



UNIVERSITÉ DE LILLE

École Gradué Biologie-Santé de Lille

THÈSE DE DOCTORAT

Présentée pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

Discipline : Hématologie

Par

Romane Joudinaud

**Étude de l'hétérogénéité des clones mutés *FLT3* dans la leucémie
aiguë myéloïde et implication dans la réponse au traitement**

Soutenue publiquement le 27 janvier 2025 devant le jury composé de :

Professeur Hélène Lapillonne

Présidente

Professeur Marion Eveillard

Rapporteur

Docteur Jean-Max Pasquet

Rapporteur

Professeur Claude Preudhomme

Directeur de thèse

Docteur Nicolas Duployez

Directeur de thèse

Toute science crée une nouvelle ignorance

Henri Michaux

REMERCIEMENTS

Je remercie les professeurs Marion Eveillard et Hélène Lapillonne, ainsi que le docteur Jean-Max Pasquet, de me faire l'honneur de participer à mon jury de thèse.

Je remercie mes directeurs de thèse pour leur prévenance et leur bienveillance qui m'ont permis d'effectuer ce doctorat dans d'excellentes conditions. Monsieur Preudhomme, je vous remercie pour la confiance que vous m'avez accordée depuis le début de mon internat et la qualité des projets que vous m'avez confiés. Nicolas, je te remercie pour ta gentillesse qui t'a conduit à ne jamais opposer de refus lorsque chaque jour (ou presque), je frappais à la porte de ton bureau et te demandais « Est-ce que je peux te poser une petite question ? ».

Je remercie les professeurs Olivier Kosmider et Claude-Alain Maurage pour les discussions enrichissantes que nous avons eues au cours de mes comités de suivi de thèse.

Je remercie le professeur Pierre-Yves Dumas pour sa générosité et sa rigueur.

J'adresse mes chaleureux remerciements à mes collègues, et en particulier ceux qui ont directement contribué à ce travail : Nathalie Helevaut, Sandrine Geffroy, Maxime Bucci, Laurène Fenwarth, Christophe Roumier, Pauline Peyrouze, Djohana Laurent, Meyling Cheok, Matthieu Duchmann, Raphaël Itzykson et Justine Pasanisi. Merci à mon binôme Augustin, ce travail n'aurait pu aboutir sans ton intelligence et ton implication remarquables.

J'adresse enfin quelques remerciements à mes proches :

À Romain, Romane, Louise et Vénitien : je me souviens de tous les moments passés ensemble et j'aime tout de vous

À mes grands-mères qui sont des modèles, toujours tournées vers la vie, l'avenir et leurs proches

À ma sœur, qui m'inspire car elle est honnête, singulière et sensible

À Camille H., merci d'évoluer à mes côtés depuis tant d'années

À Camille C., mon petit fiancé, vivre en ta compagnie est une fête

Je dédie cette thèse à Frédérique et Luc : j'ai conscience à chaque instant de la chance inouïe de vous avoir pour parents

AVANT-PROPOS

Ce travail de thèse de doctorat s'articule autour d'articles originaux publiés en premier auteur dans des revues scientifiques internationales à comité de lecture :

- Matthieu Duchmann*, **Romane Joudinaud***, Augustin Boudry, Justine Pasanisi, Giuseppe Di Feo, Rathana Kim, Maxime Bucci, et al. 2022. « Hematopoietic Differentiation at Single-Cell Resolution in NPM1-Mutated AML ». *Blood Cancer Journal* 12(9): 136. doi:10.1038/s41408-022-00734-1. (*equally contributors)
- **Romane Joudinaud***, Augustin Boudry*, Laurène Fenwarth, Sandrine Geffroy, Mikaël Salson, Hervé Dombret, Celine Berthon, et al. 2024. « Midostaurin shapes macroclonal and microclonal evolution of FLT3-mutated acute myeloid leukemia ». *Blood Advances*: bloodadvances.2024014672. doi:10.1182/bloodadvances.2024014672. (*equally contributors)

Une partie de l'introduction s'appuie également sur la publication d'une revue générale :

- **Romane Joudinaud**, Élise Fournier, et Augustin Boudry. 2023. « Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023 ». *Revue Francophone des Laboratoires* 2023(551): 52-63. doi:10.1016/S1773-035X(23)00084-9.

Certains des résultats présentés ont notamment fait l'objet de communications orales et affichées en congrès scientifiques nationaux et internationaux :

- **Congrès de l'ASH (American Society of Hematology), San Diego, USA, 2023 :**
 - « Clonal Dynamics of *FLT3*-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia Patients with Relapsed/Refractory Disease Following Intensive Chemotherapy +/- Midostaurin » (communication orale)

- **Congrès de la SFH (Société Française d'Hématologie), Paris, France, 2023 :**

- « Étude de la différenciation hématopoïétique à l'échelle unicellulaire dans les leucémies aiguës myéloïdes mutées *NPM1* » (communication orale)

- « Dynamique clonale des leucémies aiguës myéloïdes mutées *FLT3* en rechute et réfractaires (R/R) traitées par chimiothérapie intensive +/- inhibiteur de FLT3 » (poster avec présentation orale)

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES TABLEAUX	9
LISTE DES FIGURES	10
LISTE DES ABRÉVIATIONS	12
LISTE DES PRINCIPAUX CRITÈRES DE RÉPONSE ET DE SURVIE	15
CRITERES DE REPONSE	15
CRITERES DE SURVIE	16
INTRODUCTION	17
PARTIE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES ..	17
<i>Définition</i>	17
<i>Épidémiologie</i>	17
<i>Circonstances de découverte</i>	19
<i>Bilan initial et classification</i>	20
<i>Pronostic</i>	34
<i>Hétérogénéité génétique et fonctionnelle</i>	35
<i>Prise en charge thérapeutique</i>	42
PARTIE II : MUTATIONS DE FLT3	47
<i>Le récepteur FLT3</i>	47
<i>Pathologies impliquant des mutations de FLT3</i>	50
<i>Les différents types de mutations de FLT3</i>	50
<i>Physiopathologie des mutations de FLT3</i>	55
<i>Méthodes d'étude des mutations de FLT3</i>	56
<i>Pronostic des mutations de FLT3</i>	60
<i>Impact pronostique des caractéristiques initiales des mutations FLT3-ITD</i>	61
<i>Évolution des mutations de FLT3 à la progression après traitement intensif</i>	66
<i>Impact de la maladie résiduelle FLT3-ITD</i>	67
PARTIE III : INHIBITEURS DE FLT3	68
<i>Généralités sur les inhibiteurs de FLT3</i>	68
<i>La midostaurine</i>	70
<i>Le sorafénib</i>	70

<i>Le giltéritinib</i>	70
<i>Le quizartinib</i>	71
<i>Le crénolanib</i>	71
PARTIE IV : RÉSISTANCE AUX INHIBITEURS DE FLT3	72
<i>Résistance liée aux caractéristiques des mutations FLT3-ITD</i>	72
<i>Impact des co-mutations sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3</i>	73
<i>Impact de la maladie résiduelle FLT3-ITD sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3</i>	73
<i>Résistance liée à l'acquisition de mutations</i>	74
<i>Évolution des mutations FLT3-ITD sous inhibiteurs de FLT3</i>	77
<i>Autres mécanismes de résistance</i>	78
<i>Nouvelles associations permettant de contourner les mécanismes de résistance</i>	80
OBJECTIFS	82
RÉSULTATS	83
PREMIER ARTICLE : ÉTUDE DE LA DIFFERENCIATION HEMATOPOÏETIQUE A L'ECHELLE UNICELLULAIRE DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES MUTEES <i>NPM1</i>	83
<i>Résumé</i>	83
<i>Manuscript : Hematopoietic Differentiation at Single-Cell Resolution in NPM1-Mutated AML</i>	84
DEUXIEME ARTICLE : LA MIDOSTAURINE MODULE L'EVOLUTION DES MACROCLONES ET DES MICROCLONES DANS LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES MUTEES <i>FLT3</i>	109
<i>Résumé</i>	109
<i>Manuscript : Midostaurin shapes macroclonal and microclonal evolution of FLT3-mutated acute myeloid leukemia</i>	110
TRAVAUX NON PUBLIÉS	144
ÉTUDE DES CLONES <i>FLT3</i> -ITD HOMOZYGOTES PAR SEQUENÇAGE A HAUT DEBIT	144
MODELISATION DES MUTATIONS DE <i>FLT3</i> PAR APPROCHE CRISPR-Cas9.....	146
DISCUSSION	152
BIBLIOGRAPHIE	156
RÉSUMÉ	175
ABSTRACT	176

LISTE DES TABLEAUX

Les tableaux désignés sous la forme « RFL-Tableau X » sont inclus dans la revue de la littérature insérée dans l'introduction. Cette revue titrée « Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023 » a été publiée dans la Revue Francophone des Laboratoires (RFL).

Tableau 1 : Schémas thérapeutiques utilisés pour la prise en charge des LAM, adapté d'après les recommandations ELN 2022 (H. Döhner et al. 2022).....	45
Tableau 2 : Essais cliniques majeurs incluant des inhibiteurs de FLT3	69
Tableau 3 : Principales mutations impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de FLT3.....	76
Tableau 4 : Séquences des crRNA et des oligonucléotides donneurs	148
Tableau 5 : Cibles des anticorps utilisés pour l'étude des lignées cellulaires par cytométrie en flux	149

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Taux de nouveaux cas de leucémies aiguës myéloïdes et taux de décès liés aux leucémies aiguës myéloïdes entre 1992 et 2022 (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024).....	17
Figure 2 : Survie relative à 5 ans des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes entre 1975 et 2016 (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024)	18
Figure 3 : Survie globale des patients traités par chimiothérapie intensive selon le risque attribué par l'ELN 2022 (Lachowiez et al. 2023)	35
Figure 4 : Classes fonctionnelles des mutations <i>drivers</i> impliquées dans les leucémies aiguës myéloïdes, adapté d'après (H. Döhner, Weisdorf, et Bloomfield 2015)..	37
Figure 5 : Représentation schématique des différents types d'architecture leucémique	41
Figure 6 : Étude de l'identité génétique, fonctionnelle et multimodale par séquençage unicellulaire (Duchmann, Laplane, et Itzykson 2021)	42
Figure 7 : Structure du récepteur FLT3	47
Figure 8 : Représentation schématique des voies de transduction du signal recrutées en aval du récepteur FLT3, après fixation de son ligand (Derek L. Stirewalt et Radich 2003).....	49
Figure 9 : Représentation du site d'insertion, de la longueur et de la séquence d'une mutation FLT3-ITD	53
Figure 10 : Spectre des mutations de <i>FLT3</i> impliquées dans les leucémies aiguës myéloïdes	54
Figure 11 : Principe de la détection des mutations de <i>FLT3</i> par analyse de fragments (Murphy et al. 2003)	56
Figure 12 : Techniques d'enrichissement pour le séquençage à haut débit	59
Figure 13 : Méthode de dépistage des clones <i>FLT3</i> -ITD homozygotes par séquençage à haut débit	145

Figure 14 : Évolution des clones <i>FLT3</i> -ITD homozygotes entre le diagnostic et la rechute	145
Figure 15 : Étude de l'impact des mutations de <i>FLT3</i> sur l'immunophénotype.....	149
Figure 16 : Étude de la sensibilité à la midostaurine de différentes lignées leucémiques	150
Figure 17 : Représentation graphique de l'évolution des clones <i>FLT3</i> -ITD	155

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc : ADN complémentaire

AF : analyse de fragments

AMM : autorisation de mise sur le marché

AUC : aire sous la courbe

CBF : *core binding factor*

CIVD : coagulation intravasculaire disséminée

CMF : cytométrie en flux

CSH : cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

CTI : chimiothérapie intensive

ELN : *European LeukemiaNet*

FAB : *French American British*

FACS : *fluorescence-activated cell sorting*

FISH : hybridation fluorescente in situ

2HG : 2-hydroxyglutarate

HTS : séquençage à haut débit

ICC : *International Consensus Classification*

ICR : incidence cumulée de rechute

iFLT3 : inhibiteur de FLT3

ITD : duplication interne en tandem

ITD-JMD : duplication interne en tandem dont le site d'insertion est situé dans le domaine juxtamembranaire

ITD-TKD1 : duplication interne en tandem dont le site d'insertion est situé dans le domaine tyrosine kinase 1

