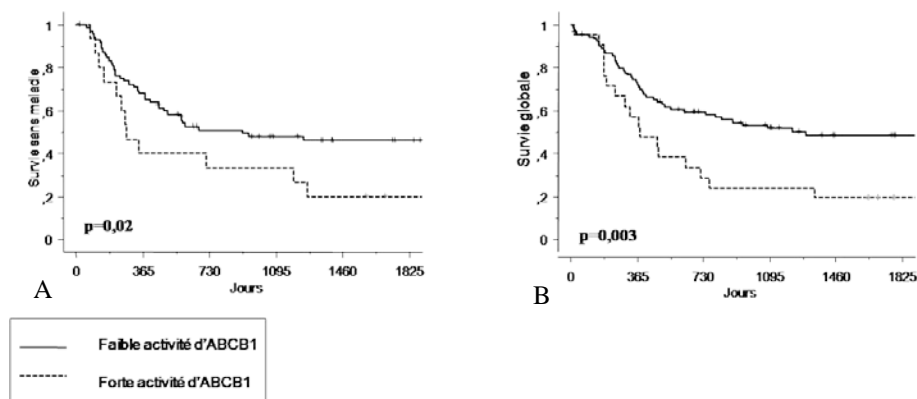


Figure 6 : Survie sans maladie (A) et survie globale (B) en fonction de l'activité d'ABCB1 dans la population à cytogénétique normale

D. Facteurs pronostiques dans la population générale

Une analyse statistique a été pratiquée pour l'obtention de la RC, la DFS et l'OS pour les facteurs suivants : âge, leucocytose initiale, groupe cytogénétique, existence d'une phase pré-leucémique, présence de *FLT3/ITD*, présence de mutation de *NPM1*, présence de mutation de *CEBPA*, expression relative de *BAALC*, et activité d'*ABCB1*.

i. Obtention de la RC

Les résultats sont montrés dans le tableau 11.

En analyse univariée, les facteurs retrouvés ayant une valeur pronostique significative étaient l'âge ($p < 0,0001$), le caryotype ($p = 0,0221$), l'existence d'une phase pré-leucémique ($p = 0,0007$), la présence d'une mutation de *NPM1* ($p = 0,0274$), l'expression de *BAALC* ($p = 0,012$) et l'activité d'*ABCB1* ($p = 0,0323$).

Un modèle intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, seul l'âge ($p = 0,001$) était un facteur indépendant pour l'obtention de la RC.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	0,949 (0,926-0,973) $p < 0,0001$	0,953 (0,926-0,981) $p = 0,001$
Leucocytose	1,002 (0,996-1,008) $p = 0,501$	NI
Caryotype	4,333 (1,235-15,208) $p = 0,0221$	0,909 (0,218-3,787) $p = 0,89$
Existence d'une phase pré leucémique	0,179 (0,066-0,48) $p = 0,0007$	0,308 (0,098-0,968) $p = 0,439$
Mutation de <i>NPM1</i>	2,827 (1,123-7,119) $p = 0,0274$	1,887 (0,607-5,862) $p = 0,2722$
Présence de <i>FLT3/ITD</i>	0,818 (0,334-2,004) $p = 0,66$	NI
Mutation de <i>CEBPA</i>	1,200 (0,506-2,844) $p = 0,6788$	NI
Expression relative de <i>BAALC</i>	0,873 (0,785-0,971) $p = 0,012$	0,896 (0,788-1,018) $p = 0,0923$
Activité d' <i>ABCB1</i>	0,459 (0,225-0,936) $p = 0,0323$	0,527 (0,226-1,232) $p = 0,1392$

NI : non inclus

Tableau 11 : Analyse statistique pour la rémission complète dans la population globale

ii. Survie sans maladie

Les résultats sont montrés dans le tableau 12.

Les seuls facteurs retrouvés ayant une valeur pronostique en analyse univariée étaient l'âge ($p=0,0478$) et le groupe cytogénétique ($p=0,0006$).

Un modèle intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, l'âge ($p=0,0001$), le caryotype ($p=0,0137$) et l'activité d'ABC1 ($p=0,0319$) étaient les seuls facteurs pronostiques indépendants.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	1,014 (1-1,027) $p=0,0478$	1,026 (1,019-1,033) $p=0,0001$
Leucocytose	1,002 (0,998-1,005) $p=0,2762$	NI
Caryotype	0,232 (0,091-0,589) $p=0,0006$	0,573 (0,347-0,799) $p=0,0137$
Existence d'une phase pré leucémique	0,597 (0,259-1,376) $p=0,2261$	NI
Mutation de NPM1	1,161 (0,730-1,846) $p=0,5286$	NI
Présence de FLT3/ITD	0,959 (0,511-1,799) $p=0,89$	NI
Mutation de CEBPA	1,519 (0,829-2,785) $p=0,1763$	1,067 (0,8-1,334) $p=0,8076$
Expression relative de BAALC	0,943 (0,847-1,050) $p=0,2868$	NI
Activité d'ABC1	0,630 (0,388-1,025) $p=0,0627$	0,640 (0,432-0,848) $p=0,0319$

NI : non inclus

Tableau 12 : Analyse statistique pour la survie sans maladie dans la population globale.

iii. Survie globale

Les résultats sont montrés dans le tableau 13.

En analyse univariée, les facteurs retrouvés ayant une valeur pronostique significative étaient l'âge ($p<0,0001$), le caryotype ($p=0,0017$), l'existence d'une phase pré-leucémique ($p=0,0407$) et l'activité d'ABC1 ($p=0,0012$).

Un modèle intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, seuls l'âge (p=0,0004), le caryotype (p=0,0453), la présence de *FLT3/ITD* (p=0,0096) et l'activité d'ABC1 (p=0,0334) étaient des facteurs pronostiques indépendants.

La présence de mutation de *NPM1* (p=0,074) et l'expression de *BAALC* (p=0,4689) n'atteignaient pas le seuil de significativité.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	1,029 (1,016-1,042) p<0,0001	1,024 (1,011-1,038) p=0,0004
Leucocytose	1,0 (0,997-1,003) p=0,8391	NI
Caryotype	0,501 (0,325-0,772) p=0,0017	0,373 (0,142-0,980) p=0,0453
Existence d'une phase pré leucémique	0,566 (0,329-0,976) p=0,0407	0,868 (0,487-1,549) p=0,6328
Mutation de <i>NPM1</i>	1,526 (0,970-2,401) p=0,0673	1,633 (0,953-2,797) p=0,0740
Présence de <i>FLT3/ITD</i>	0,688 (0,422-1,122) p=0,1342	0,497 (0,293-0,843) p=0,0096
Mutation de <i>CEBPA</i>	1,229 (0,746-2,024) p=0,4175	NI
Expression relative de <i>BAALC</i>	1,041 (0,980-1,105) p=0,195	1,024 (0,960-1,093) p=0,4689
Activité d'ABC1	0,523 (0,354-0,774) p=0,0012	0,619 (0,398-0,963) p=0,0334

NI : non inclus

Tableau 13 : Analyse statistique pour la survie globale dans la population générale

E. Facteurs pronostiques dans la population à cytogénétique normale

Le principal problème pour le choix des traitements se pose en cas de cytogénétique normale.

Une analyse a donc été réalisée dans cette population, en incluant les paramètres suivants : âge, leucocytose initiale, existence d'une phase pré leucémique, présence de *FLT3/ITD*, présence de mutation de *NPM1*, présence de mutation de *CEBPA*, expression relative de *BAALC*, et activité d'*ABCB1*.

i. Obtention de la RC

Les résultats sont montrés dans le tableau 14.

En analyse univariée, seul l'âge ($p=0,0009$) avait une valeur pronostique significative. Un modèle intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. De nouveau, avec ce modèle, seul l'âge ($p=0,0056$) était un facteur pronostique indépendant.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) P
Age	0,934 (0,897-0,973) $p=0,0009$	0,935 (0,891-0,980) $p=0,0056$
Leucocytose	1.01 (0,991-1,012) $p=0,83$	NI
Existence d'une phase pré leucémique	0,231 (0,053-1,012) $p=0,0518$	0,586 (0,120-2,857) $p=0,5081$
Mutation de <i>NPM1</i>	3,148 (0,991-10,004) $p=0,0519$	2,559 (0,618-10,933) $p=0,1924$
Présence de <i>FLT3/ITD</i>	0,996 (0,28-3,14) $p=0,92$	NI
Mutation de <i>CEBPA</i>	1,377 (0,42-4,51) $p=0,59$	NI
Expression relative de <i>BAALC</i>	0,88 (0,75-1,02) $p=0,09$	0,936 (0,789-1,110) $p=0,4463$
Activité d' <i>ABCB1</i>	0,616 (0,210-1,812) $p=0,379$	NI

NI : non inclus

Tableau 14 : Analyse statistique pour la rémission complète dans la population à cytogénétique normale

ii. Survie sans maladie

Les résultats sont montrés dans le tableau 15.

Les facteurs retrouvés en analyse univariée ayant une valeur pronostique significative étaient l'âge ($p=0,0423$), la leucocytose ($0,0064$) et l'activité d'ABCB1 ($p=0,0256$).

Un modèle d'analyse multivariée intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, la leucocytose initiale ($p=0,0046$), l'âge ($p=0,0104$) et l'activité d'ABCB1 ($p=0,0107$) étaient les seuls facteurs pronostiques indépendants.

Les mutations de *NPM1* ou de *CEBPA*, et l'expression de *BAALC* n'avaient pas de valeur pronostique.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) P
Age	1,020 (1,001-1,04) $p=0,0423$	1,026 (1,006-1,047) $p=0,0104$
Leucocytose	1,007 (1,002-1,013) $p=0,0064$	1,008 (1,003-1,014) $p=0,0046$
Existence d'une phase pré leucémique	0,451 (0,161-1,265) $p=0,1301$	0,377 (0,124-1,144) $p=0,0848$
Mutation de NPM1	0,901 (0,515-1,574) $p=0,71$	NI
Présence de FLT3/ITD	0,563 (0,281-1,127) $p=0,1048$	0,558 (0,265-1,174) $p=0,1241$
Mutation de CEBPA	1,334 (0,649-2,743) $p=0,4325$	NI
Expression relative de BAALC	1,019 (0,903-1,150) $p=0,7601$	NI
Activité d'ABCB1	0,487 (0,259-0,916) $p=0,0256$	0,413 (0,209-0,815) $p=0,0107$

NI : non inclus

Tableau 15 : Analyse statistique pour la survie sans maladie dans la population à cytogénétique normale

iii. Survie globale

Les résultats de l'analyse sont montrés dans le tableau 16.