JMD : domaine juxtamembranaire

LAIP : *leukemia-associated immunophenotype*

LAL : leucémie aiguë lymphoïde

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LMMC : leucémie myélomonocytaire chronique

LOH : perte d'hétérozygotie

MAPK : MAP kinase

MIDO : midostaurine

MLFS : *morphologic leukemia-free state*

MO : moelle osseuse

MRD : maladie résiduelle

Norm-VAF : VAF normalisée

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

Pb : paire de bases

RA : ratio allélique

RC : rémission complète

RCi : rémission complète avec récupération hématologique incomplète

RCp : rémission complète avec récupération plaquettaire incomplète

RFL : Revue Francophone des Laboratoires

RP : rémission partielle

R/R : en rechute ou réfractaire

SG : survie globale

SMD : syndrome myélodysplasique

SMP : syndrome myéloprolifératif

SNP-Array : *single nucleotide polymorphism-array*

SSE : survie sans évènement

SSR : survie sans rechute

TKD1 : domaine tyrosine kinase 1

TKD2 : domaine tyrosine kinase 2

TMD : domaine transmembranaire

UPD : disomie uniparentale acquise

VAF : fréquence allélique

LISTE DES PRINCIPAUX CRITÈRES DE RÉPONSE ET DE SURVIE

Critères de réponse

Rémission complète (RC) : Blastas médullaires < 5%, absence de blastas circulants ou de blastas avec des corps d'Auer, absence de maladie extramédullaire, PNN $\geq 1 \times 10^9/L$, plaquettes $\geq 100 \times 10^9/L$

Rémission complète avec récupération hématologique partielle (RCh) : PNN $\geq 0,5 \times 10^9/L$ et plaquettes $\geq 50 \times 10^9/L$, tous les autres critères de RC doivent être atteints

Rémission complète avec récupération hématologique incomplète (RCi) : Tous les critères de RC doivent être atteints excepté une neutropénie < $1 \times 10^9/L$ ou une thrombocytopénie < $100 \times 10^9/L$

Rémission complète avec récupération plaquettaire incomplète (RCp) : Tous les critères de RC doivent être atteints excepté une thrombocytopénie résiduelle < $100 \times 10^9/L$, sachant que les patients doivent être indépendants de la transfusion plaquettaire

Surtout pour les études de phase I/II :

Morphologic leukemia-free state (MLFS) : Blastas médullaires < 5%, absence de blastas circulants ou de blastas avec des corps d'Auer, absence de maladie extramédullaire, la récupération hématologique n'est pas requise

Rémission partielle (RP) : Tous les critères hématologiques de RC doivent être atteints, blastas médullaires compris entre 5% et 25%, diminution du pourcentage de blastas médullaires d'au moins 50% par rapport au début du traitement

Critères de survie

Survie globale (SG) : Survie mesurée à partir du jour de la randomisation dans l'étude clinique jusqu'à la date de décès quelle qu'en soit la cause

Survie sans évènement (SSE) : Survie mesurée à partir du jour de la randomisation dans l'étude clinique jusqu'à la date d'échec du traitement, de la rechute ou du décès quelle qu'en soit la cause

Survie sans rechute (SSR) : Définie uniquement pour les patients atteignant la RC, la RCh ou la RCi : survie mesurée à partir de la date où la rémission est atteinte jusqu'à la date de la rechute ou du décès quelle qu'en soit la cause

Incidence cumulée de rechute (ICR) : Définie uniquement pour les patients atteignant la RC, la RCh ou la RCi : survie mesurée à partir de la date où la rémission est atteinte jusqu'à la date de la rechute

INTRODUCTION

PARTIE I : GÉNÉRALITÉS SUR LES LEUCÉMIES AIGUËS MYÉLOÏDES

Définition

Les leucémies aiguës forment un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération de cellules immatures appelées « blastes ». On distingue deux types principaux de leucémies aiguës : les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies aiguës lymphoïdes (LAL). Les LAM se définissent par l'infiltration de la moelle osseuse (MO), du sang et potentiellement d'autres tissus par des cellules hématopoïétiques myéloïdes anormalement bloquées dans leur différenciation, à la différence des LAL qui impliquent des cellules lymphoïdes.

Épidémiologie

Les LAM représentent 1,0% des nouveaux cas de cancers et sont ainsi considérées comme un cancer rare (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024). Leur incidence n'a pas varié significativement entre 2012 et 2021 et se situe autour de 4,2 cas pour 100 000 personnes par an (Figure 1) (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024).

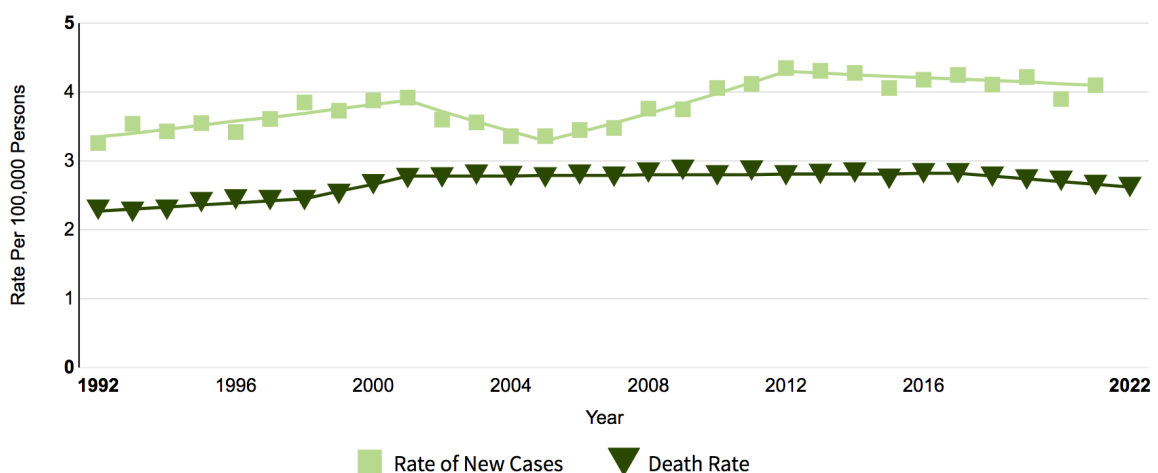


Figure 1 : Taux de nouveaux cas de leucémies aiguës myéloïdes et taux de décès liés aux leucémies aiguës myéloïdes entre 1992 et 2022 (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024)

Les LAM touchent préférentiellement les hommes : le *sex ratio* hommes/femmes est de 1,19 (Linnet et al. 2024). L'âge médian au diagnostic est de 69 ans (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024). La survie relative à 5 ans a augmenté de façon linéaire entre 1975 et 2016 (Figure 2) et s'élève désormais à 31,9% (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024).

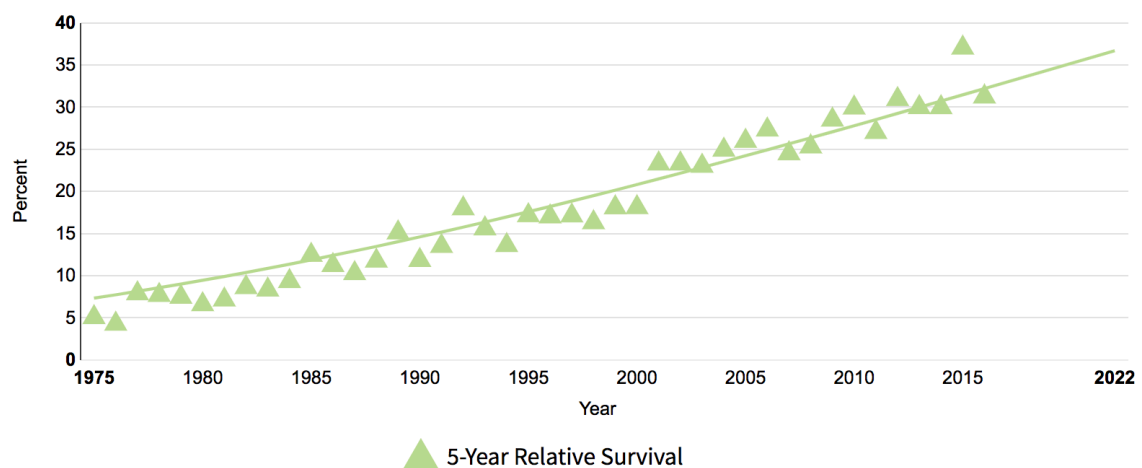


Figure 2 : Survie relative à 5 ans des patients atteints de leucémies aiguës myéloïdes entre 1975 et 2016 (Surveillance, Epidemiology, and End Results Program 2024)

Les études cliniques distinguent classiquement trois types de LAM : les LAM secondaires à une hémopathie maligne, les LAM secondaires à un traitement, et les LAM *de novo*, par opposition aux deux premières catégories. Au total, 16 à 24% des LAM sont secondaires à une autre hémopathie maligne, le plus souvent un syndrome myélodysplasique (SMD), parfois un syndrome myéloprolifératif (SMP) ou encore un SMD/SMP (Juliussen et al. 2009; Lachowiez et al. 2023). Les LAM secondaires à un SMD sont associées à des mutations et des anomalies cytogénétiques spécifiques (RFL-Tableau 1). Dix à quinze pour cent des LAM sont secondaires à un traitement (H. Döhner et al. 2022). L'incidence de ce type de LAM augmente en raison de l'évolution des chimiothérapies employées dans les tumeurs solides (Morton et al. 2019) et de la hausse du nombre de survivants de cancers (Voso, Falconi, et Fabiani 2021). Parmi les traitements en cause, on peut citer les agents alkylants, la radiothérapie, les inhibiteurs de topoisomérase II et les sels de platine (Morton et al. 2019; Voso, Falconi, et Fabiani 2021). Le traitement peut avoir un effet mutagène direct (Schwartz et al. 2021) ou alors sélectionner des clones chimio-résistants qui préexistaient à l'introduction du traitement (T. N. Wong et al. 2015).

Plusieurs facteurs prédisposant aux LAM ont été identifiés, notamment des mutations germinales et l'exposition à certains agents non thérapeutiques. Plus de 10% des patients atteints de LAM présentent une prédisposition germinale aux hémopathies, impliquant un éventail de gènes très large dont la liste est régulièrement actualisée (Yang et al. 2022). On distingue les mutations germinales associées à des syndromes affectant plusieurs organes (e.g trisomie 21, maladie de Fanconi), les mutations germinales associées à des anomalies plaquettaires constitutionnelles (e.g *RUNX1*, *ETV6*), et les mutations germinales qui ne sont pas associées à des syndromes ou des anomalies plaquettaires constitutionnelles (e.g *DDX41*, *CEBPA*) (Khoury et al. 2022). Parmi les agents non thérapeutiques associés au développement de LAM, on peut citer le tabac (Fircanis et al. 2014), le benzène (Linnet et al. 2019), les dioxines, les pesticides, le formaldéhyde, ou encore les radiations ionisantes (Shallis et al. 2021).

Circonstances de découverte

- Éléments cliniques

L'accumulation de blastes dans la MO conduit à une insuffisance médullaire d'apparition brutale. Ainsi, les signes cliniques peuvent inclure une fatigue, une pâleur et un essoufflement (en lien avec le syndrome anémique), une susceptibilité aux infections (en lien avec la neutropénie) et un syndrome hémorragique, en particulier cutanéomuqueux (en lien avec la thrombopénie et éventuellement une coagulation intravasculaire disséminée [CIVD] associée). L'accumulation de blastes dans d'autres organes peut se traduire par une splénomégalie, une hépatomégalie, des adénopathies, des douleurs osseuses, des atteintes cutanéomuqueuses, un syndrome de leucostase ou encore des atteintes neuroméningées.

- Éléments biologiques

L'apparition rapide de cytopénies inexplicables et d'une hyperleucocytose associée à la présence de blastes circulants doivent faire évoquer une LA. Par ailleurs, d'autres anomalies biologiques peuvent être observées en lien avec un syndrome de lyse tumoral ou une CIVD.

Bilan initial et classification

Deux classifications diagnostiques distinctes des LAM ont émergé en 2022 : la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) 2022 (Khoury et al. 2022) et l'*International Consensus Classification* (ICC) (Arber et al. 2022). Toutefois, les deux propositions se recoupent largement. Étant donné que la classification pronostique de référence (l'*European LeukemiaNet* [ELN] 2022) (H. Döhner et al. 2022) se réfère à la classification ICC, ce manuscrit s'appuie sur la classification ICC dans un souci de simplification.

Les examens biologiques à réaliser au diagnostic de LAM comprennent un examen cytologique du sang et de la MO, un immunophénotypage, un caryotype conventionnel (accompagné ou non d'une technique d'hybridation fluorescente in situ [FISH]) et une recherche des mutations récurrentes par biologie moléculaire (H. Döhner et al. 2022).

L'examen cytologique du sang et de la MO demeure indispensable pour établir le diagnostic de LAM. Tout d'abord, il permet de réaliser un décompte des blastes. La classification ICC distingue les LAM avec anomalie génétique récurrente, dont le diagnostic nécessite plus de 10% de blastes dans le sang ou la MO, et les autres LAM, dont le diagnostic nécessite plus de 20% de blastes dans le sang ou la MO (RFL-Tableau 1). Par ailleurs, une nouvelle catégorie nommée SMD/LAM a été créée et désigne les patients sans anomalie génétique récurrente présentant entre 10 et 19% de blastes dans le sang ou la MO (RFL-Tableau 1) (Arber et al. 2022). De plus, l'examen cytologique ainsi que les tests cytochimiques (e.g le test à la myéloperoxydase) permettent de mettre en évidence la nature myéloïde des blastes. Le système de classification *French American British* (FAB) est très utilisé par les cytologistes et se fonde sur des critères cytologiques et cytochimiques (Bennett et al. 1976, 1985).

L'immunophénotypage par cytométrie en flux (CMF) consiste en l'étude de marqueurs de surface et de marqueurs intracellulaires. Au diagnostic de LA, il convient d'étudier les marqueurs associés à la lignée myéloïde ainsi que les marqueurs associés aux lignées lymphoïdes B et T, afin de distinguer les LAM, les LAL et les LA bi-phénotypiques (H. Döhner et al. 2022). La mise en évidence d'une LAM repose sur l'évaluation de l'expression de plusieurs marqueurs car aucun marqueur n'est exprimé dans la totalité des LAM (H. Döhner et al. 2022). La CMF peut également mettre en

évidence des immunophénotypes aberrants spécifiques des clones leucémiques (*Leukemia-associated immunophenotypes* [LAIP]), qui constituent des marqueurs de suivi de la maladie résiduelle (MRD).

Il est indispensable de réaliser un caryotype conventionnel au diagnostic de LAM, afin de rechercher des anomalies chromosomiques numériques et structurales (H. Döhner et al. 2022). Cet examen permet de préciser le sous-type diagnostique de LAM (RFL-Tableau 1) et le pronostic associé (RFL-Tableau 2). Si le caryotype conventionnel échoue, la FISH peut être utilisée afin de rechercher des anomalies spécifiques telles que les translocations *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11*, les translocations impliquant *KMT2A* ou *MECOM*, et les anomalies associées aux SMD (perte des segments 5q, 7q ou 17p) (H. Döhner et al. 2022).

Les approches de biologie moléculaire permettent de rechercher un grand nombre d'altérations récurrentes ayant un impact diagnostique, pronostique et/ou thérapeutique dans la LAM (RFL-Tableau 3) (H. Döhner et al. 2022). La place actuelle des outils moléculaires dans la prise en charge des LAM est approfondie dans la revue « Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023 ». Cette revue est reproduite d'après *Romane Joudinaud, Élise Fournier et Augustin Boudry. Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023. Revue Francophone des Laboratoires 2023. 551 : 52-63. Copyright © 2023 Elsevier Masson SAS. Tous droits réservés.*

Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023

Romane Joudinaud^{a*}, Élise Fournier^b, Augustin Boudry^{b,c}

a Université de Lille, CNRS, Inserm, CHU de Lille, IRCL, UMR9020-UI277-Canther, F-59000 Lille, France

b Laboratoire d'hématologie, Centre de biologie-pathologie, 1 boulevard du Professeur-Jules-Leclercq, 59037 Lille cedex, France

c Université de Lille, CHU de Lille, ULR 2694 – Metrics, 1 place de Verdun, 59045 Lille, France

*Auteur correspondant.

Adresse e-mail : romane.joudinaud@chu-lille.fr (R. Joudinaud).



RÉSUMÉ

Les nouvelles classifications génétiques des leucémies aiguës myéloïdes parues en 2022 ont accru considérablement le nombre de marqueurs d'intérêt diagnostique, pronostique ou thérapeutique. Les outils biologiques permettant la recherche simultanée de ces altérations, tels que le séquençage à haut débit et la RT-MLPA, se révèlent ainsi précieux. Ces techniques offrent un débit important compatible avec la décision clinique. De surcroît, l'importance capitale de l'évolution de ces marqueurs génétiques pendant et après traitement a été démontrée. Si la PCR quantitative et la PCR digitale demeurent les techniques moléculaires les plus sensibles et les plus largement utilisées pour l'évaluation de la maladie résiduelle, la place et les performances du séquençage à haut débit, permettant en théorie le suivi de toutes les leucémies aiguës myéloïdes, sont encore à l'étude.

MOTS CLÉS

- ▶ amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation
- ▶ biologie moléculaire
- ▶ leucémie aiguë myéloïde
- ▶ PCR digitale
- ▶ séquençage à haut débit

KEYWORDS

- ▶ acute myeloid leukemia
- ▶ digital PCR
- ▶ high throughput sequencing
- ▶ molecular biology
- ▶ multiplex ligation-dependent probe amplification

ABSTRACT

The role of molecular tools in acute myeloid leukemia in 2023

New genetic classifications of acute myeloid leukemia published in 2022 have substantially increased the amount of markers of diagnostic, prognostic or therapeutic significance. Biological tools allowing for simultaneous assessment of these alterations, such as high-throughput sequencing and RT-multiplex ligation-dependent probe amplification, are thus proving to be highly valuable. These technologies provide a high flow rate suitable for clinical management. Moreover, crucial relevance of the course of these genetic markers both during and following treatment has been demonstrated. Although quantitative PCR and digital PCR remain the most sensitive and widely used molecular techniques for measurable residual disease monitoring, the position and performances of high-throughput sequencing, theoretically enabling the follow-up of all acute myeloid leukemias, are still under investigation.

© 2023 – Elsevier Masson SAS
Tous droits réservés.



Dossier scientifique

Les leucémies aiguës myéloïdes

Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) forment un groupe d'hémopathies malignes agressives phénotypiquement et génotypiquement hétérogènes [1], diagnostiquées à un âge médian de 68 ans [2]. Elles se définissent par l'infiltration de la moelle osseuse, du sang et potentiellement d'autres tissus par des cellules hématopoïétiques myéloïdes anormalement bloquées dans leur différenciation. Plus de 70 % des adultes âgés de moins de 60 ans parviennent à la rémission complète [3]. Cependant, une part importante de ces patients rechute : les taux de deuxième rémission complète sont alors beaucoup plus faibles. Ainsi, la survie à cinq ans demeure inférieure à 25 % [2]. Le diagnostic des LAM a longtemps reposé sur des critères morphologiques, cytochimiques et immunologiques [4,5]. Les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires ont été intégrées peu à peu dans les classifications utilisées en pratique clinique afin de diviser les LAM en catégories de pronostic distinct, en termes de survie globale et de risque de rechute [6-8]. La stratification pronostique est déterminante pour le recours à certaines options thérapeutiques. Ainsi, l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) est réservée aux patients ne présentant pas un pronostic favorable [9]. Les nouvelles classifications de l'Organisation mondiale de la santé (OMS), de l'International consensus classification (ICC) et de l'European LeukemiaNet (ELN) parues en 2022 ont accru considérablement le nombre de marqueurs génétiques d'intérêt diagnostique, pronostique ou thérapeutique dans la LAM [1,10,11] (**tableaux 1 et 2**). Les outils biologiques permettant de regrouper la recherche initiale des variations ponctuelles de l'ADN ou des transcrits de fusion de manière simultanée – respectivement le séquençage à haut débit (HTS) et l'amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation après rétrotranscription de l'ARN (RT-MLPA) – se révèlent ainsi précieux. Ces techniques offrent un débit important compatible avec la décision clinique [1]. De surcroît, l'importance capitale de l'évolution de ces marqueurs génétiques pendant et après traitement a été établie [12]. La PCR quantitative en temps réel (qPCR) demeure la technique de biologie moléculaire la plus utilisée pour l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD). La PCR digitale (ddPCR) offre des performances similaires et présente l'avantage d'une

Tableau 1. Classification ICC des LAM.

LAM avec anomalie génétique récurrente (plus de 10 % de blastes dans le sang/MO) ¹	LAM (si plus de 20 % de blastes dans le sang/MO) ou SMD/LAM (si 10 à 19 % de blastes dans le sang/MO)
LAP avec t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA ou autre translocation impliquant RARA	LAM avec mutation TP53 (si VAF supérieure ou égale à 10 %)
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1	LAM avec mutation d'un gène associé aux SMD : ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11	LAM avec des anomalies cytogénétiques associées aux SMD ³
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLL2::KMT2A ou autre translocation impliquant KMT2A	LAM sans autre particularité
LAM avec t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214	
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) ou autre translocation impliquant MECOM	
LAM avec d'autres translocations récurrentes rares ²	
LAM avec mutation NPM1	
LAM avec mutation CEBPA touchant le domaine bZIP sans décalage du cadre de lecture (monoallélique ou biallélique)	
LAM avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 ¹	

ICC : International consensus classification ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; LAP : leucémie aiguë promyélocytaire ; MO : moelle osseuse ; SMD : syndrome myélodysplasique ; VAF : fréquence allélique.

¹ Le seuil de blastes est fixé à 10% dans le sang ou la moelle osseuse, excepté concernant les LAM avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 pour lesquelles le seuil est fixé à 20 %, afin de tenir compte du chevauchement avec les formes accélérées de leucémie myéloïde chronique BCR::ABL1-positive.

² LAM avec d'autres translocations récurrentes rares : LAM avec t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1 ; LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTF1 ; LAM avec t(3;5)(q25.3;q35.1)/NPM1::MLF1 ; LAM avec t(5;11)(q35.2;p15.4)/NUP98::NSD1 ; LAM avec t(7;12)(q36.3;p13.2)/ETV6::MNX1 ; LAM avec t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6A::CREBBP ; LAM avec t(10;11)(p12.3;q14.2)/PICALM::MLL10 ; LAM avec t(11;12)(p15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A ; LAM avec NUP98 et d'autres partenaires ; LAM avec t(16;21)(p11.2;q22.2)/FUS::ERG ; LAM avec t(16;21)(q24.3;q22.1)/RUNX1::CBFA2T3 ; LAM avec inv(16)(p13.3q24.3)/CBFA2T3::GLIS2.

³ Anomalies suffisantes pour établir le diagnostic de LAM avec des anomalies cytogénétiques associées aux SMD :
 • caryotype complexe : au moins trois anomalies chromosomiques clonales indépendantes en l'absence d'anomalies génétiques récurrentes définissant une autre classe ;
 • anomalies clonales : del(5q)/t(5q)/add(5q) ; -7/del(7q) ; +8 ; del(12p)/t(12p)/add(12p) ; i(17q), -17/add(17p) ou del(17p) ; del(20q) ; et/ou idic(X)(q13).

D'après [11].

Tableau 2. Stratification pronostique des LAM en fonction des altérations génétiques identifiées au diagnostic, selon l'ELN 2022.

Catégorie de risque	Anomalie génétique
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> • t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1¹ • inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11¹ • Mutation de NPM1 sans mutation FLT3-ITD^{1,2} • LAM avec mutation CEBPA touchant le domaine bZIP sans décalage du cadre de lecture (monoallélique ou biallélique)
Intermédiaire	<ul style="list-style-type: none"> • Mutation FLT3-ITD avec mutation NPM1^{1,2} • Mutation FLT3-ITD sans mutation NPM1 • t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A¹ • Autre anomalie moléculaire ou cytogénétique non classée comme favorable ou défavorable
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> • t(6;9)(p23;q34.1)/DEK::NUP214 • t(v;11q23.3)/KMT2A-réarrangé³ • t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1 • t(8;16)(p11;p13)/KAT6A::CREBBP • inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM(EVI1) • t(3q26.2;v)/MECOM(EVI1)-réarrangé • -5 ou del(5q); -7; -17/abn(17p) • Caryotype complexe, caryotype monosomal⁴ • Mutation ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 ou ZRSR2⁵ • Mutation TP53 (si VAF supérieure ou égale à 10 %)

ELN : European LeukemiaNet ; **LAM** : leucémie aiguë myéloïde ; **VAF** : fréquence allélique.