Les facteurs retrouvés ayant une valeur pronostique en analyse univariée étaient l'âge (p=0,0006), la leucocytose (p=0,0382), la présence de mutation de *NPM1* (p=0,0147), de *FLT3/ITD* (p=0,0143) et l'activité d'ABCB1 (p=0,0036).

Un modèle intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, l'âge (p=0,0012), l'activité d'ABCB1 (p=0,0038) et la présence de *FLT3/ITD* (p=0,0173) étaient les seuls facteurs pronostiques indépendants pour l'OS.

Les mutations de *NPM1* et de *CEBPA*, et l'expression de *BAALC* n'avaient pas de valeur pronostique.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	1,033 (1,014-1,053) p=0,0006	1,031 (1,012-1,049) p=0,0012
Leucocytose	1,005 (1-1,009) p=0,0382	1,004 (0,999-1,009) p=0,1404
Existence d'une phase pré leucémique	0,782 (0,313-1,954) p=0,5986	NI
Mutation de <i>NPM1</i>	1,4251 (1,002-1,053) p=0,0147	1,041 (0,620-1,749) p=0,8794
Présence de <i>FLT3/ITD</i>	0,475 (0,262-0,862) p=0,0143	0,460 (0,243-0,872) p=0,0173
Mutation de <i>CEBPA</i>	1,290 (0,673-2,473) p=0,4430	NI
Expression relative de <i>BAALC</i>	1,041 (0,961-1,127) p=0,3238	NI
Activité d'ABCB1	0,441 (0,254-0,766) p=0,0036	0,424 (0,238-0,758) p=0,0038

NI : non inclus

Tableau 16 : Analyse statistique pour la survie globale dans la population à caryotype normal

F. Facteurs pronostiques dans la population à cytogénétique normale, sans *FLT3/ITD* et sans mutation de *NPM1*

En cas de cytogénétique normale, le sous-groupe qui pose le plus de problèmes pour les choix thérapeutiques est celui des patients sans *FLT3/ITD*, ni mutation de *NPM1*, chez qui les résultats des traitements sont pourtant très variables. Une analyse statistique a donc été pratiquée dans ce sous-groupe de 66 patients, pour la RC, la DFS et l'OS, comprenant les variables suivantes : âge, leucocytose initiale, existence d'une phase pré leucémique, présence de mutation de *CEBPA*, expression relative de *BAALC*, et activité d'ABC B1.

i. Obtention de la RC

Les résultats sont montrés dans le tableau 17.

Le seul facteur retrouvé ayant une valeur pronostique en analyse univariée était l'âge (p=0,002).

Un modèle d'analyse multivariée intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, l'âge (p=0,0046) et l'activité d'ABC B1 (p=0,0382) étaient les seuls facteurs indépendants retrouvés.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	0,88 (0,82-0,95) P=0,002	0,869 (0,789-0,958) P=0,0046
Leucocytose	0,996 (0,984-1,009) P=0,57	NI
Existence d'une phase pré leucémique	0,325 (0,071 – 1,487) P=0,14	0,599 (0,107 – 3, 356) P=0,5603
Mutation de CEBPA	1,85 (0,52-6,53) P=0,33	NI
Expression relative de BAALC	0,90 (0,77-1,06) P=0,21	NI
Activité d'ABC B1	0,45 (0,133-1,521) P=0,1988	0,157 (0,027-0,904) P=0,0382

NI : non inclus

Tableau 17 : Analyse statistique pour la RC dans la population à cytogénétique normale sans *FLT3/ITD* ni mutation de *NPM1*

ii. Survie sans maladie

Les résultats des analyses sont montrés dans le tableau 18.

En analyse univariée, aucun facteur n'avait de valeur pronostique significative. Un modèle d'analyse multivariée intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, l'âge (p=0,0285) et l'activité d'ABCB1 (p=0,0488) étaient les seuls facteurs pronostiques indépendants.

Les mutations de *CEBPA* et l'expression de *BAALC* n'avaient pas de valeur pronostique.

Variable	Univariée HR (intervalle) p	Multivariée HR (intervalle) p
Age	1,022 (0,996-1,048) P=0,0974	1,036 (1,004-1,069) P=0,0285
Leucocytose	1,007 (0,999-1,015) P=0,0856	1,008 (0,999-1,017) P=0,881
Existence d'une phase pré leucémique	0,406 (0,138-1,2) P=0,1031	0,484 (0,148-1,577) P=0,2284
Mutation de <i>CEBPA</i>	1,643 (0,689-3,917) P=0,2625	NI
Expression relative de <i>BAALC</i>	1,068 (0,944-1,208) P=0,2967	NI
Activité d'ABCB1	0,518 (0,217-1,237) P=0,1386	0,372 (0,139-0,995) P=0,0488

NI : non inclus

Tableau 18 : Analyse statistique pour la survie sans maladie dans la population à cytogénétique normale sans FLT3/ITD ni mutation de NPM1

iii. Survie globale

Les résultats sont montrés dans le tableau 19.

En analyse univariée, seuls l'âge (p=0,0012) et l'activité d'ABCB1 (p=0,0046) avaient une valeur pronostique.

Un modèle d'analyse multivariée intégrant tous les paramètres avec un p inférieur à 0,2 a été construit. Avec ce modèle, seuls l'âge (p < 0,001) et l'activité d'ABCB1 (p = 0,004) étaient des facteurs pronostiques indépendants.

Les mutations de *CEBPA* et l'expression de *BAALC* n'avaient pas de valeur pronostique.

Variable	Univariée HR (intervalle) P	Multivariée HR (intervalle) p
Age	1,045 (1,017-1,073) P=0,0012	1,049 (1,02-1,079) P=0,0008
Leucocytose	1,003 (0,997-1,0009) P=0,3546	NI
Existence d'une phase pré leucémique	0,732 (0,283-1,898) P=0,5214	NI
Mutation de CEBPA	1,505 (0,704-3,217) P=0,2911	NI
Expression relative de BAALC	1,063 (0,979-1,154) P=0,1478	1,031 (0,950-1,119) P=0,4632
Activité d'ABC1	0,369 (0,185-0,736) P=0,0046	0,350 (0,171-0,715) P=0,004

NI : non inclus

Tableau 19 : Analyse statistique pour la survie globale dans la population à cytogénétique normale sans FLT3/ITD ni mutation de NPM1

G. Pronostic global en fonction de FLT3/ITD et de l'activité d'ABCB1

i. Dans la population à cytogénétique normale

Comme les seuls facteurs pronostiques retrouvés pour l'OS dans la population à cytogénétique normale étaient l'âge, la présence de *FLT3/ITD*, et l'activité d'ABCB1, les patients à cytogénétique normale ont été séparés en quatre groupes : présence de *FLT3/ITD* et haute activité d'ABCB1 (2 patients), présence de *FLT3/ITD* et faible activité d'ABCB1 (74 patients), absence de *FLT3/ITD* et haute activité d'ABCB1 (19 patients), et absence de *FLT3/ITD* et faible activité d'ABCB1 (16 patients). L'OS à cinq ans a été estimée par la méthode de Kaplan-Meier et comparée par le test du log rank (*figure 7*). Les deux patients ayant à la fois une haute activité d'ABCB1 et la présence de *FLT3/ITD* avaient un pronostic très défavorable. Les patients ayant à la fois une faible activité d'ABCB1 et l'absence de *FLT3/ITD* avaient un pronostic significativement plus favorable que les patients ayant soit la présence de *FLT3/ITD* seule, soit une forte activité d'ABCB1 isolée : OS à 5 ans = $53 \pm 6\%$ contre $21 \pm 9\%$ et $21 \pm 10\%$ respectivement ($p=0,0001$).

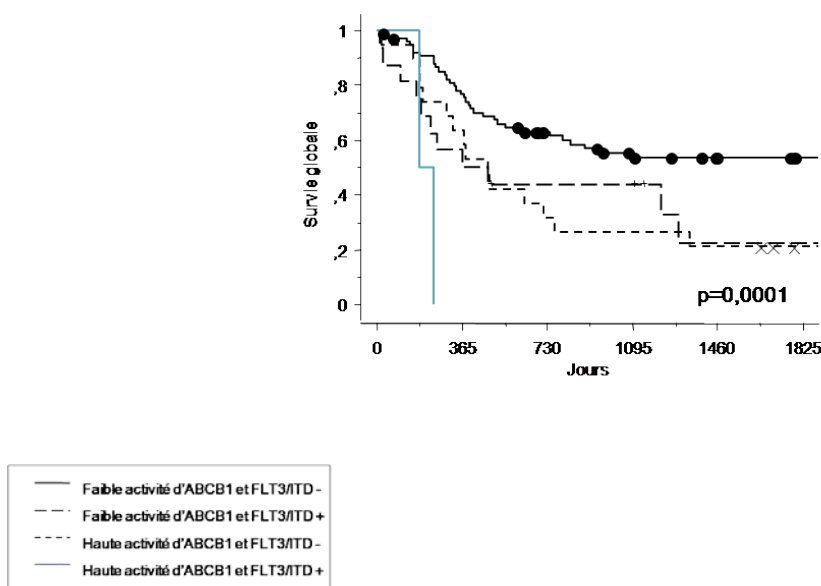


Figure 7 : Survie globale en fonction de l'activité d'ABCB1 et de la présence de FLT3/ITD en cas de cytogénétique normale

ii. Dans la population jeune à cytogénétique normale

Comme l'âge était également un facteur indépendant pour l'OS dans la population à caryotype normal, et que le problème de l'allogreffe de CSH se pose essentiellement chez les patients jeunes, une analyse similaire a été pratiquée chez les 70 patients âgés de moins de 60 ans. Les courbes de survie sont montrées sur la figure 8. Les patients ayant à la fois une faible expression d'ABCB1 et l'absence de *FLT3/ITD* (45 patients) avaient un meilleur pronostic (OS = 68 ± 7 %) que les patients avec seulement *FLT3/ITD* (n=12) ou les patients avec seulement une forte activité d'ABCB1 (n=12) : OS = 20 ± 16 % et 36 ± 14 % respectivement ($p = 0,0005$). Le seul patient ayant à la fois la présence de *FLT3/ITD* et une haute expression d'ABCB1 avait un pronostic très défavorable.