¹ La catégorie de risque assignée initialement peut être modifiée au fil de la prise en charge en fonction des résultats des analyses de maladie résiduelle.

² Les LAM mutées NPM1 présentant des anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic sont catégorisées de mauvais pronostic.

³ Duplications partielles de KMT2A (PTD) exclues.

⁴ Caryotype complexe : au moins trois anomalies chromosomiques indépendantes en l'absence d'anomalies génétiques récurrentes définissant une autre classe ; excluant les caryotypes hyperdiploïdes avec au moins trois trisomies (ou polysomies) sans anomalies structurales.

Caryotype monosomal : présence d'au moins deux monosomies distinctes (excluant les pertes de X ou de Y), ou d'une seule monosomie autosomique combinée à au moins une anomalie chromosomique structurale (excluant les LAM à Core binding factor).

⁵ Ces marqueurs ne confèrent pas un pronostic défavorable s'ils sont associés à des anomalies de pronostic favorable.

D'après [1].

quantification absolue. Elle permet ainsi d'augmenter le nombre de marqueurs éligibles en se passant de plasmides de calibration. Le HTS, encore à l'étude dans l'évaluation de la MRD, permettrait le suivi simultané de plusieurs marqueurs. Le principe de ces technologies récentes, ainsi que leur positionnement envisageable en 2023, sont décrits ici.

Principes techniques

Séquençage à haut débit

Bien que les techniques conventionnelles, telles que le séquençage direct de Sanger (permettant la recherche de variations ponctuelles de l'ADN) ou l'analyse de fragments (permettant d'identifier des insertions ou délétions de nucléotides), soient encore employées dans de nombreux laboratoires, le séquençage à haut débit, ou séquençage de nouvelle génération (NGS), a représenté un véritable saut technologique et tend ainsi naturellement à les remplacer. Si ses premières applications ont surtout été axées sur le séquençage du génome entier dans le but d'identifier de nouvelles anomalies moléculaires, il s'est implanté au cours des dix dernières années dans la plupart des laboratoires hospitaliers avec essentiellement des approches de séquençage ciblé. Contrairement au séquençage standard de Sanger, le HTS permet la mutualisation des échantillons et des cibles d'intérêt (gènes, exons, hotspots, etc.) dans une analyse rapide unique entraînant *in fine* une diminution drastique du temps, du coût et du matériel biologique nécessaires à l'établissement d'un profil génomique complet.

Plusieurs technologies de HTS ont été développées présentant chacune certains avantages et certaines contraintes selon le type d'enrichissement des bibliothèques (capture ou PCR multiplex) et le type de lecture du séquenceur (variation de pH, détection de fluorescence) [13-15]. L'approche la plus utilisée demeure celle de la société Illumina® qui a progressivement monopolisé le marché mondial à l'aide d'une méthode brevetée fondée sur des terminateurs de chaîne réversibles fonctionnant en quatre grandes étapes (**figure 1**) :

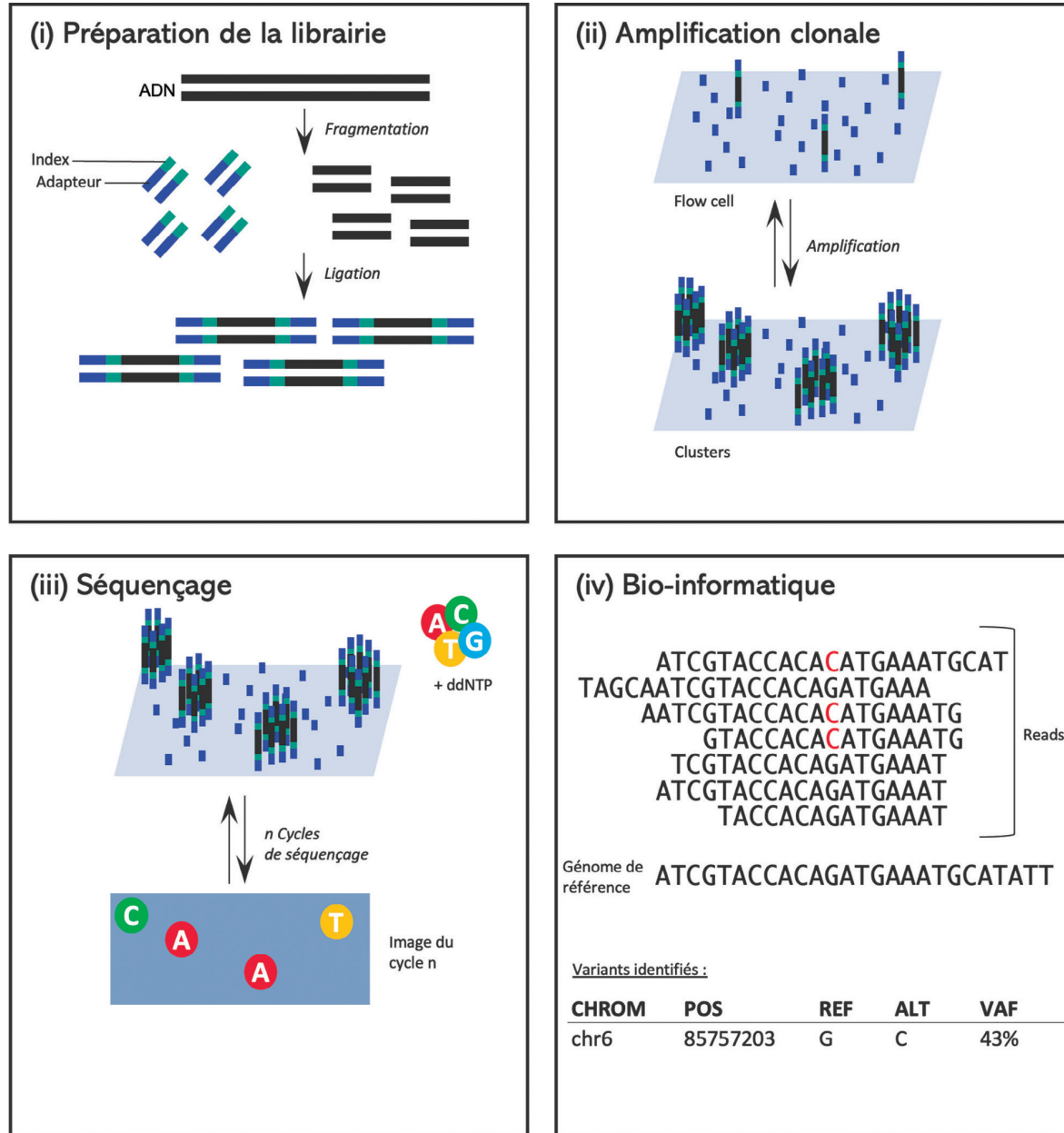
- la préparation de la bibliothèque, qui consiste à indexer les différents échantillons et à enrichir en régions d'intérêt ;
- l'amplification clonale des produits d'enrichissement sur une surface appelée *flow-cell* aboutissant à la formation de *clusters* ;
- le séquençage des *clusters*, fondé sur l'emploi de nucléotides terminateurs réversibles. Ce procédé permet la détection des bases au fur et à mesure de leur incorporation, grâce à une caméra haute précision générant des données brutes ;
- l'analyse bio-informatique des données brutes à l'aide d'un *pipeline* comprenant le traitement, le nettoyage, l'alignement au génome de référence et enfin l'identification (ou appel) des variants.



Dossier scientifique

Les leucémies aiguës myéloïdes

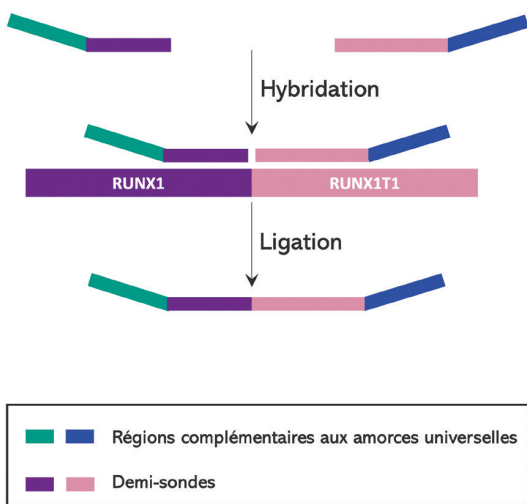
Figure 1. Procédure de séquençage à haut débit avec la technologie Illumina®.



© A. Beaudry

- (i) Après fragmentation de l'ADN génomique, des index (permettant l'identification de l'échantillon), ainsi que des adaptateurs, sont couplés aux extrémités des fragments par ligation.
 - (ii) Les fragments d'intérêt, préalablement sélectionnés, sont amplifiés individuellement sur une surface appelée *flow-cell* afin de former des *clusters*.
 - (iii) Le séquençage est réalisé grâce à la synthèse de brins complémentaires. À chaque cycle de séquençage, chaque brin d'ADN en formation incorpore un type de nucléotide terminateur réversible (A, T, C ou G) marqué par un fluorophore caractéristique du type de nucléotide. Les bases sont détectées au fur et à mesure de leur incorporation grâce à une caméra haute précision permettant de discerner la séquence de chaque cluster. En définitive, chaque fragment initial ayant donné naissance à un *cluster* est ainsi associé à une séquence appelée *read*.
 - (iv) Les *reads* sont alignés au génome de référence afin d'identifier les variants. La VAF d'un variant correspond à la proportion de *reads* variants parmi les *reads* totaux.
- ALT** : alternatif ; **CHROM** : chromosome ; **POS** : position ; **REF** : référence ; **VAF** : fréquence allélique.

Figure 2. Principe de la technologie RT-MLPA appliquée à l'identification des transcrits de fusion.



Les demi-sondes spécifiques, couplées à des séquences reconnues par des amorces de PCR universelles, sont ajoutées au milieu réactionnel contenant l'ADN complémentaire (isolé par rétrotranscription de l'ARN de l'échantillon). Les demi-sondes s'hybrident de façon adjacente sur les séquences *RUNX1* et *RUNX1T1*, de part et d'autre de la jonction aberrante du transcrite de fusion. Puis, la ligase est incorporée pour catalyser la formation de liaisons covalentes entre les demi-sondes hybridées. La sonde complète est par la suite amplifiée par PCR à l'aide des amorces universelles se fixant à ses deux extrémités.

Outre les ressources informatiques, le HTS nécessite l'intervention de personnel qualifié pour l'analyse et l'interprétation clinique des données. À l'heure actuelle, bien que de nombreuses institutions aient la capacité d'acheter des équipements de HTS, ces deux écueils cantonnent sa pratique à quelques centres.

Amplification multiplex de sondes dépendant d'une ligation

La MLPA est une technique de biologie moléculaire semi-quantitative communément employée dans le domaine de l'onco-hématologie depuis son développement en 2002 [21]. Elle possède un large champ d'application incluant la détermination du nombre de copies d'un gène ou partie d'un gène, l'identification de l'état de méthylation de l'ADN et la détection

de réarrangements chromosomiques. Elle peut permettre l'analyse de l'ADN ou de l'ARN après rétrotranscription (RT-MLPA).

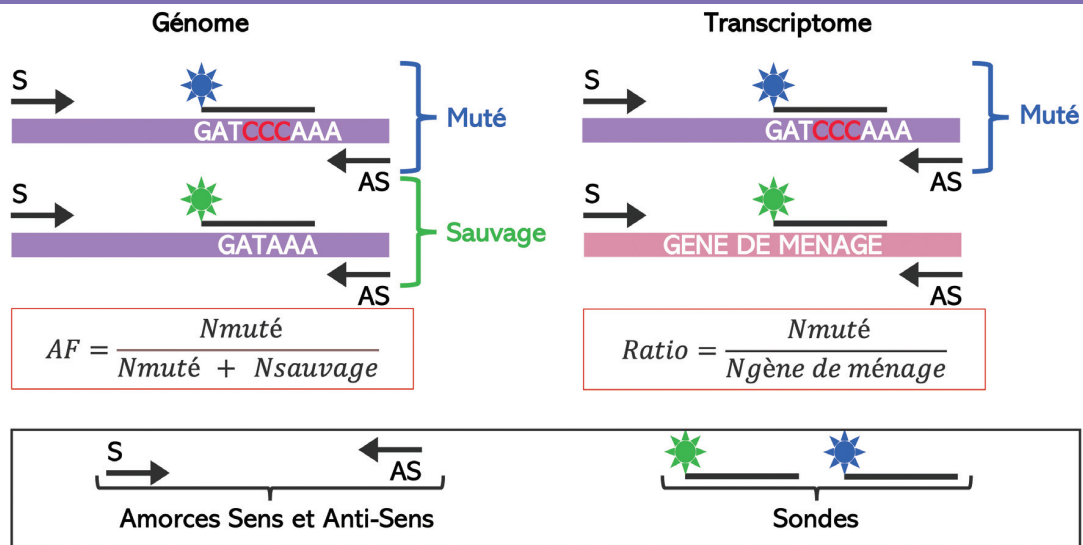
Son principe général repose sur la réalisation d'une PCR multiplex (permettant l'amplification de cibles diverses) à l'aide de demi-sondes spécifiques couplées à des séquences reconnues par des amorces de PCR universelles (figure 2). Dans un premier temps, ces demi-sondes sont ajoutées au milieu réactionnel contenant la matrice afin de permettre leur hybridation aux séquences cibles. Puis, une ligase est incorporée pour catalyser la formation de liaisons covalentes entre les demi-sondes hybridées de façon adjacente. Seules les sondes complètes sont par la suite amplifiées par PCR à l'aide des amorces universelles se fixant à leurs deux extrémités. L'identification des sondes complètes amplifiées peut être réalisée directement (par séquençage) ou indirectement, en analysant des marqueurs sondes-spécifiques (par exemple des marqueurs de taille). Les diverses cibles étant amplifiées à l'aide d'une paire unique d'amorces universelles, la MLPA contourne les problèmes inhérents à l'utilisation d'amorces multiples. Ainsi, elle permet d'étudier des centaines de séquences différentes de façon simultanée.

PCR digitale

La ddPCR est une méthode récente développée pour la quantification de séquences d'acides nucléiques. À l'instar de la qPCR, elle repose sur l'amplification d'une région cible contenant une séquence d'intérêt spécifiquement reconnue par une sonde d'hydrolyse (sonde TaqMan) (figure 3). Le signal résulte de la libération

À noter que si la plupart des laboratoires de biologie moléculaire français impliqués dans la prise en charge des hémopathies malignes proposent actuellement un séquençage ciblé confinant l'analyse à quelques régions de gènes ou gènes entiers, des plateformes dites de très haut débit réalisent le séquençage de l'exome entier (*whole exome sequencing*), explorant toutes les régions codantes, voire le séquençage du génome entier (*whole genome sequencing*) permettant d'appréhender à la fois les régions codantes et non codantes, ces dernières représentant plus de 98 % du génome [16]. Il existe actuellement deux plateformes de très haut débit déployées dans le cadre du plan France Médecine Génomique 2025 : SeqOIA (en Île-de-France) et AURAGEN (en Auvergne-Rhône-Alpes). Grâce à la bio-informatique mise en œuvre par un large éventail de langages de programmation, le domaine d'application du HTS a été élargi bien au-delà de la simple détection de substitutions et d'insertions/délétions. Les avancées dans ce champ permettent notamment la détection des duplications en tandem (par exemple *FLT3-ITD* [17]), difficiles à repérer de manière fiable avec les approches classiques, des anomalies du nombre de copies des gènes (CNV) [18] et des inversions/translocations [19]. Il devient ainsi envisageable à court terme de disposer de techniques de HTS permettant de connaître l'ensemble des caractéristiques génétiques nécessaires à la prise en charge des LAM en pratique clinique [20]. Néanmoins ces évolutions reposent, d'une part, sur l'acquisition de systèmes informatiques toujours plus sophistiqués permettant un traitement rapide ainsi qu'un stockage massif des données et, d'autre part, sur l'exploitation de ces systèmes par des bio-informaticiens.

Figure 3. Systèmes de PCR digitale.



© A. Boudry

La PCR digitale repose sur l'amplification d'une région cible contenant une séquence d'intérêt spécifiquement reconnue par une sonde d'hydrolyse (sonde TaqMan). À chaque cycle de PCR, les sondes hybridées à leur séquence complémentaire sont hydrolysées par la DNA polymérase et libèrent alors des molécules fluorescentes. Lorsque l'analyse est effectuée sur ADN, le résultat est volontiers exprimé en fréquence allélique à l'aide de deux sondes couplées à des fluorochromes distincts : l'une dirigée contre l'allèle muté et l'autre contre l'allèle sauvage. Lorsque l'analyse est effectuée sur ARN (par le biais d'une rétrotranscription), le résultat est volontiers exprimé en ratio à l'aide de deux sondes couplées à des fluorochromes distincts : l'une dirigée contre l'allèle muté et l'autre contre un gène de ménage.

S : Sens ; **AS** : Antisens ; **AF** : Fréquence allélique ; **N** : nombre de copies.

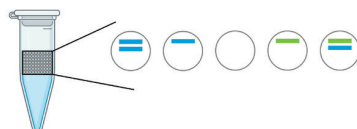
de molécules fluorescentes lors du clivage (par la DNA polymérase) des sondes hybridées à leur séquence complémentaire. La ddPCR provient de l'apport de trois modifications majeures à la technique de qPCR :

- ▶ réalisation de la réaction de PCR dans des milliers ou millions de compartiments ;
- ▶ mesure « binaire » ou « digitale » de la fluorescence en point final (1 = présence de signal fluorescent, 0 = absence de signal fluorescent) ;
- ▶ estimation du nombre de copies dans l'échantillon initial à l'aide de la loi de Poisson (**figure 4**).

Tout d'abord, le volume réactionnel total (matrice d'acides nucléiques et réactifs) est réparti dans un grand nombre de compartiments de très faible volume (de l'ordre du nanolitre). Les molécules d'ADN sont distribuées aléatoirement dans ces compartiments contenant en définitive aucune copie, une seule copie ou plusieurs copies d'ADN. La technique de partitionnement varie

Figure 4. Principe de la PCR digitale en émulsion.

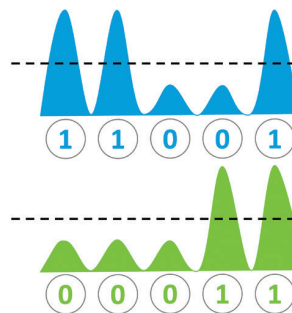
(i) Partitionnement



(ii) Amplification



(iii) Détection



Dans cet exemple, deux séquences différentes sont spécifiquement ciblées à l'aide de deux sondes couplées à des fluorochromes distincts (un bleu et un vert). L'allèle variant et l'allèle sauvage (ou un gène de référence) peuvent ainsi être quantifiés simultanément.

- (i) L'échantillon est réparti dans un grand nombre de gouttelettes aqueuses de très faible volume, en milieu huileux. Les molécules d'ADN sont distribuées aléatoirement dans les gouttelettes contenant en définitive aucune molécule, une seule molécule ou deux molécules d'ADN.
- (ii) Les réactions de PCR permettant d'amplifier les séquences cibles sont accomplies indépendamment dans les différents compartiments
- (iii) Les signaux fluorescents sont mesurés dans chaque gouttelette à l'issue des réactions de PCR (lecture en point final). Les fluorescences propres à chaque fluorochrome sont évaluées dans deux canaux d'émission distincts. Les gouttelettes émettant une fluorescence supérieure au seuil (trait pointillé noir) sont considérées comme positives (1) et les autres comme négatives (0). À partir de cette énumération de résultats positifs ou négatifs, la loi de Poisson permet d'évaluer le nombre de cibles initialement présentes dans l'échantillon.

© A. Boudry



selon les fabricants : la plus employée est la création de nano-gouttelettes aqueuses dans un milieu huileux (émulsion eau/huile, Biorad®). À la suite du partitionnement, les réactions de PCR sont réalisées indépendamment dans les différents compartiments qui constituent autant de nano-réacteurs distincts. Le partitionnement permet d'augmenter la proportion relative de l'anomalie d'intérêt dans les compartiments néoformés et de réduire l'impact des inhibiteurs ainsi que la compétition entre les cibles. Il facilite de ce fait la détection du signal et *in fine* la mise en évidence d'événements rares [22]. Par la suite, les gouttelettes sont alignées dans un fin capillaire et analysées individuellement en défilant successivement devant un détecteur (selon un mécanisme d'hydrofocalisation). La majorité des appareils actuellement disponibles permettent de mesurer la fluorescence dans deux canaux d'émission distincts et sont ainsi compatibles avec l'emploi de deux fluorochromes. Les gouttelettes émettant une fluorescence supérieure

au seuil sont considérées comme positives et les autres comme négatives. La technologie étant fondée sur l'énumération d'une série de résultats positifs (1) ou négatifs (0), elle a été qualifiée de « binaire » ou « digitale ». La quantification par ddPCR s'appuie sur la mesure de signaux de fluorescence en point final, tandis que la quantification par qPCR repose sur la mesure du signal fluorescent à la phase exponentielle d'amplification de la PCR. L'analyse du signal en point final diminue l'exigence d'efficacité portant sur la réaction de PCR [23]. La distribution aléatoire des cibles lors du partitionnement ainsi que l'indépendance des réactions de PCR permettent de modéliser la ddPCR à l'aide de la loi de Poisson. Le caractère aléatoire de la répartition des cibles signifie qu'une cible donnée a la même probabilité d'être intégrée dans chacun des compartiments lors du partitionnement. Il implique également que les molécules cibles se déplacent indépendamment les unes des autres et n'interagissent pas entre elles. L'application de la loi de Poisson à la ddPCR permet d'estimer le nombre de copies de la cible initialement présentes dans l'échantillon à partir du nombre de compartiments positifs mesurés [24]. Au total, la ddPCR permet une quantification absolue de la cible et dispense ainsi de la réalisation d'une courbe d'étalonnage.

Tableau 3. Panel de gènes à explorer par séquençage à haut débit au diagnostic de LAM, selon l'ELN 2022.

Gènes à séquencer au diagnostic	Délai souhaitable pour le rendu des résultats
<i>FLT3</i> ¹ , <i>IDH1</i> , <i>IDH2</i>	3 à 5 jours
<i>NPM1</i>	3 à 5 jours
<i>CEBPA</i> , <i>DDX41</i> , <i>TP53</i> , <i>ASXL1</i> , <i>BCOR</i> , <i>EZH2</i> , <i>RUNX1</i> , <i>SF3B1</i> , <i>SRSF2</i> , <i>STAG2</i> , <i>U2AF1</i> , <i>ZRSR2</i>	Premier cycle
Autres gènes recommandés au diagnostic ² : <i>ANKRD26</i> , <i>BCORL1</i> , <i>BRAF</i> , <i>CBL</i> , <i>CSF3R</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>ETV6</i> , <i>GATA2</i> , <i>JAK2</i> , <i>KIT</i> , <i>KRAS</i> , <i>NRAS</i> , <i>NF1</i> , <i>PHF6</i> , <i>PPM1D</i> , <i>PTPN11</i> , <i>RAD21</i> , <i>SETBP1</i> , <i>TET2</i> , <i>WT1</i>	

ELN : European LeukemiaNet ; **LAM** : leucémie aiguë myéloïde.

¹ Les altérations d'intérêt comprennent les mutations *FLT3*-TKD et *FLT3*-ITD. Les anomalies *FLT3*-ITD étant difficiles à repérer par séquençage à haut débit, il convient de les rechercher également par électrophorèse capillaire (analyse de fragments).

² Les résultats de ces gènes ne sont pas nécessaires pour établir le diagnostic ou pour identifier des cibles thérapeutiques exploitables, mais ils peuvent être utilisés pour le suivi ultérieur de la maladie par HTS (à l'exception des mutations compatibles avec une hématoïose clonale pré-leucémique), bien que le HTS soit encore à l'étude dans cette application.

D'après [1].