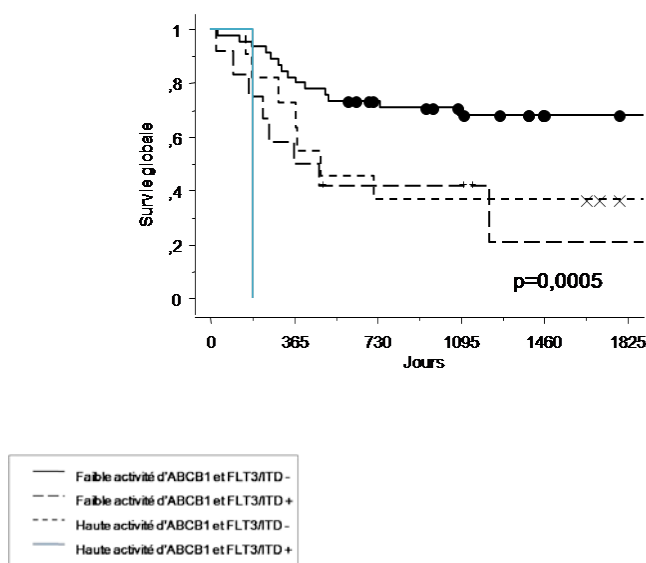


Figure 8 : Survie globale en fonction de l'expression d'ABCB1 et de la présence de FLT3/ITD dans la population jeune à cytogénétique normale

IV- Discussion

De nombreuses altérations génétiques et moléculaires ont été décrites dans les LAM, et peuvent être utilisées comme marqueurs pronostiques, afin d'orienter, dès le diagnostic, les choix thérapeutiques chez les patients, en particulier en cas de cytogénétique normale ou intermédiaire. Même si la valeur pronostique de certains de ces marqueurs, comme FLT3/ITD, n'est plus discutée, celle d'autres marqueurs reste débattue. Par exemple, la valeur des mutations simples de *CEBPA*, qui ont été récemment inscrites comme référence dans la classification de l'OMS (1), n'a pas été retrouvée dans les études les plus récentes, et seules les plus rares doubles mutations auraient un impact pronostique (86, 87). Ces différences entre les études sont sans doute liées aux variations d'effectifs des populations, à leur hétérogénéité et aux différences de traitements administrés, ou à d'autres causes, mais rendent difficiles l'identification certaine de facteurs prédictifs de réponse aux traitements.

Par ailleurs la multiplication récente du nombre d'altérations moléculaires décrites rend de plus en plus difficile, en pratique quotidienne, le choix des critères à appliquer aux patients pour décider de l'intensité des traitements. L'identification de facteurs pronostiques puissants parmi les facteurs déjà connus, ou de nouveaux facteurs plus larges englobant les précédents paraît indispensable. Dans la présente étude, nous nous intéressons particulièrement à la valeur de la fonctionnalité de la protéine ABCB1, et nous la comparons aux principaux facteurs pronostiques moléculaires dont l'utilisation est recommandée : présence de FLT3/ITD, de mutations de NPM1 et de mutations de CEBPA.

A. Intérêt de la sonde JC-1

Dans cette étude, la fonctionnalité d'ABCB1 a été évaluée en utilisant la sonde JC-1, et la ciclosporine comme modulateur d'activité. Bien que moins utilisée que d'autres tests d'ABCB1, comme par exemple le test à la rhodamine 123, cette méthode présente de

nombreux avantages. Elle est en effet simple à appliquer en routine, en cytométrie de flux, très reproductible, et très sensible (129, 153). Même si l'utilité de la sonde JC-1 n'a été pour l'instant démontrée que comme test de l'activité d'ABCB1, une étude récente suggère qu'elle pourrait refléter l'activité globale d'ABCB1 et d'autres membres de la famille des protéines ABC, dont le rôle dans les LAM a déjà été décrit ou non, comme par exemple ABCG1, ABCG2 (BCRP), ABCA2 ou ABCB6 (149). De plus, la plupart des tests d'activité d'ABCB1 couramment pratiqués n'ont jamais totalement démontré leur spécificité, en raison de l'absence d'étude pratiquée sur l'ensemble des pompes ABC. Le caractère de test fonctionnel global de la famille des protéines ABC renforcerait l'intérêt d'évaluer avec la sonde JC-1 tous les nouveaux patients atteints de LAM.

B. Relations entre ABCB1 et les autres marqueurs

Dans notre étude, les paramètres associés à une forte activité d'ABCB1 sont les suivants : une expression plus élevée de *BAALC* et de CD 34, une fréquence plus basse de mutations de *NPM1*, ainsi qu'un compte leucocytaire initial plus bas.

L'expression plus forte des protéines ABC dans les cellules souches hématopoïétiques normales et leucémiques (exprimant le CD 34) est une donnée bien connue, et les tests fonctionnels d'efflux (test au Hoechst 33342) peuvent même aider à la définition des CSH (119, 154). Comme déjà dit, ces protéines ont probablement un rôle de protection des CSH contre les xénobiotiques.

Les liens entre *BAALC* et ABCB1 n'ont quasiment pas été étudiés. Dans la littérature, on retrouve une seule étude de profils d'expression génique, qui montre, en cas de haute expression de *BAALC*, une plus haute expression de *CD 34* et d'*ABCB1* (92), sans que la fonctionnalité d'ABCB1 n'ait été étudiée. Par ailleurs, dans la même étude, une haute expression de *BAALC* est associée à une fréquence plus faible de mutations de *NPM1*. De

plus, les LAM avec mutations de *NPM1* sont connues pour avoir une plus faible expression membranaire de CD 34 (155). Enfin, une autre étude de profil d'expression chez les sujets âgés de plus de 60 ans retrouve une plus faible expression d'*ABCB1*, d'*ABCG2*, de *CD 34* et de *BAALC* en cas de mutation de *NPM1* (156). Les données de notre étude confirment bien une association entre *ABCB1* (haute fonctionnalité), expression de CD 34, haute expression de *BAALC* et absence de mutation de *NPM1*. Il est intéressant de noter que, dans la littérature, chacun de ces paramètres, pris de manière indépendante, a été associé à un pronostic défavorable. On pourrait postuler à l'existence d'un profil génétique de LAM « bloquées à un stade plus précoce de maturation », associant l'ensemble de ces caractéristiques, et présentant une plus forte résistance à la chimiothérapie.

De manière intéressante, dans notre étude, bien que les mutations de *NPM1* aient, en analyse univariée, un impact significatif sur la survie chez les patients à cytogénétique normale, celui-ci disparaît en analyse multivariée, quand la fonctionnalité d'*ABCB1* est intégrée au modèle. On pourrait donc postuler qu'une partie de l'impact des mutations de *NPM1* décrit dans la littérature est liée à l'association de ces mutations avec une plus faible activité d'*ABCB1*. Les relations entre *NPM1* et les protéines ABC devront être étudiées de manière approfondie pour comprendre ces associations.

L'association d'une forte expression d'*ABCB1* et d'un compte leucocytaire bas a déjà été décrite, bien que non retrouvée par toutes les études (157). Nous confirmons l'association d'une haute fonctionnalité d'*ABCB1* à un compte leucocytaire plus bas. Ceci pourrait être expliqué par l'avantage de survie acquis par les cellules exprimant *ABCB1*. On peut en effet postuler que, du fait de ce mécanisme de protection contre les agressions, une haute capacité de prolifération est moins nécessaire à la survie de la population tumorale. Une autre cause pourrait être le faible taux de *FLT3/ITD* en cas de forte activité d'*ABCB1*. En effet, les LAM porteuses de *FLT3/ITD* sont connues pour avoir un compte leucocytaire initial plus élevé.

L'absence quasi complète de *FLT3/ITD* dans la population avec une forte activité d'ABCB1 pourrait donc partiellement expliquer un compte leucocytaire initial plus bas.

C. Intérêt pratique de l'étude de la fonctionnalité d'ABCB1

Dans notre étude, environ 20 % des patients ont une forte activité d'ABCB1, et la proportion est la même en cas de cytogénétique normale. Dans cette dernière population, l'activité d'ABCB1 est un des seuls facteurs pronostiques indépendants pour la survie, en plus de l'âge et de la présence de *FLT3/ITD*. De plus, les patients ayant à la fois une faible activité d'ABCB1 et l'absence de *FLT3/ITD* ont un pronostic plus favorable que les autres patients. Du fait de sa fréquence relativement élevée, de son impact pronostique, de son absence de corrélation avec *FLT3/ITD*, et de la réalisation facile en pratique du test avec la sonde JC-1, la fonctionnalité d'ABCB1 paraît donc un candidat idéal comme marqueur d'évaluation du pronostic des patients au diagnostic. Ces données nécessitent d'être confirmées par une étude prospective plus large, mais il paraît raisonnable de proposer qu'un test de fonctionnalité d'ABCB1 avec la sonde JC-1 soit pratiqué systématiquement chez les patients atteints de LAM. La fonctionnalité d'ABCB1, associée à l'âge et à la présence de *FLT3/ITD* pourrait être à la base d'un système de classification pronostique des patients au diagnostic. L'impact de l'allogreffe de CSH en fonction de la présence de *FLT3/ITD* et de l'activité d'ABCB1 devrait également être étudié.

Enfin, si on s'intéresse à la population considérée habituellement comme de pronostic intermédiaire, c'est-à-dire, les patients à cytogénétique normale, sans mutation de *NPM1* ni *FLT3/ITD*, et chez qui l'attitude thérapeutique optimale, et notamment la place de l'allogreffe de CSH, est très discutée, l'expression d'ABCB1 reste, dans notre étude, le seul facteur pronostic indépendant en plus de l'âge. Même si les résultats dans ce sous-groupe doivent être tempérés par un faible effectif de patients, le caractère hautement significatif de la

fonctionnalité d'ABCB1 sur le pronostic, en l'absence d'influence des autres facteurs testés, démontre la place essentielle qu'un tel test devrait prendre dans l'établissement d'une classification pronostique des LAM. Là encore, les résultats doivent être confirmés sur une série plus large et de manière prospective, et l'impact de l'allogreffe de CSH doit être établi avant de pouvoir utiliser en pratique le test JC-1 dans les décisions thérapeutiques.