► Applications dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes

Exploration initiale

Précision sur les classifications des leucémies aiguës myéloïdes

Deux classifications diagnostiques distinctes des LAM ont émergé en 2022 : la classification OMS 2022 et l'ICC [10,11], les deux propositions se recoupant largement. Étant donné que la classification pronostique de référence (l'ELN 2022) se réfère à la classification ICC [1], cette revue s'appuie sur la classification ICC dans un souci de simplification.

Place du séquençage à haut débit dans l'exploration initiale

En pratique, le séquençage ciblé permet d'explorer un grand nombre d'altérations récurrentes ayant un impact diagnostique, pronostique et/ou thérapeutique dans la LAM [1] (**tableau 3**).

La classification ICC des LAM, établie en 2022, a accru le nombre d'entités diagnostiques moléculairement définies en regard de la classification OMS 2016 [8,11] (**tableau 1**). Les patients présentant une mutation touchant *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, ou *ZRSR2* sont désormais inclus dans le nouveau sous-type « LAM avec des mutations génétiques associées



Dossier scientifique

Les leucémies aiguës myéloïdes

aux syndromes myélodysplasiques (SMD) », indépendamment de l'histoire de la maladie [25-27]. De plus, la présence d'une mutation oncogénique de *TP53* à une fréquence allélique (VAF) supérieure ou égale à 10 % définit un nouveau sous-type de LAM (la VAF d'un variant correspond à la proportion de reads variants parmi les reads totaux). Le seuil de blastes permettant d'établir le diagnostic de LAM a été abaissé à 10 % en présence d'une mutation touchant *NPM1* ou *CEBPA*. Toutes les mutations incluses dans une entité diagnostique de l'ICC sont associées à un impact pronostique selon l'ELN 2022 [1] (**tableau 2**), alors que seules les mutations des gènes *NPM1*, *FLT3* (*FLT3-ITD*), *CEBPA* (bi-alléliques), *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53* étaient comprises dans la stratification pronostique précédente de l'ELN [28]. Les altérations *FLT3-ITD* confèrent désormais un risque intermédiaire indépendamment du ratio allélique de la mutation (**tableau 2**). Il est recommandé d'explorer les mutations de *NPM1* ainsi que certaines altérations pouvant faire l'objet de thérapies ciblées (*FLT3*, *IDH1*, *IDH2*) dans les cinq premiers jours suivant la découverte de la maladie [1] (**tableau 3**). En optimisant l'organisation du laboratoire, elles peuvent être recherchées par HTS sans retarder la décision thérapeutique. Néanmoins, d'autres technologies telles que le séquençage de Sanger, l'analyse de fragments ou la ddPCR permettent d'identifier aisément les cibles actionnables ainsi que les mutations de *NPM1* dans un délai de 48 heures. Par ailleurs, plus de 10 % des patients atteints de LAM présentent une prédisposition germinale aux hémopathies, impliquant un éventail de gènes très large dont la liste est régulièrement actualisée [29]. Les mutations du gène *DDX41* étant les plus fréquemment détectées, il est désormais préconisé de les explorer systématiquement à la découverte d'une LAM. Le criblage des autres gènes mis en cause dans les prédispositions germinales est recommandé en cas de forte suspicion clinique (âge jeune, antécédents personnels/familiaux d'hémopathie ou autres cancers) et peut être réalisé aisément par HTS [1]. Les laboratoires établissant le profil génétique des LAM par HTS peuvent également mettre en évidence des prédispositions de manière fortuite. Le caractère germinale d'une altération doit être soupçonné lorsqu'elle concerne un gène prédisposant aux hémopathies et que sa VAF est mesurée autour de 50 % (altération monoallélique) ou 100 % (altération biallélique). Si une mutation germinale est suspectée, il convient d'orienter le patient vers une consultation de conseil génétique afin d'établir le caractère somatique ou constitutionnel de l'altération et de réaliser une enquête familiale pour identifier d'autres porteurs. L'analyse et l'interprétation des résultats doivent être

réalisées par un praticien ayant obtenu un agrément de l'agence de la biomédecine. L'identification d'une prédisposition chez les apparentés revêt un intérêt majeur en hématologie en raison des possibles indications d'allogreffe de CSH intrafamiliale. De plus, les membres de la famille partageant le variant moléculaire impliqué peuvent faire l'objet d'une surveillance étroite.

Place de la RT-MLPA dans l'exploration initiale

Selon la classification ICC [11], le champ des réarrangements productifs définissant un sous-type diagnostique de LAM comprend les altérations suivantes : $t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA$, $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$, $inv(16)(p13.1q22)$ ou $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$, $t(9;11)(p21.3;q23.3)/MLLT3::KMT2A$, $t(6;9)(p22.3;q34.1)/DEK::NUP214$, et $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1$. Les autres translocations impliquant *RARA* ou *KMT2A* sont également incluses. Un nouveau sous-type diagnostique a été créé afin d'intégrer les variants plus rares à la classification (**tableau 1**). Le seuil de blastes permettant d'établir le diagnostic de LAM a été fixé à 10 % en présence d'une de ces altérations, excepté concernant le réarrangement $t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1$, afin de tenir compte du chevauchement avec les formes accélérées de leucémie myéloïde chronique *BCR::ABL1*-positive [11].

La RT-MLPA permet de cribler la multitude de partenaires impliqués dans ces réarrangements à faible coût. En pratique, elle peut être utilisée en complément de la cytogénétique afin de mettre en évidence des anomalies cryptiques méconnues par le caryotype conventionnel. La recherche des réarrangements par RT-MLPA comporte toutefois quelques limites : tout d'abord, les sondes incluses dans les panels diagnostiques de RT-MLPA sont conçues pour détecter les jonctions les plus classiques. Les transcrits de fusion résultant de points de cassure plus atypiques peuvent ainsi être méconnus, alors même que les partenaires engagés sont représentés au sein du panel (par exemple *KMT2A*, *NUP98*). Par ailleurs, certains transcrits faiblement exprimés ne peuvent pas être objectivés par RT-MLPA car la limite de détection de la technologie est d'environ 30 %. Enfin, les fusions non productives ne peuvent pas être détectées par RT-MLPA (par exemple *MECOM*). La recherche des réarrangements par technique FISH permet de pallier ces inconvénients mais nécessite un panel de sondes de plus en plus large. De manière générale, la recherche des gènes et transcrits de fusion par technique de biologie moléculaire présente l'avantage d'identifier la séquence de jonction spécifique et révèle ainsi un marqueur de suivi moléculaire de la leucémie.

La RT-MLPA permet de cribler la multitude de partenaires impliqués dans ces réarrangements

Tous les réarrangements récurrents précédemment évoqués sont associés à un impact pronostic [1] (**tableau 2**). Les altérations rares ne sont pas encore stratifiantes, à l'exception de l'anomalie t(8;16)(p11;p13)/KAT6A::CREBBP, de pronostic défavorable. La RT-MLPA pourrait contribuer à établir le pronostic des réarrangements rares en élargissant le champ des altérations explorées de façon systématique au diagnostic.

Suivi de la maladie résiduelle

La MRD correspond à la persistance de cellules cancéreuses après traitement, en quantité indétectable par les approches cytologiques. Les termes de « MRD positive » et « MRD négative » font référence à la détection, ou non, d'une MRD au-delà d'un seuil établi. Les seuils varient selon la technique utilisée et potentiellement selon le laboratoire réalisant l'analyse. Le suivi de la MRD peut permettre :

- de fournir une méthodologie quantitative pour établir un statut de rémission plus approfondie ;
- d'affiner l'évaluation du risque de rechute et de guider la prise en charge après la rémission ;
- d'identifier une rechute imminente pour permettre une intervention précoce ;

- de contrôler étroitement la réponse à de nouvelles thérapies pour accélérer leur développement [12].

La détection d'une MRD en rémission morphologique complète (à la suite d'une chimiothérapie standard) est un facteur de mauvais pronostic puissant, associé à une augmentation du risque de rechute et une diminution de la survie globale [30]. L'évolution de certains marqueurs génétiques sous traitement peut ainsi conduire à réévaluer le pronostic attribué initialement [1] (**tableau 2**). Par exemple, un patient porteur d'une mutation conférant un pronostic favorable telle que *NPM1* peut basculer dans la catégorie à risque intermédiaire si la MRD est positive après traitement [31].

Les techniques d'étude de la MRD comprennent la cytométrie en flux (CMF) multiparamétrique et certains outils de biologie moléculaire pouvant atteindre une limite de détection inférieure ou égale à 10^{-3} (qPCR, ddPCR et HTS) [12] (**tableau 4**). Le suivi de la MRD par qPCR ou par ddPCR est de rigueur pour les patients présentant une mutation de *NPM1* ou un transcrite de fusion parmi *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11*, totalisant moins de 50 % des cas [28]. Les patients ne possédant aucune de ces anomalies devraient être suivis au minimum par CMF [12] ou par mesure de l'expression de *WT1* [32]. L'évaluation de la MRD par CMF n'est pas discutée ici.

Tableau 4. Comparaison des techniques moléculaires d'évaluation de la maladie résiduelle dans les LAM, d'après l'ELN 2022.

Méthode	Applicabilité	Sensibilité	Cibles	Avantages	Inconvénients
qPCR	40-50 % des LAM < 60 ans (robuste) < 30 % des LAM > 60 ans (robuste)	10^{-4} à 10^{-6}	Robuste : <i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Moins établi : <i>KMT2A::MLL3</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i> , <i>WT1</i>	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible, rapide • Coût raisonnable • Facile à standardiser 	<ul style="list-style-type: none"> • Applicabilité limitée • Étalonnage nécessaire
ddPCR	~ 70 % des LAM	10^{-4} à 10^{-6}	Toute altération moléculaire pertinente (transcrit de fusion, hotspot mutationnel, mutation privée)	<ul style="list-style-type: none"> • Sensible, rapide • Coût raisonnable • Facile à standardiser • Pas d'étalonnage nécessaire 	<ul style="list-style-type: none"> • Encore peu utilisée (peu d'études) • Prise d'essai importante
HTS	~ 100 % des LAM	10^{-2} à 10^{-4}	Toute mutation somatique pertinente (non défini actuellement)	<ul style="list-style-type: none"> • Suivi simultané de plusieurs cibles • Détection de l'émergence de nouvelles mutations • Panel unique adapté à tous les patients 	<ul style="list-style-type: none"> • Long, coûteux • Ressources bio-informatiques importantes • Expertise nécessaire pour l'analyse et l'interprétation • Analyse non standardisée

ddPCR : PCR digitale ; ELN : European LeukemiaNet ; HTS : séquençage à haut débit ; LAM : leucémie aiguë myéloïde ; qPCR : PCR quantitative en temps réel. D'après [1].



Dossier scientifique

Les leucémies aiguës myéloïdes

Des travaux suggèrent que d'autres altérations génétiques pourraient être employées comme marqueurs de MRD (par exemple *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1* [1], *RUNX1* [33], *FLT3-ITD* [34]), leur place dans la prise en charge dépendant néanmoins de l'objectif visé (rémission profonde, éradication d'un clone ciblé par une chimiothérapie, détection précoce des rechutes). Elles doivent alors être sélectionnées avec attention parmi les anomalies mises en évidence au diagnostic. Tout d'abord, les mutations germinales doivent être exclues des analyses de MRD. De plus, les mutations retrouvées dans l'hématopoïèse clonale liée à l'âge (dont les plus fréquentes touchent les gènes *DNMT3A* et *TET2*) ne doivent pas être prises en compte. En effet, leur seule persistance en rémission complète reflète le retour à un état pré-leucémique et non une maladie active pouvant conduire à la rechute [35]. Enfin, les mutations touchant des gènes impliqués dans la signalisation (par exemple *FLT3*, *KIT* et *RAS*) constituent des marqueurs de MRD insatisfaisants en raison de leur caractère sous-clonal et de leur instabilité à la rechute. Elles peuvent cependant être exploitées pour évaluer la MRD, en combinaison avec d'autres altérations, car leur présence trahit une pathologie active [12].

Bien que la plupart des marqueurs moléculaires de MRD soient des mutations oncogéniques, la surexpression de certains gènes sauvages tels que *WT1* est également informative. Le suivi de l'expression de *WT1* présente deux avantages majeurs : il est applicable à plus de 80 % des patients et il est réalisable sur le sang [32]. Il demeure néanmoins controversé en raison de son manque de spécificité [12]. En effet, *WT1* étant physiologiquement exprimé par les progéniteurs hématopoïétiques, la MRD est considérée comme positive lorsque l'expression chez le patient est supérieure à l'expression basale des individus indemnes d'hémopathie [36]. La qPCR demeure l'outil moléculaire le plus reconnu pour l'évaluation de la MRD. Cependant, les exigences techniques associées à cette méthode limitent sa diversification, dont la nécessité d'un étalonnage. Ainsi, son utilisation est généralement restreinte au suivi de *NPM1* muté, de certains transcrits de fusion (*CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1*) et de l'expression de *WT1* pour lesquels il existe des plasmides commerciaux [12].

Au contraire, la technique de ddPCR permet une quantification de la cible en se dispensant de réaliser un étalonnage. Elle est en théorie applicable au suivi de toute altération génétique au laboratoire. En pratique, le nombre de copies de l'altération d'intérêt est normalisé grâce à la co-amplification de l'allèle sauvage

ou d'un gène de ménage (**figure 3**). Les sondes étant hautement spécifiques des altérations ciblées, le suivi d'une nouvelle anomalie moléculaire nécessite la conception de couples amorces/sondes personnalisés, pouvant constituer une étape limitante pour certaines altérations. Les couples sont ensuite expérimentés afin de définir les conditions techniques permettant d'optimiser l'analyse. Ces différentes étapes impliquent l'intervention de personnel qualifié et sont chronophages. Concernant les techniques de qPCR et de ddPCR, le choix de la matrice est variable selon la cible : il dépend du type d'altération génomique et de son niveau d'expression cellulaire. La matrice ARN peut être préférée pour plusieurs motifs. D'une part, elle offre une meilleure sensibilité pour certains oncogènes fortement exprimés (par exemple les mutations *NPM1*). D'autre part, elle permet une plus grande applicabilité (travail en séries), en particulier pour les gènes de fusion en s'affranchissant de l'hétérogénéité des points de cassure introniques.

Actuellement, le suivi de la MRD par HTS n'est pas recommandé en première intention lorsqu'il existe une autre technique moléculaire applicable. De surcroît, son intérêt pour guider la prise en charge n'a pas encore été évalué dans des études prospectives [12]. L'évaluation de la MRD par HTS est en théorie applicable à tout patient présentant au moins un marqueur moléculaire de MRD pertinent [12,35]. Le HTS permet de combiner l'étude de plusieurs marqueurs moléculaires en une seule technique, ce qui peut s'avérer très informatif. Par exemple, chez les patients *NPM1* mutés, la détection d'au moins une mutation additionnelle (hors DTA) en rémission moléculaire complète (selon *NPM1*) a été associée à une baisse de la survie globale [37]. De plus, chez les patients traités par thérapie ciblée (inhibiteurs de *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*), il est recommandé de combiner le suivi du marqueur cible et d'autres marqueurs moléculaires [12]. En effet, la pression de sélection exercée par la thérapie peut conduire à la disparition de la mutation cible [38]. Le suivi de la MRD par HTS demeure néanmoins peu développé en raison de difficultés techniques et bio-informatiques. Le principal défi actuel consiste à discerner les variants « vrais » présents *in vivo*, des variants « faux » artefactuels liés aux erreurs pouvant survenir à différentes étapes (préparation de la librairie, séquençage...). L'une des méthodes permettant de les distinguer repose sur l'indexation de chaque fragment d'ADN initial par un barcode unique appelé UMI (*Unique Molecular Identifier*), préalablement à l'amplification par PCR [39]. Le produit résultant de l'amplification d'un fragment initial peut alors être isolé en regroupant les fragments séquencés présentant le même UMI (famille de *reads* ou duplicats).

La qPCR demeure l'outil moléculaire le plus reconnu pour l'évaluation de la maladie résiduelle

En principe, les variants « vrais » sont identifiés chez tous les membres d'une famille de *reads*, tandis que les variants résultant d'erreurs de PCR/séquençage sont épars. Cette technologie permet d'une part de corriger les erreurs de PCR et de séquençage et d'autre part de fournir une quantification précise de chaque fragment d'ADN d'origine.

Exploration à la progression

En raison du développement des traitements de deuxième ligne et de l'avènement des thérapies ciblées parfois utilisées en première intention, il est judicieux de répéter les études moléculaires en situation de progression (échec d'induction ou rechute). Les échantillons peuvent être analysés par HTS afin de rechercher une modification de la composition clonale en regard du diagnostic, en particulier après exposition à des thérapies ciblant spécifiquement certains clones. La pression de sélection exercée par le traitement peut en effet conduire très rapidement à l'expansion de clones initialement minoritaires ou à l'émergence de clones porteurs de mutations de résistance pouvant constituer de nouvelles cibles thérapeutiques actionnables [40].

Conclusion

Actuellement cantonné au criblage d'altérations génomiques récurrentes, le rôle du HTS dans la prise en charge des LAM pourrait être diversifié : d'une part, en couplant la recherche des mutations ponctuelles à

l'étude des réarrangements (translocations/inversions) et des anomalies du nombre de copies des gènes (CNV), d'autre part, en permettant d'évaluer la MRD à l'aide d'un panel unique adapté à tous les patients, contrairement aux techniques de qPCR et de ddPCR qui ne permettent pas de cribler simultanément un grand nombre de marqueurs et d'apprécier la complexité clonale. Les avancées bio-informatiques devraient soutenir le développement de ces applications dans les années à venir. ■■

Déclaration de liens d'intérêts : les auteurs déclarent ne pas avoir de liens d'intérêts.

Points à retenir

- ▶ Les nouvelles recommandations internationales ont accru considérablement le nombre de marqueurs génétiques d'intérêt diagnostique, pronostique ou thérapeutique dans la leucémie aiguë myéloïde.
- ▶ Le séquençage à haut débit est la technique de choix pour mutualiser la recherche d'altérations génomiques de petite taille (substitution, insertion/délétion), au diagnostic et à la progression.
- ▶ La RT-MLPA permet de cribler la multitude de partenaires impliqués dans les translocations.
- ▶ La PCR quantitative et la PCR digitale sont les techniques moléculaires actuelles les plus sensibles et standardisables pour l'évaluation de la maladie résiduelle.

Références

[1] Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR et al. Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 ELN Recommendations from an International Expert Panel. *Blood*. 2022; blood.2022016867.

[2] Shallis RM, Wang R, Davidoff A et al. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*. 2019; 36: 70-87.

[3] Komanduri KV, Levine RL. Diagnosis and Therapy of Acute Myeloid Leukemia in the Era of Molecular Risk Stratification. *Annu Rev Med*. 2016; 67: 59-72.

[4] Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976; 33: 451-8.

[5] Bain BJ, Barnett D, Linch D et al. Revised guideline on immunophenotyping in acute leukaemias and chronic lymphoproliferative disorders. *Clinical & Laboratory Haematology* 2002; 24:1-13.

[6] Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 2002;100: 2292-302.

[7] Vardiman JW, Thiele J, Arber DA et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 2009;114: 937-51.

[8] Arber DA, Orazi A, Hasserjian R et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016;127: 2391-405.

[9] Dholaria B, Savani BN, Hamilton BK et al. Hematopoietic Cell Transplantation in the Treatment of Newly Diagnosed Adult Acute Myeloid Leukemia: An Evidence-Based Review from the American Society of Transplantation and Cellular Therapy. *Transplantation and Cellular Therapy*. 2021;27:6-20.

[10] Khoury JD, Solary E, Abla O et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. 2022;36:1703-19.

[11] Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Integrating Morphological, Clinical, and Genomic Data. *Blood* 2022; blood.2022015850.

[12] Heuser M, Freeman SD, Ossenkopp GJ et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 2021;138: 2753-767.

[13] Marceau-Renaut A, Renneville A, Nibourel O et al. Le séquençage de nouvelle génération (NGS) a-t-il déjà sa place dans nos laboratoires d'oncologie ? *Hématologie* 2013;19:112-122.

[14] Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM. Overview of Next-Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol*. 2018;122:e59.

[15] Metzker ML. Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet*. 2010;11:31-46.

[16] Lander ES, Linton LM, Birren B et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*. 2001;409:860-921.



Dossier scientifique

Les leucémies aiguës myéloïdes

- [17] Boudry A, Darmon S, Duployez N et al. Frugal alignment-free identification of FLT3-internal tandem duplications with FiLT3r. *BMC Bioinformatics*. 2022;23:448.
- [18] Gordeeva V, Sharova E, Babalyan K et al. Benchmarking germline CNV calling tools from exome sequencing data. *Sci Rep*. 2021;11:14416.
- [19] Cameron DL, Di Stefano L, Papenfuss AT. Comprehensive evaluation and characterisation of short read general-purpose structural variant calling software. *Nat Commun*. 2019;10:3240.
- [20] Duncavage EJ, Schroeder MC, O'Laughlin M et al. Genome Sequencing as an Alternative to Cytogenetic Analysis in Myeloid Cancers. *N Engl J Med*. 2021;384:924-35.
- [21] Schouten JP. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic Acids Research*. 2002;30:57e-557.
- [22] Coccaro N, Tota G, Anelli L et al. Digital PCR: A Reliable Tool for Analyzing and Monitoring Hematologic Malignancies. *Int J Mol Sci*. 2020;21:E3141.
- [23] Hindson CM, Chevillet JR, Briggs HA et al. Absolute quantification by droplet digital PCR versus analog real-time PCR. *Nat Methods*. 2013;10:1003-5.
- [24] Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 2018;18:1271.
- [25] Awada H, Durmaz A, Gurnari C et al. Machine learning integrates genomic signatures for subclassification beyond primary and secondary acute myeloid leukemia. *Blood*. 2021;138:1885-95.
- [26] Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374:2209-21.
- [27] Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015;125:1367-76.
- [28] Döhner H, Estey E, Grimwade D et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 2017;129:424-47.
- [29] Yang F, Long N, Anekpuritanang T et al. Identification and prioritization of myeloid malignancy germline variants in a large cohort of adult patients with AML. *Blood*. 2022;139: 1208-21.
- [30] Short NJ, Zhou S, Fu C et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 2020;6:1890-9.
- [31] Balsat M, Renneville A, Thomas X et al. Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group. *J Clin Oncol*. 2017;35:185-93.
- [32] Cilloni D, Renneville A, Hermitte F et al. Real-Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Detection of Minimal Residual Disease by Standardized WT1 Assay to Enhance Risk Stratification in Acute Myeloid Leukemia: A European LeukemiaNet Study. *JCO*. 2009;27:5195-201.
- [33] Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014;28:129-137.
- [34] Grob T, Sanders MA, Vonk CM et al. Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 2022;JCO2200715.
- [35] Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2018;378:1189-99.
- [36] Hosen N, Sonoda Y, Oji Y et al. Very low frequencies of human normal CD34+ haematopoietic progenitor cells express the Wilms' tumour gene WT1 at levels similar to those in leukaemia cells. *British Journal of Haematology*. 2002;116:409-20.
- [37] Cappelli LV, Meggendorfer M, Baer C et al. Indeterminate and oncogenic potential: CHIP vs CHOP mutations in AML with NPM1 alteration. *Leukemia*. 2022;36:394-402.
- [38] Schmalbrock LK, Dolnik A, Cocciardi S et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood*. 2021;137:3093-104.
- [39] Young AL, Wong TN, Hughes AEO et al. Quantifying ultra-rare pre-leukemic clones via targeted error-corrected sequencing. *Leukemia*. 2015;29:1608-11.
- [40] Vosberg S, Greif PA. Clonal evolution of acute myeloid leukemia from diagnosis to relapse. *Genes Chromosomes Cancer*. 2019;58:839-49.

Pronostic

On distingue classiquement les facteurs pronostiques relatifs au patient et les facteurs pronostiques relatifs à la maladie.

- Facteurs liés au patient

Les facteurs liés au patient incluent l'âge, l'indice de performance et le sexe. Les patients âgés et les patients avec un indice de performance altéré ont une mortalité précoce (dans les 30 jours suivant le diagnostic) augmentée (Juliusson et al. 2009). De plus, la survie à un an est inférieure à 50% chez les patients âgés de 60 à 74 ans, inférieure à 30% chez les patients âgés de 75 à 84 ans et inférieure à 20% chez les patients âgés de plus de 85 ans (Linnet et al. 2024). Les LAM du sujet âgé ont la particularité d'être enrichies en maladies (i) secondaires à d'autres hémopathies myéloïdes (ii) secondaires à des traitements (iii) de mauvais pronostic cytogénétique et/ou moléculaire (Sargas et al. 2023). La survie relative à 5 ans est plus élevée chez les femmes (34,9%) que chez les hommes (29,4%) (Linnet et al. 2024).