D. Facteurs pronostiques

Dans notre étude, les facteurs pronostiques pour l'OS dans la population générale sont l'âge, le caryotype, la présence de *FLT3/ITD* et la fonctionnalité d'ABCB1. Contrairement à d'autres études, qui ne prennent pas en compte la fonctionnalité d'ABCB1, nous ne retrouvons pas de valeur pronostique indépendante du statut mutationnel de *NPM1*, malgré une forte tendance, ni des mutations de *CEBPA* ou de l'expression de *BAALC*. De même, dans la population à caryotype normal, *NPM1*, *CEBPA* et *BAALC* n'ont pas de valeur pronostique indépendante. Une partie de ces résultats pourrait être expliquée par le relativement faible effectif de patients inclus dans l'étude, et par le manque de puissance statistique qui lui serait lié. Le caractère très peu significatif sur le pronostic de ces différents marqueurs (avec des valeurs de p supérieures à 0,2) dans notre analyse statistique, malgré la forte significativité retrouvée d'autres facteurs irait contre cette hypothèse. Comme déjà discuté dans la partie précédente, une autre explication concernant l'absence d'impact des mutations de *NPM1* et de l'expression de *BAALC* serait les liens entre ces protéines et l'expression et/ou l'activité d'ABCB1, en postulant qu'une forte activité d'ABCB1 serait en partie responsable du mauvais pronostic associé à ces marqueurs.

Il est à noter, de plus, que quelques études ne retrouvent pas d'impact pronostique à *NPM1* (74, 76), et que cet impact disparaît quand les mutations de *NPM1* sont associées à *FLT3/ITD* (69). Par ailleurs, il a été reporté que, parmi les patients porteurs de mutations de *NPM1*, le

sous-groupe porteur de mutation surajoutée d'*IDH1* ou d'*IDH2* avait un pronostic défavorable (158). De manière intéressante, une étude de profil d'expression génique a démontré que les mutations d'*IDH2* étaient associées à une surexpression d'*ABCB1* (96). Nous pouvons de nouveau faire l'hypothèse qu'une partie des effets délétères des mutations d'*IDH2* serait liée à cette surexpression, et que l'association mutations de *NPM1*, mutations d'*IDH*, et surexpression d'*ABCB1* pourrait expliquer l'absence d'impact des mutations de *NPM1* chez nos patients. Les mutations d'*IDH* n'ont pas pu être étudiées chez nos patients, et l'effectif de patients porteurs de mutation de *NPM1* sans *FLT3/ITD* est trop faible pour en tirer une conclusion significative. Les relations précises entre *NPM1*, *IDH* et *ABCB1* devront être plus largement étudiées.

Dans notre étude, nous ne retrouvons pas d'impact pronostique des mutations de *CEBPA*, ni dans la population générale, ni, contrairement aux précédentes études de la littérature, dans la population à caryotype normal. Plusieurs explications sont possibles. La première est liée à notre méthode de détection des mutations. En effet, avec cette technique reposant sur la mesure de la longueur des fragments du gène *CEBPA*, nous pouvons seulement repérer les mutations par insertion ou par délétion de bases, mais pas les mutations par substitutions. Ces dernières mutations représentent entre 5 et 15 % des mutations décrites de *CEBPA* dans les LAM. De plus, il existe des polymorphismes de *CEBPA* avec insertion de plusieurs paires de bases, qui ont pu être considérés, avec notre technique, comme des mutations. Si certains auteurs recommandent, afin de permettre une détection de toutes les mutations, de compléter par un séquençage complet du gène (159), la sensibilité de notre technique a cependant été évaluée à 93 % (160). La confirmation de la présence de mutations par séquençage n'a pas été réalisée pour l'instant. Une seconde explication possible à l'absence d'impact des mutations de *CEBPA* sur nos patients, serait que nous nous sommes intéressés seulement aux mutations simples de *CEBPA*, et non aux doubles mutations. Or, dans de récentes études, seules ces

doubles mutations auraient en fait un impact pronostique (86, 87). Du fait du nombre très faible de patients porteurs de double mutation de *CEBPA* dans notre étude (8 patients, soit moins de 4 % de la population totale), nous n'avons pas considéré ces doubles mutations dans l'analyse statistique.

E. ABCB1 comme cible thérapeutique dans la LAM

Du fait de l'explosion, ces dernières années, du nombre des marqueurs moléculaires, et des succès très limités obtenus, en pratique clinique, avec l'utilisation d'inhibiteurs d'ABCB1 (39, 40, 161), l'évaluation de l'activité d'ABCB1 a été moins pratiquée. Néanmoins, il est à noter que, dans une étude de phase 3, et quand les patients étaient stratifiés selon l'activité d'ABCB1, un clair avantage à l'administration d'un inhibiteur (quinine) a été retrouvé (39). De plus, dans une étude utilisant la ciclosporine, un modulateur plus large de la famille des protéines ABC, un avantage a également été démontré (38), contrairement à la majorité des études utilisant des inhibiteurs plus spécifiques d'ABCB1, comme par exemple le PSC833 (41). Comme la sonde JC-1 pourrait évaluer l'activité regroupée des protéines ABC, et qu'une haute fonctionnalité a été retrouvée chez 20 % des patients, il pourrait être utile, dans le futur, de réévaluer l'impact de l'utilisation d'un inhibiteur large spectre des protéines ABC, en cas de forte activité, évaluée par cette sonde.

Enfin, une autre solution pour dépasser le problème de la chimio-résistance liée aux protéines ABC serait le développement d'autres drogues pouvant se substituer aux anthracyclines, efficaces contre la LAM, et qui ne seraient pas des substrats des protéines ABC, comme par exemple l'Amonafide -L-malate (162).

V- Conclusion

Pour la première fois, nous avons montré dans cette étude, que, dans les leucémies aiguës myéloïdes, une forte activité de la protéine ABCB1 est associée à une haute expression de *BAALC*, et à l'absence de mutation de *NPM1*. De plus, malgré l'apparition des nouveaux marqueurs moléculaires couramment utilisés, cette activité, évaluée au diagnostic, reste un facteur pronostique majeur pour la survie après un traitement intensif, avec une association indépendante d'un fort niveau d'activité à un pronostic défavorable, notamment chez les patients à cytogénétique normale.

De plus, dans notre étude, cette activité reste, chez les patients à caryotype normal, le seul facteur pronostique, avec la présence de duplication de *FLT3* et l'âge. Les patients associant une faible activité d'ABCB1 à l'absence de duplication de *FLT3* ont une probabilité de survie nettement supérieure à celle des autres patients.

Du fait de la fréquence relativement élevée d'une haute activité d'ABCB1, et de cette valeur hautement pronostique, nous pensons que l'activité d'ABCB1 devrait être évaluée systématiquement chez les patients atteints de LAM au diagnostic, dans le but de guider les choix thérapeutiques. Cette attitude doit être évaluée dans le cadre d'études prospectives plus larges.

Annexe 1 : classification OMS des LAM (2008)

- 1) LAM avec anomalies génétiques récurrentes
 - a. LAM avec translocations ou inversions chromosomiques récurrentes
 - i. Translocation (8;21)(q22 ;q22)
 - ii. Inversion (16)(p13.1q22) ou translocation (16;16)(p13.1;q22)
 - iii. Translocation (15;17)(q22;q12)
 - iv. Translocation (9;11)(p22 ;q23)
 - v. Translocation (6;9)(p23 ;q34)
 - vi. Inversion (3)(q21q26.2) ou translocation (3;3)(q214 ;q26.2)
 - vii. Translocation (1;22)(p13 ;q13)
 - b. LAM avec mutations de gènes
 - i. Entité provisoire : LAM avec mutation de NPM1
 - ii. Entité provisoire : LAM avec mutation de CEBPA
- 2) LAM secondaire aux myéلودysplasies
- 3) LAM secondaire aux traitements (chimiothérapie et radiothérapie)
- 4) LAM sans autre spécificité
 - a. LAM avec différenciation minimale
 - b. LAM sans maturation
 - c. LAM avec maturation
 - d. LA myélomonocytaire
 - e. LA monoblastique et monocytaire
 - f. LA érythroïde
 - i. Leucémie érythroïde pure
 - ii. Erythroleucémie, avec composant érythroïde et myéloïde
 - g. LA à différenciation mégacaryoblastique
 - h. LA à différenciation basophilique
 - i. Panmyélose aiguë avec myélofibrose
- 5) Sarcome myéloïde
- 6) Proliférations myéloïdes en rapport avec un syndrome de Down
 - a. Anomalie transitoire de la myélopoïèse
 - b. LAM associée au syndrome de Down
- 7) Leucémie à cellules dendritiques plasmacytoïdes

8) LA de lignée ambiguë

- a. LA indifférenciée
- b. LA biphénotypique avec t(9 ;22)(q34 ;q11)
- c. LA biphénotypique avec t(v ;11q23) : réarrangement de MLL
- d. LA biphénotypique B / myéloïde
- e. LA biphénotypique T / myéloïde
- f. Entité provisoire : Leucémie/lymphome lymphoblastique à NK

Annexe 2 : Classification franco-américaine et britannique (FAB) des LAM

- 1) LAM 1 : LAM sans maturation
 - a. Proportion de blastes médullaires supérieure à 30 % des cellules nucléées
 - b. Proportion de cellules granuleuses en cours de maturation inférieure à 10 % dans la moelle osseuse
- 2) LAM 2 : LAM avec maturation granuleuse
 - a. Proportion de blastes médullaires supérieure à 30 % des cellules nucléées
 - b. Proportion de cellules granuleuses en cours de maturation supérieure à 10 % dans la moelle osseuse
 - c. Proportion de cellules monocytaires inférieure à 20 % dans la moelle osseuse
- 3) LAM 3 : LAM à promyélocytes
 - a. Proportion de blastes médullaires supérieure à 30 % avec présence de corps d'Auer en fagots
 - b. Présence de promyélocytes anormaux
- 4) LAM 4 : LAM myélomonocytaire
 - a. Proportion de blastes médullaires supérieure à 30 %
 - b. Proportion de cellules granuleuses en cours de maturation supérieure à 10 % dans la moelle osseuse
 - c. Proportion de cellules monocytaires supérieure à 20 % dans la moelle osseuse
- 5) LAM 5 : LAM monoblastique
 - a. Plus de 80 % de cellules de lignées monocytaires dans la moelle
- 6) LAM 6 : Erythroleucémie
 - a. Proportion de cellules érythroïdes médullaires supérieure à 50 %
 - b. Proportion de blastes supérieure à 30 % des cellules non érythroïdes
- 7) LAM 7 : LA à mégacaryocytes
 - a. Proportion de blastes médullaires supérieure à 30 %
 - b. 50 % des blastes sont de lignée mégacaryocytaire
- 8) LAM 0 : LA indifférenciée
 - a. Proportion de blastes supérieure à 30 %
 - b. Absence de signe de différenciation des blastes
 - c. Présence de marqueurs myéloïdes en immunophénotypage

Annexe 3 : Echelle d'activité de l'ECOG

0 : Activité normale ; Capacité de réaliser toutes les activités réalisées avant le diagnostic.

1 : Persistance de l'autonomie. Gêne dans l'activité physique prolongée. Capacité d'effectuer un travail léger ou sédentaire (travail de bureau).

2 : Persistance de l'autonomie. Impossibilité d'effectuer un travail. Capacité de rester actif plus de 50 % du temps d'éveil.

3 : Autonomie limitée. Impossibilité de passer plus de 50 % du temps d'éveil sans être assis ou couché au lit.

4 : Perte d'autonomie complète. Incapacité à passer toute la journée en dehors du fauteuil ou du lit.

5 : Décédé.

Annexe 4 : critères d'inclusion dans les protocoles AML 10 et AML 12 de l'EORTC

Critères d'inclusion :

- 1) LAM nouvellement diagnostiquée, quelque soit le type dans la classification FAB, à l'exclusion des LAM 3.
- 2) Patient âgé de 15 à 60 ans.

Critères de non-inclusion :

- 1) Patient antérieurement traité par chimiothérapie (à l'exception d'un traitement de moins de sept jours par hydroxyurée), radiothérapie, ou par plus de sept jours de corticothérapie.
- 2) Leucémie secondaire à un syndrome myéloprolifératif chronique.
- 3) Leucémie secondaire à un syndrome myélodysplasique évoluant depuis plus de six mois.
- 4) Affections intercurrentes sévères cardiaques (fraction d'éjection ventriculaire inférieure à 50 %), hépatiques, rénales (bilirubine ou créatinine supérieures à trois fois la valeur normale), pulmonaires, neurologiques ou psychiatriques.
- 5) Autre pathologie maligne évolutive.
- 6) Infection non contrôlée.
- 7) Score à 4 sur l'échelle d'activité.
- 8) Condition psychologique, familiale, sociologique ou géographique pouvant intervenir sur la compliance ou le suivi.

Annexe 5 : critères d'inclusion dans le protocole AML 13 de l'EORTC

Critères d'inclusion :

- 1) LAM nouvellement diagnostiquée, quelque soit le type dans la classification FAB, à l'exclusion des LAM 3.
- 2) Patient âgé de 61 à 80 ans.
- 3) Score à 2 ou moins sur l'échelle d'activité.
- 4) Fonction cardiaque normale.

Critères de non-inclusion :

- 1) Antécédent de chimiothérapie.
- 2) Affections intercurrentes sévères cardiaques (fraction d'éjection ventriculaire gauche inférieure à 50 %), hépatiques, rénales (bilirubine ou créatinine supérieures à deux fois la valeur normale), pulmonaires, neurologiques ou psychiatriques.
- 3) Autre pathologie maligne évolutive.
- 4) Leucémie myéloïde chronique en crise blastique.
- 5) Infection non contrôlée.

Références bibliographiques

1. Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, Jaffe ES, Pileri SA, Stein H, et al., editors. WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues WHO; 2008.
2. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. 1995 Oct;9(10):1783-6.
3. SEER. SEER Stat Fact Sheets: Leukemia. 2010 [Décembre 2010]; Available from: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/leuks.html>.
4. Nakanishi M, Tanaka K, Shintani T, Takahashi T, Kamada N. Chromosomal instability in acute myelocytic leukemia and myelodysplastic syndrome patients among atomic bomb survivors. *J Radiat Res (Tokyo)*. 1999 Jun;40(2):159-67.
5. Travis LB, Li CY, Zhang ZN, Li DG, Yin SN, Chow WH, et al. Hematopoietic malignancies and related disorders among benzene-exposed workers in China. *Leuk Lymphoma*. 1994 Jun;14(1-2):91-102.
6. Travis LB, Curtis RE, Stovall M, Holowaty EJ, van Leeuwen FE, Glimelius B, et al. Risk of leukemia following treatment for non-Hodgkin's lymphoma. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Oct 5;86(19):1450-7.
7. Smith SM, Le Beau MM, Huo D, Karrison T, Sobecks RM, Anastasi J, et al. Clinical-cytogenetic associations in 306 patients with therapy-related myelodysplasia and myeloid leukemia: the University of Chicago series. *Blood*. 2003 Jul 1;102(1):43-52.
8. Deschler B, Lubbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer*. 2006 Nov 1;107(9):2099-107.
9. Estey E, Dohner H. Acute myeloid leukaemia. *Lancet*. 2006 Nov 25;368(9550):1894-907.
10. Frohling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol*. 2005 Sep 10;23(26):6285-95.
11. Kelly LM, Liu Q, Kutok JL, Williams IR, Boulton CL, Gilliland DG. FLT3 internal tandem duplication mutations associated with human acute myeloid leukemias induce myeloproliferative disease in a murine bone marrow transplant model. *Blood*. 2002 Jan 1;99(1):310-8.
12. Moreau-Gachelin F. Multi-stage Friend murine erythroleukemia: molecular insights into oncogenic cooperation. *Retrovirology*. 2008;5:99.
13. Kosmider O, Denis N, Lacout C, Vainchenker W, Dubreuil P, Moreau-Gachelin F. Kit-activating mutations cooperate with Spi-1/PU.1 overexpression to promote tumorigenic progression during erythroleukemia in mice. *Cancer Cell*. 2005 Dec;8(6):467-78.
14. Kelly LM, Gilliland DG. Genetics of myeloid leukemias. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 2002;3:179-98.
15. Lowenberg B, Zittoun R, Kerkhofs H, Jehn U, Abels J, Debusscher L, et al. On the value of intensive remission-induction chemotherapy in elderly patients of 65+ years with acute myeloid leukemia: a randomized phase III study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Leukemia Group. *J Clin Oncol*. 1989 Sep;7(9):1268-74.
16. Pulsoni A, Pagano L, Latagliata R, Casini M, Cerri R, Crugnola M, et al. Survival of elderly patients with acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2004 Mar;89(3):296-302.
17. Cheson BD, Bennett JM, Kopecky KJ, Buchner T, Willman CL, Estey EH, et al. Revised recommendations of the International Working Group for Diagnosis, Standardization of Response Criteria,

Treatment Outcomes, and Reporting Standards for Therapeutic Trials in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2003 Dec 15;21(24):4642-9.

18. Tallman MS, Gilliland DG, Rowe JM. Drug therapy for acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Aug 15;106(4):1154-63.

19. Rowe JM. Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*. 2009:396-405.

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

21. Burnett AK, Hills RK, Milligan D, Kjeldsen L, Kell J, Russell NH, et al. Identification of patients with acute myeloblastic leukemia who benefit from the addition of gemtuzumab ozogamicin: results of the MRC AML15 trial. *J Clin Oncol*. 2011 Feb 1;29(4):369-77.

22. Thomas X, Raffoux E, Botton S, Pautas C, Arnaud P, de Revel T, et al. Effect of priming with granulocyte-macrophage colony-stimulating factor in younger adults with newly diagnosed acute myeloid leukemia: a trial by the Acute Leukemia French Association (ALFA) Group. *Leukemia*. 2007 Mar;21(3):453-61.

23. Lowenberg B, van Putten W, Theobald M, Gmur J, Verdonck L, Sonneveld P, et al. Effect of priming with granulocyte colony-stimulating factor on the outcome of chemotherapy for acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2003 Aug 21;349(8):743-52.

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

25. Cassileth PA, Lynch E, Hines JD, Oken MM, Mazza JJ, Bennett JM, et al. Varying intensity of postremission therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1992 Apr 15;79(8):1924-30.

26. Elonen E, Almqvist A, Hanninen A, Jansson SE, Jarventie G, Koistinen P, et al. Comparison between four and eight cycles of intensive chemotherapy in adult acute myeloid leukemia: a randomized trial of the Finnish Leukemia Group. *Leukemia*. 1998 Jul;12(7):1041-8.

27. Miyawaki S, Ohtake S, Fujisawa S, Kiyoi H, Shinagawa K, Usui N, et al. A randomized comparison of 4 courses of standard-dose multiagent chemotherapy versus 3 courses of high-dose cytarabine alone in postremission therapy for acute myeloid leukemia in adults: the JALSG AML201 Study. *Blood*. 2011 Feb 24;117(8):2366-72.

28. Moore JO, George SL, Dodge RK, Amrein PC, Powell BL, Kolitz JE, et al. Sequential multiagent chemotherapy is not superior to high-dose cytarabine alone as postremission intensification therapy for acute myeloid leukemia in adults under 60 years of age: Cancer and Leukemia Group B Study 9222. *Blood*. 2005 May 1;105(9):3420-7.

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

30. Zittoun RA, Mandelli F, Willemze R, de Witte T, 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 Jan 26;332(4):217-23.

31. Gardin C, Turlure P, Fagot T, Thomas X, Terre C, Contentin N, et al. Postremission treatment of elderly patients with acute myeloid leukemia in first complete remission after intensive induction chemotherapy: results of the multicenter randomized Acute Leukemia French Association (ALFA) 9803 trial. *Blood*. 2007 Jun 15;109(12):5129-35.

32. Goldstone AH, Burnett AK, Wheatley K, Smith AG, Hutchinson RM, Clark RE. Attempts to improve treatment outcomes in acute myeloid leukemia (AML) in older patients: the results of the United Kingdom Medical Research Council AML11 trial. *Blood*. 2001 Sep 1;98(5):1302-11.
33. Stone RM, Berg DT, George SL, Dodge RK, Paciucci PA, Schulman PP, et al. Postremission therapy in older patients with de novo acute myeloid leukemia: a randomized trial comparing mitoxantrone and intermediate-dose cytarabine with standard-dose cytarabine. *Blood*. 2001 Aug 1;98(3):548-53.
34. Estey E, de Lima M, Tibes R, Pierce S, Kantarjian H, Champlin R, et al. Prospective feasibility analysis of reduced-intensity conditioning (RIC) regimens for hematopoietic stem cell transplantation (HSCT) in elderly patients with acute myeloid leukemia (AML) and high-risk myelodysplastic syndrome (MDS). *Blood*. 2007 Feb 15;109(4):1395-400.
35. Burnett AK, Milligan D, Prentice AG, Goldstone AH, McMullin MF, Hills RK, et al. A comparison of low-dose cytarabine and hydroxyurea with or without all-trans retinoic acid for acute myeloid leukemia and high-risk myelodysplastic syndrome in patients not considered fit for intensive treatment. *Cancer*. 2007 Mar 15;109(6):1114-24.
36. Appelbaum FR, Kopecky KJ, Tallman MS, Slovak ML, Gundacker HM, Kim HT, et al. The clinical spectrum of adult acute myeloid leukaemia associated with core binding factor translocations. *Br J Haematol*. 2006 Oct;135(2):165-73.
37. Amadori S, Suci S, Selleslag D, Stasi R, Alimena G, Baila L, et al. Randomized trial of two schedules of low-dose gemtuzumab ozogamicin as induction monotherapy for newly diagnosed acute myeloid leukaemia in older patients not considered candidates for intensive chemotherapy. A phase II study of the EORTC and GIMEMA leukaemia groups (AML-19). *Br J Haematol*. 2010 May;149(3):376-82.
38. List AF, Kopecky KJ, Willman CL, Head DR, Persons DL, Slovak ML, et al. Benefit of cyclosporine modulation of drug resistance in patients with poor-risk acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group study. *Blood*. 2001 Dec 1;98(12):3212-20.
39. Solary E, Drenou B, Campos L, de Cremoux P, Mugneret F, Moreau P, et al. Quinine as a multidrug resistance inhibitor: a phase 3 multicentric randomized study in adult de novo acute myelogenous leukemia. *Blood*. 2003 Aug 15;102(4):1202-10.
40. Solary E, Witz B, Caillot D, Moreau P, Desablens B, Cahn JY, et al. Combination of quinine as a potential reversing agent with mitoxantrone and cytarabine for the treatment of acute leukemias: a randomized multicenter study. *Blood*. 1996 Aug 15;88(4):1198-205.
41. Kolitz JE, George SL, Marcucci G, Vij R, Powell BL, Allen SL, et al. P-glycoprotein inhibition using valspodar (PSC-833) does not improve outcomes for patients younger than age 60 years with newly diagnosed acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B study 19808. *Blood*. 2010 Sep 2;116(9):1413-21.
42. Fenaux P, Mufti GJ, Hellstrom-Lindberg E, Santini V, Gattermann N, Germing U, et al. Azacitidine prolongs overall survival compared with conventional care regimens in elderly patients with low bone marrow blast count acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):562-9.
43. Pulte D, Gondos A, Brenner H. Improvements in survival of adults diagnosed with acute myeloblastic leukemia in the early 21st century. *Haematologica*. 2008 Apr;93(4):594-600.
44. Appelbaum FR, Gundacker H, Head DR, Slovak ML, Willman CL, Godwin JE, et al. Age and acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006 May 1;107(9):3481-5.
45. Juliusson G, Antunovic P, Derolf A, Lehmann S, Mollgard L, Stockelberg D, et al. Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry. *Blood*. 2009 Apr 30;113(18):4179-87.
46. Sorrow ML, Maris MB, Storb R, Baron F, Sandmaier BM, Maloney DG, et al. Hematopoietic cell transplantation (HCT)-specific comorbidity index: a new tool for risk assessment before allogeneic HCT. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2912-9.

47. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, et al. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.* 1982 Dec;5(6):649-55.
48. Foran JM. New prognostic markers in acute myeloid leukemia: perspective from the clinic. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program.* 2010;2010:47-55.
49. Kristinsson SY, Derolf AR, Edgren G, Dickman PW, Bjorkholm M. Socioeconomic differences in patient survival are increasing for acute myeloid leukemia and multiple myeloma in Sweden. *J Clin Oncol.* 2009 Apr 20;27(12):2073-80.
50. Sekeres MA, Peterson B, Dodge RK, Mayer RJ, Moore JO, Lee EJ, et al. Differences in prognostic factors and outcomes in African Americans and whites with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2004 Jun 1;103(11):4036-42.
51. Chelghoum Y, Danaïla C, Belhabri A, Charrin C, Le QH, Michallet M, et al. Influence of cigarette smoking on the presentation and course of acute myeloid leukemia. *Ann Oncol.* 2002 Oct;13(10):1621-7.
52. Chaoui D, Legrand O, Roche N, Cornet M, Lefebvre A, Peffault de Latour R, et al. Incidence and prognostic value of respiratory events in acute leukemia. *Leukemia.* 2004 Apr;18(4):670-5.
53. Schlenk RF, Benner A, Hartmann F, del Valle F, Weber C, Pralle H, et al. Risk-adapted postremission therapy in acute myeloid leukemia: results of the German multicenter AML HD93 treatment trial. *Leukemia.* 2003 Aug;17(8):1521-8.
54. Kern W, Haferlach T, Schoch C, Loffler H, Gassmann W, Heinecke A, et al. Early blast clearance by remission induction therapy is a major independent prognostic factor for both achievement of complete remission and long-term outcome in acute myeloid leukemia: data from the German AML Cooperative Group (AMLCG) 1992 Trial. *Blood.* 2003 Jan 1;101(1):64-70.
55. Damm F, Heuser M, Morgan M, Wagner K, Gorlich K, Grosshennig A, et al. Integrative prognostic risk score in acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Blood.* 2011 Mar 3.
56. Bloomfield CD, Goldman A, Hassfeld D, de la Chapelle A. Fourth International Workshop on Chromosomes in Leukemia 1982: Clinical significance of chromosomal abnormalities in acute nonlymphoblastic leukemia. *Cancer Genet Cytogenet.* 1984 Mar;11(3):332-50.
57. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood.* 1998 Oct 1;92(7):2322-33.
58. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood.* 2000 Dec 15;96(13):4075-83.
59. Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4325-36.
60. Rosnet O, Mattei MG, Marchetto S, Birnbaum D. Isolation and chromosomal localization of a novel FMS-like tyrosine kinase gene. *Genomics.* 1991 Feb;9(2):380-5.
61. Lyman SD, James L, Zappone J, Sleath PR, Beckmann MP, Bird T. Characterization of the protein encoded by the *flt3* (*flk2*) receptor-like tyrosine kinase gene. *Oncogene.* 1993 Apr;8(4):815-22.
62. Lyman SD, James L, Johnson L, Brasel K, de Vries P, Escobar SS, et al. Cloning of the human homologue of the murine *flt3* ligand: a growth factor for early hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 1994 May 15;83(10):2795-801.

63. Rosnet O, Buhring HJ, Marchetto S, Rappold I, Lavagna C, Sainty D, et al. Human FLT3/FLK2 receptor tyrosine kinase is expressed at the surface of normal and malignant hematopoietic cells. *Leukemia*. 1996 Feb;10(2):238-48.
64. Lisovsky M, Estrov Z, Zhang X, Consoli U, Sanchez-Williams G, Snell V, et al. Flt3 ligand stimulates proliferation and inhibits apoptosis of acute myeloid leukemia cells: regulation of Bcl-2 and Bax. *Blood*. 1996 Nov 15;88(10):3987-97.
65. Hayakawa F, Towatari M, Kiyoi H, Tanimoto M, Kitamura T, Saito H, et al. Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines. *Oncogene*. 2000 Feb 3;19(5):624-31.
66. Nakao M, Yokota S, Iwai T, Kaneko H, Horiike S, Kashima K, et al. Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 1996 Dec;10(12):1911-8.
67. Kiyoi H, Naoe T, Nakano Y, Yokota S, Minami S, Miyawaki S, et al. Prognostic implication of FLT3 and N-RAS gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1999 May 1;93(9):3074-80.
68. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, Harrison G, Langabeer SE, Belton AA, et al. The presence of a FLT3 internal tandem duplication in patients with acute myeloid leukemia (AML) adds important prognostic information to cytogenetic risk group and response to the first cycle of chemotherapy: analysis of 854 patients from the United Kingdom Medical Research Council AML 10 and 12 trials. *Blood*. 2001 Sep 15;98(6):1752-9.
69. Mrozek K, Marcucci G, Paschka P, Whitman SP, Bloomfield CD. Clinical relevance of mutations and gene-expression changes in adult acute myeloid leukemia with normal cytogenetics: are we ready for a prognostically prioritized molecular classification? *Blood*. 2007 Jan 15;109(2):431-48.
70. Whitman SP, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Paschka P, Langer C, et al. FLT3 D835/I836 mutations are associated with poor disease-free survival and a distinct gene-expression signature among younger adults with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia lacking FLT3 internal tandem duplications. *Blood*. 2008 Feb 1;111(3):1552-9.
71. Mead AJ, Gale RE, Hills RK, Gupta M, Young BD, Burnett AK, et al. Conflicting data on the prognostic significance of FLT3/TKD mutations in acute myeloid leukemia might be related to the incidence of biallelic disease. *Blood*. 2008 Jul 15;112(2):444-5; author reply 5.
72. Borer RA, Lehner CF, Eppenberger HM, Nigg EA. Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm. *Cell*. 1989 Feb 10;56(3):379-90.
73. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*. 2005 Jan 20;352(3):254-66.
74. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, Tomita A, Yamaji S, Suzuki R, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005 Oct 15;106(8):2854-61.
75. Dohner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rucker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005 Dec 1;106(12):3740-6.
76. Boissel N, Renneville A, Biggio V, Philippe N, Thomas X, Cayuela JM, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005 Nov 15;106(10):3618-20.
77. Lekstrom-Himes J, Xanthopoulos KG. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem*. 1998 Oct 30;273(44):28545-8.
78. Tenen DG, Hromas R, Licht JD, Zhang DE. Transcription factors, normal myeloid development, and leukemia. *Blood*. 1997 Jul 15;90(2):489-519.

79. Zhang DE, Zhang P, Wang ND, Hetherington CJ, Darlington GJ, Tenen DG. Absence of granulocyte colony-stimulating factor signaling and neutrophil development in CCAAT enhancer binding protein alpha-deficient mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Jan 21;94(2):569-74.
80. Pabst T, Mueller BU, Zhang P, Radomska HS, Narravula S, Schnittger S, et al. Dominant-negative mutations of CEBPA, encoding CCAAT/enhancer binding protein-alpha (C/EBPalpha), in acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2001 Mar;27(3):263-70.
81. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela JM, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 2002 Oct 15;100(8):2717-23.
82. Benthous T, Schneider F, Mellert G, Zellmeier E, Schneider S, Kakadia PM, et al. Rapid and sensitive screening for CEBPA mutations in acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*. 2008 Oct;143(2):230-9.
83. Bienz M, Ludwig M, Leibundgut EO, Mueller BU, Ratschiller D, Solenthaler M, et al. Risk assessment in patients with acute myeloid leukemia and a normal karyotype. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 15;11(4):1416-24.
84. Frohling S, Schlenk RF, Stolze I, Bihlmayr J, Benner A, Kreitmeier S, et al. CEBPA mutations in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: prognostic relevance and analysis of cooperating mutations. *J Clin Oncol*. 2004 Feb 15;22(4):624-33.
85. Renneville A, Boissel N, Gachard N, Naguib D, Bastard C, de Botton S, et al. The favorable impact of CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia is only observed in the absence of associated cytogenetic abnormalities and FLT3 internal duplication. *Blood*. 2009 May 21;113(21):5090-3.
86. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010 Jun 1;28(16):2739-47.
87. Wouters BJ, Lowenberg B, Erpelinck-Verschueren CA, van Putten WL, Valk PJ, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009 Mar 26;113(13):3088-91.
88. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, Hoster E, Schneider S, Zellmeier E, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010 Feb 1;28(4):570-7.
89. Tanner SM, Austin JL, Leone G, Rush LJ, Plass C, Heinonen K, et al. BAALC, the human member of a novel mammalian neuroectoderm gene lineage, is implicated in hematopoiesis and acute leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov 20;98(24):13901-6.
90. Baldus CD, Tanner SM, Ruppert AS, Whitman SP, Archer KJ, Marcucci G, et al. BAALC expression predicts clinical outcome of de novo acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: a Cancer and Leukemia Group B Study. *Blood*. 2003 Sep 1;102(5):1613-8.
91. Baldus CD, Thiede C, Soucek S, Bloomfield CD, Thiel E, Ehniger G. BAALC expression and FLT3 internal tandem duplication mutations in acute myeloid leukemia patients with normal cytogenetics: prognostic implications. *J Clin Oncol*. 2006 Feb 10;24(5):790-7.
92. Langer C, Radmacher MD, Ruppert AS, Whitman SP, Paschka P, Mrozek K, et al. High BAALC expression associates with other molecular prognostic markers, poor outcome, and a distinct gene-expression signature in cytogenetically normal patients younger than 60 years with acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B (CALGB) study. *Blood*. 2008 Jun 1;111(11):5371-9.
93. Schwind S, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Holland KB, et al. BAALC and ERG expression levels are associated with outcome and distinct gene- and microRNA-expression profiles in older patients with de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood*. 2010 Sep 14.

94. Metzeler KH, Dufour A, Benthaus T, Hummel M, Sauerland MC, Heinecke A, et al. ERG expression is an independent prognostic factor and allows refined risk stratification in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a comprehensive analysis of ERG, MN1, and BAALC transcript levels using oligonucleotide microarrays. *J Clin Oncol.* 2009 Oct 20;27(30):5031-8.
95. Mardis ER, Ding L, Dooling DJ, Larson DE, McLellan MD, Chen K, et al. Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. *N Engl J Med.* 2009 Sep 10;361(11):1058-66.
96. Marcucci G, Maharry K, Wu YZ, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2010 May 10;28(14):2348-55.
97. Thol F, Damm F, Wagner K, Gohring G, Schlegelberger B, Hoelzer D, et al. Prognostic impact of IDH2 mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Blood.* 2010 Jul 29;116(4):614-6.
98. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, McLellan MD, Lamprecht T, Larson DE, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 2010 Dec 16;363(25):2424-33.
99. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, Becker H, et al. TET2 Mutations Improve the New European LeukemiaNet Risk Classification of Acute Myeloid Leukemia: A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2011 Apr 1;29(10):1373-81.
100. Radich JP, Kopecky KJ, Willman CL, Weick J, Head D, Appelbaum F, et al. N-ras mutations in adult de novo acute myelogenous leukemia: prevalence and clinical significance. *Blood.* 1990 Aug 15;76(4):801-7.
101. Whitman SP, Ruppert AS, Marcucci G, Mrozek K, Paschka P, Langer C, et al. Long-term disease-free survivors with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and MLL partial tandem duplication: a Cancer and Leukemia Group B study. *Blood.* 2007 Jun 15;109(12):5164-7.
102. Marcucci G, Baldus CD, Ruppert AS, Radmacher MD, Mrozek K, Whitman SP, et al. Overexpression of the ETS-related gene, ERG, predicts a worse outcome in acute myeloid leukemia with normal karyotype: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2005 Dec 20;23(36):9234-42.
103. Marcucci G, Maharry K, Whitman SP, Vukosavljevic T, Paschka P, Langer C, et al. High expression levels of the ETS-related gene, ERG, predict adverse outcome and improve molecular risk-based classification of cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol.* 2007 Aug 1;25(22):3337-43.
104. Tang R, Hirsch P, Fava F, Lapusan S, Marzac C, Teyssandier I, et al. High Id1 expression is associated with poor prognosis in 237 patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):2993-3000.
105. Heuser M, Beutel G, Krauter J, Dohner K, von Neuhoff N, Schlegelberger B, et al. High meninoma 1 (MN1) expression as a predictor for poor outcome in acute myeloid leukemia with normal cytogenetics. *Blood.* 2006 Dec 1;108(12):3898-905.
106. Groschel S, Lugthart S, Schlenk RF, Valk PJ, Eiwen K, Goudswaard C, et al. High EVI1 expression predicts outcome in younger adult patients with acute myeloid leukemia and is associated with distinct cytogenetic abnormalities. *J Clin Oncol.* 2010 Apr 20;28(12):2101-7.
107. Marcucci G, Mrozek K, Radmacher MD, Garzon R, Bloomfield CD. The prognostic and functional role of microRNAs in acute myeloid leukemia. *Blood.* 2011 Jan 27;117(4):1121-9.
108. Pastan I, Gottesman M. Multiple-drug resistance in human cancer. *N Engl J Med.* 1987 May 28;316(22):1388-93.
109. Kartner N, Riordan JR, Ling V. Cell surface P-glycoprotein associated with multidrug resistance in mammalian cell lines. *Science.* 1983 Sep 23;221(4617):1285-8.

110. Ueda K, Cornwell MM, Gottesman MM, Pastan I, Roninson IB, Ling V, et al. The *mdr1* gene, responsible for multidrug-resistance, codes for P-glycoprotein. *Biochem Biophys Res Commun*. 1986 Dec 30;141(3):956-62.
111. Gros P, Croop J, Roninson I, Varshavsky A, Housman DE. Isolation and characterization of DNA sequences amplified in multidrug-resistant hamster cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jan;83(2):337-41.
112. Roninson IB, Chin JE, Choi KG, Gros P, Housman DE, Fojo A, et al. Isolation of human *mdr* DNA sequences amplified in multidrug-resistant KB carcinoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Jun;83(12):4538-42.
113. Cole SP, Bhardwaj G, Gerlach JH, Mackie JE, Grant CE, Almquist KC, et al. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science*. 1992 Dec 4;258(5088):1650-4.
114. Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, Krogmann T, Gao Y, Rishi AK, et al. A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1998 Dec 22;95(26):15665-70.
115. Hamada H, Tsuruo T. Functional role for the 170- to 180-kDa glycoprotein specific to drug-resistant tumor cells as revealed by monoclonal antibodies. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986 Oct;83(20):7785-9.
116. List AF, Spier CS, Grogan TM, Johnson C, Roe DJ, Greer JP, et al. Overexpression of the major vault transporter protein lung-resistance protein predicts treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Blood*. 1996 Mar 15;87(6):2464-9.
117. Tang L, Bergevoet SM, Gilissen C, de Witte T, Jansen JH, van der Reijden BA, et al. Hematopoietic stem cells exhibit a specific ABC transporter gene expression profile clearly distinct from other stem cells. *BMC Pharmacol*. 2010;10:12.
118. Chaudhary PM, Roninson IB. Expression and activity of P-glycoprotein, a multidrug efflux pump, in human hematopoietic stem cells. *Cell*. 1991 Jul 12;66(1):85-94.
119. de Grouw EP, Raaijmakers MH, Boezeman JB, van der Reijden BA, van de Locht LT, de Witte TJ, et al. Preferential expression of a high number of ATP binding cassette transporters in both normal and leukemic CD34+CD38- cells. *Leukemia*. 2006 Apr;20(4):750-4.
120. Hamada H, Tsuruo T. Purification of the 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein associated with multidrug resistance. 170- to 180-kilodalton membrane glycoprotein is an ATPase. *J Biol Chem*. 1988 Jan 25;263(3):1454-8.
121. Higgins CF, Hiles ID, Salmond GP, Gill DR, Downie JA, Evans IJ, et al. A family of related ATP-binding subunits coupled to many distinct biological processes in bacteria. *Nature*. 1986 Oct 2-8;323(6087):448-50.
122. Ueda K, Cardarelli C, Gottesman MM, Pastan I. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1987 May;84(9):3004-8.
123. Campos L, Guyotat D, Archimbaud E, Calmard-Oriol P, Tsuruo T, Troncy J, et al. Clinical significance of multidrug resistance P-glycoprotein expression on acute nonlymphoblastic leukemia cells at diagnosis. *Blood*. 1992 Jan 15;79(2):473-6.
124. Marie JP, Zittoun R, Sikic BI. Multidrug resistance (*mdr1*) gene expression in adult acute leukemias: correlations with treatment outcome and in vitro drug sensitivity. *Blood*. 1991 Aug 1;78(3):586-92.
125. Leith CP, Kopecky KJ, Godwin J, McConnell T, Slovak ML, Chen IM, et al. Acute myeloid leukemia in the elderly: assessment of multidrug resistance (MDR1) and cytogenetics distinguishes biologic subgroups with remarkably distinct responses to standard chemotherapy. A Southwest Oncology Group study. *Blood*. 1997 May 1;89(9):3323-9.

126. Bellamy WT, Dalton WS, Kailey JM, Gleason MC, McCloskey TM, Dorr RT, et al. Verapamil reversal of doxorubicin resistance in multidrug-resistant human myeloma cells and association with drug accumulation and DNA damage. *Cancer Res.* 1988 Nov 15;48(22):6365-70.
127. Twentyman PR. Cyclosporins as drug resistance modifiers. *Biochem Pharmacol.* 1992 Jan 9;43(1):109-17.
128. Leith CP, Chen IM, Kopecky KJ, Appelbaum FR, Head DR, Godwin JE, et al. Correlation of multidrug resistance (MDR1) protein expression with functional dye/drug efflux in acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: identification of discordant MDR-/efflux+ and MDR1+/efflux- cases. *Blood.* 1995 Sep 15;86(6):2329-42.
129. Legrand O, Perrot JY, Simonin G, Baudard M, Marie JP. JC-1: a very sensitive fluorescent probe to test Pgp activity in adult acute myeloid leukemia. *Blood.* 2001 Jan 15;97(2):502-8.
130. Kruh GD, Belinsky MG. The MRP family of drug efflux pumps. *Oncogene.* 2003 Oct 20;22(47):7537-52.
131. Zaman GJ, Flens MJ, van Leusden MR, de Haas M, Mulder HS, Lankelma J, et al. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994 Sep 13;91(19):8822-6.
132. Steinbach D, Legrand O. ABC transporters and drug resistance in leukemia: was P-gp nothing but the first head of the Hydra? *Leukemia.* 2007 Jun;21(6):1172-6.
133. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Pgp and MRP activities using calcein-AM are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia patients. *Blood.* 1998 Jun 15;91(12):4480-8.
134. Legrand O, Simonin G, Perrot JY, Zittoun R, Marie JP. Both Pgp and MRP1 activities using calcein-AM contribute to drug resistance in AML. *Adv Exp Med Biol.* 1999;457:161-75.
135. Schaich M, Soucek S, Thiede C, Ehninger G, Illmer T. MDR1 and MRP1 gene expression are independent predictors for treatment outcome in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 2005 Feb;128(3):324-32.
136. Borg AG, Burgess R, Green LM, Scheper RJ, Yin JA. Overexpression of lung-resistance protein and increased P-glycoprotein function in acute myeloid leukaemia cells predict a poor response to chemotherapy and reduced patient survival. *Br J Haematol.* 1998 Dec;103(4):1083-91.
137. Filipits M, Suchomel RW, Zochbauer S, Brunner R, Lechner K, Pirker R. Multidrug resistance-associated protein in acute myeloid leukemia: No impact on treatment outcome. *Clin Cancer Res.* 1997 Aug;3(8):1419-25.
138. van der Kolk DM, de Vries EG, van Putten WJ, Verdonck LF, Ossenkuppele GJ, Verhoef GE, et al. P-glycoprotein and multidrug resistance protein activities in relation to treatment outcome in acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2000 Aug;6(8):3205-14.
139. Maliepaard M, van Gastelen MA, de Jong LA, Pluim D, van Waardenburg RC, Ruevekamp-Helmers MC, et al. Overexpression of the BCRP/MXR/ABCP gene in a topotecan-selected ovarian tumor cell line. *Cancer Res.* 1999 Sep 15;59(18):4559-63.
140. Ross DD, Karp JE, Chen TT, Doyle LA. Expression of breast cancer resistance protein in blast cells from patients with acute leukemia. *Blood.* 2000 Jul 1;96(1):365-8.
141. van der Kolk DM, Vellenga E, Scheffer GL, Muller M, Bates SE, Scheper RJ, et al. Expression and activity of breast cancer resistance protein (BCRP) in de novo and relapsed acute myeloid leukemia. *Blood.* 2002 May 15;99(10):3763-70.
142. Abbott BL, Colapietro AM, Barnes Y, Marini F, Andreeff M, Sorrentino BP. Low levels of ABCG2 expression in adult AML blast samples. *Blood.* 2002 Dec 15;100(13):4594-601.

143. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Chaoui D, Marie JP, et al. Breast cancer resistance protein and P-glycoprotein in 149 adult acute myeloid leukemias. *Clin Cancer Res.* 2004 Dec 1;10(23):7896-902.
144. Damiani D, Tiribelli M, Calistri E, Geromin A, Chiarvesio A, Michelutti A, et al. The prognostic value of P-glycoprotein (ABCB) and breast cancer resistance protein (ABCG2) in adults with de novo acute myeloid leukemia with normal karyotype. *Haematologica.* 2006 Jun;91(6):825-8.
145. Benderra Z, Faussat AM, Sayada L, Perrot JY, Tang R, Chaoui D, et al. MRP3, BCRP, and P-glycoprotein activities are prognostic factors in adult acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2005 Nov 1;11(21):7764-72.
146. Kelter G, Steinbach D, Konkimalla VB, Tahara T, Taketani S, Fiebig HH, et al. Role of transferrin receptor and the ABC transporters ABCB6 and ABCB7 for resistance and differentiation of tumor cells towards artesunate. *PLoS One.* 2007;2(8):e798.
147. Frank NY, Margaryan A, Huang Y, Schatton T, Waaga-Gasser AM, Gasser M, et al. ABCB5-mediated doxorubicin transport and chemoresistance in human malignant melanoma. *Cancer Res.* 2005 May 15;65(10):4320-33.
148. Steinbach D, Gillet JP, Sauerbrey A, Gruhn B, Dawczynski K, Bertholet V, et al. ABCA3 as a possible cause of drug resistance in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4357-63.
149. Marzac C, Garrido E, Tang R, Fava F, Hirsch P, De Benedictis C, et al. ABC transporters associated with chemoresistance : transcriptional profiling in extreme cohorts and prognostic impact in a cohort of 281 AML patients (soumis). 2011.
150. Steinbach D, Lengemann J, Voigt A, Hermann J, Zintl F, Sauerbrey A. Response to chemotherapy and expression of the genes encoding the multidrug resistance-associated proteins MRP2, MRP3, MRP4, MRP5, and SMRP in childhood acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2003 Mar;9(3):1083-6.
151. Marzac C, Teyssandier I, Calendini O, Perrot JY, Faussat AM, Tang R, et al. Flt3 internal tandem duplication and P-glycoprotein functionality in 171 patients with acute myeloid leukemia. *Clin Cancer Res.* 2006 Dec 1;12(23):7018-24.
152. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* 1976 Aug;33(4):451-8.
153. Kuhnel JM, Perrot JY, Faussat AM, Marie JP, Schwaller MA. Functional assay of multidrug resistant cells using JC-1, a carbocyanine fluorescent probe. *Leukemia.* 1997 Jul;11(7):1147-55.
154. Goodell MA, Brose K, Paradis G, Conner AS, Mulligan RC. Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1797-806.
155. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, Kohlmann A, Mancini M, Cuneo A, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood.* 2009 Oct 1;114(14):3024-32.
156. Becker H, Marcucci G, Maharry K, Radmacher MD, Mrozek K, Margeson D, et al. Favorable prognostic impact of NPM1 mutations in older patients with cytogenetically normal de novo acute myeloid leukemia and associated gene- and microRNA-expression signatures: a Cancer and Leukemia Group B study. *J Clin Oncol.* 2010 Feb 1;28(4):596-604.
157. Seedhouse CH, Grundy M, White P, Li Y, Fisher J, Yakunina D, et al. Sequential influences of leukemia-specific and genetic factors on p-glycoprotein expression in blasts from 817 patients entered into the National Cancer Research Network acute myeloid leukemia 14 and 15 trials. *Clin Cancer Res.* 2007 Dec 1;13(23):7059-66.

158. Paschka P, Schlenk RF, Gaidzik VI, Habdank M, Kronke J, Bullinger L, et al. IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication. *J Clin Oncol*. 2010 Aug 1;28(22):3636-43.
159. Ahn JY, Seo K, Weinberg O, Boyd SD, Arber DA. A comparison of two methods for screening CEBPA mutations in patients with acute myeloid leukemia. *J Mol Diagn*. 2009 Jul;11(4):319-23.
160. Lin LI, Lin TC, Chou WC, Tang JL, Lin DT, Tien HF. A novel fluorescence-based multiplex PCR assay for rapid simultaneous detection of CEBPA mutations and NPM mutations in patients with acute myeloid leukemias. *Leukemia*. 2006 Oct;20(10):1899-903.
161. Baer MR, George SL, Dodge RK, O'Loughlin KL, Minderman H, Caligiuri MA, et al. Phase 3 study of the multidrug resistance modulator PSC-833 in previously untreated patients 60 years of age and older with acute myeloid leukemia: Cancer and Leukemia Group B Study 9720. *Blood*. 2002 Aug 15;100(4):1224-32.
162. Burcu M, O'Loughlin KL, Ford LA, Baer MR. Amonafide L-malate is not a substrate for multidrug resistance proteins in secondary acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2008 Nov;22(11):2110-5.