- Facteurs liés à la maladie

La stratification du risque des LAM repose majoritairement sur l'identification d'anomalies génétiques (cytogénétiques et moléculaires). Dans un modèle multivarié explorant la contribution relative des variables génétiques, cliniques, démographiques et liées au traitement, la survie globale (SG) des patients était principalement déterminée par les caractéristiques génétiques (Papaemmanuil et al. 2016).

La dernière classification pronostique de référence (ELN 2022) (H. Döhner et al. 2022) distingue trois catégories de risque en fonction des anomalies cytogénétiques et moléculaires : favorable, intermédiaire et défavorable, englobant respectivement 27,8%, 20,3% et 51,8% des patients (Sargas et al. 2023) (RFL-Tableau 2). Ces trois catégories de risque confèrent un pronostic distinct, en termes de réponse au traitement et de SG (Lachowiez et al. 2023; Sargas et al. 2023) (Figure 3). Il est important de noter que cette classification stratifie correctement les patients nouvellement diagnostiqués traités par chimiothérapie intensive (CTI), et non les patients recevant des thérapies non intensives (Lachowiez et al. 2023; Sargas et al. 2023), ni ceux en rechute ou réfractaires (R/R), pour lesquels le pronostic est réservé de façon générale.

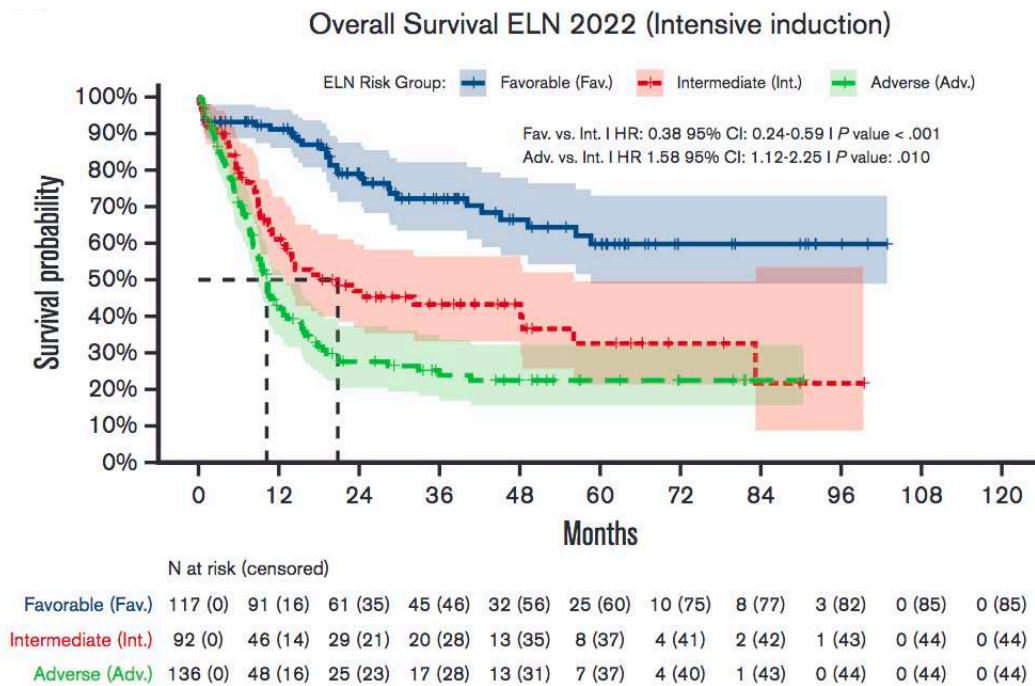


Figure 3 : Survie globale des patients traités par chimiothérapie intensive selon le risque attribué par l'ELN 2022 (Lachowicz et al. 2023)

Par ailleurs, la MRD constitue un facteur pronostique post-thérapeutique indépendant (cf RFL : « Suivi de la maladie résiduelle »).

Hétérogénéité génétique et fonctionnelle

L'hétérogénéité des LAM comprend deux aspects : l'hétérogénéité inter-leucémique et l'hétérogénéité intra-leucémique. L'hétérogénéité inter-leucémique désigne la diversité des LAM présentées par des patients différents. L'hétérogénéité intra-leucémique désigne la coexistence de plusieurs clones leucémiques chez un même patient. Dans ce contexte, le terme « clone » qualifie un groupe de cellules partageant des traits identiques hérités d'un ancêtre commun.

- Hétérogénéité génétique

L'analyse du génome entier de prélèvements de LAM retrouve en moyenne plus de 400 mutations par patient (Welch et al. 2012). Plusieurs données suggèrent que la plupart de ces mutations sont des événements aléatoires sans impact fonctionnel (mutations *passengers*), liées au vieillissement des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des progéniteurs multipotents (Mitchell et al. 2022; Welch et al. 2012). De rares mutations appelées *drivers* confèrent un avantage sélectif aux cellules leucémiques (e.g en termes de survie, de prolifération, d'auto-renouvellement,

d'échappement immunitaire). L'étude de l'hétérogénéité génétique se cantonne généralement à l'analyse de ces mutations *drivers*. Chaque patient présente un faible nombre de mutations *drivers* (le plus souvent compris entre 2 et 4) et ces lésions sont très variables d'un individu à l'autre (Kihara et al. 2014; Metzeler et al. 2016; Papaemmanuil et al. 2016). L'impact diagnostique et pronostique des différentes mutations *drivers* est indiqué dans le RFL-Tableau 1 et le RFL-Tableau 2.

Les mutations *drivers* identifiées dans les LAM peuvent être regroupées en 8 classes fonctionnelles (Lars Bullinger, Döhner, et Döhner 2017; H. Döhner, Weisdorf, et Bloomfield 2015), d'après les données du *Cancer Genome Atlas* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013) (Figure 4).

- Mutations touchant des voies de signalisation (*KIT*, *FLT3*, *PTPN11*, *KRAS*, *NRAS*)

Elles impactent des récepteurs à activité tyrosine kinase tels que KIT et FLT3 ou des protéines intracellulaires telles que PTPN11, KRAS et NRAS. Elles entraînent un gain de fonction de ces protéines de signalisation et confèrent ainsi un avantage prolifératif via l'activation des voies RAS/RAF, JAK/STAT, et PI3K/AKT.

- Mutations touchant des gènes suppresseurs de tumeur (*TP53*, *WT1*, *PHF6*)

La protéine p53 joue un rôle majeur dans le maintien de la stabilité du génome. Les mutations de *TP53* conduisent à une perte de fonction de la protéine p53. Il s'agit généralement de mutations de type faux-sens localisées au niveau du domaine de liaison à l'ADN et qui empêchent la transcription des gènes cibles (Grob, Al Hinai, et al. 2022). La majorité des mutations de *WT1* conduisent à une perte de fonction du facteur de transcription WT1 mais les mécanismes de leucémogénèse associés à ces lésions demeurent mal connus (Rampal et Figueroa 2016).

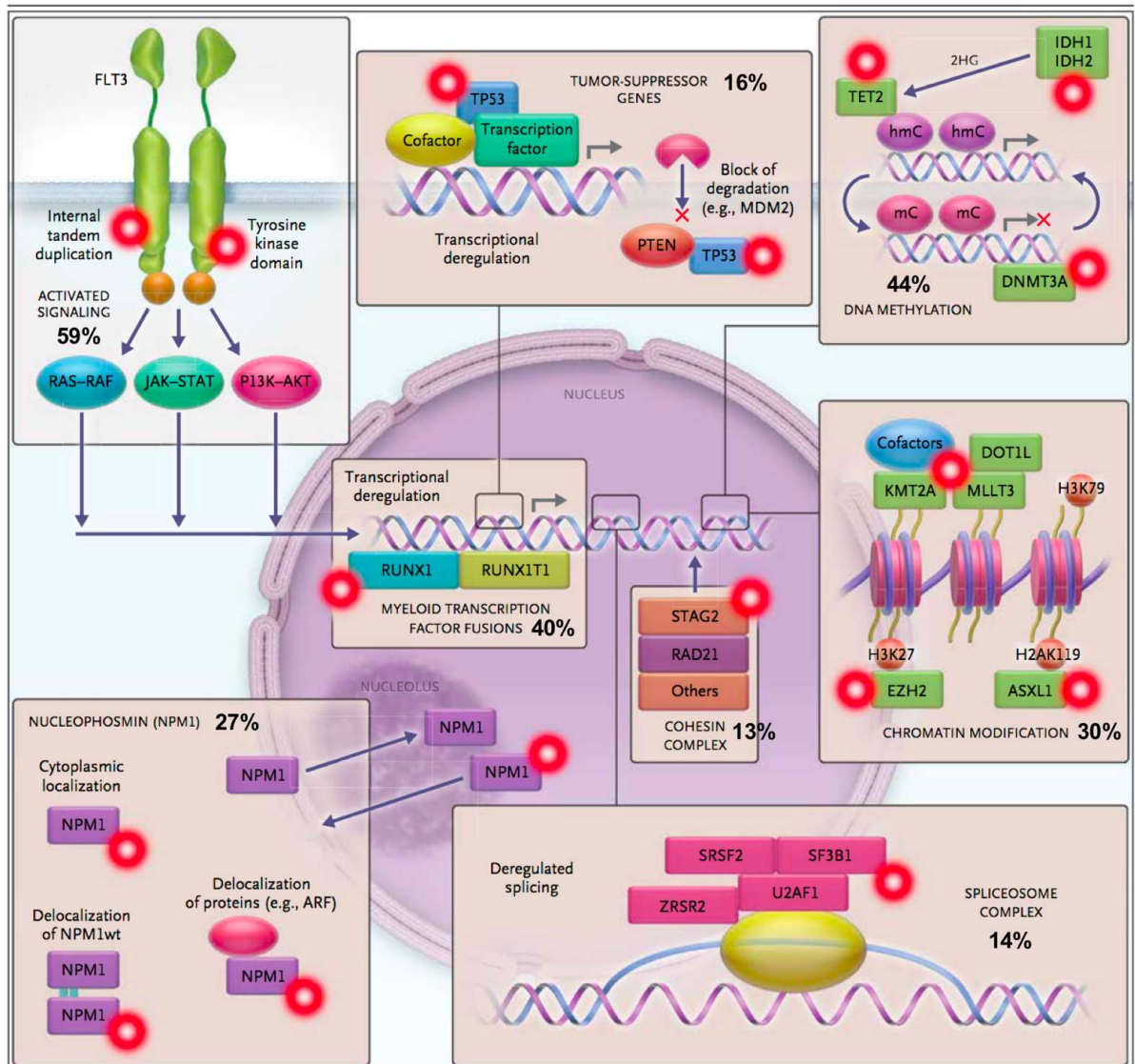


Figure 4 : Classes fonctionnelles des mutations *drivers* impliquées dans les leucémies aiguës myéloïdes, adapté d'après (H. Döhner, Weisdorf, et Bloomfield 2015)

Les prévalences proviennent du *Cancer Genome Atlas Research Network* (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). 2HG : 2-hydroxyglutarate, hmC : 5-hydroxyméthylcytosine, mC : 5-méthylcytosine.

- Mutations impactant la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* et *IDH2*)

La protéine DNMT3A (pour DNA méthyl-transférase) catalyse la formation de 5-méthylcytosine, par l'addition d'un groupe méthyl au niveau d'un résidu cytosine. Les mutations de *DNMT3A* induisent une perte de l'activité enzymatique par effet dominant négatif et un blocage de la différenciation des CSH (Challen et al. 2012; Ley et al. 2010). La protéine TET2 est une hydroxylase qui catalyse la formation de 5-

hydroxyméthylcytosine à partir de 5-méthylcytosine et conduit ainsi à la déméthylation de l'ADN. Les mutations de *TET2* ont pour conséquence la perte de la forme fonctionnelle de la protéine TET2, induisant une hausse de l'auto-renouvellement des CSH (Z. Li et al. 2011). L'enzyme cytosolique IDH1 et l'enzyme mitochondriale IDH2 sont impliquées dans le cycle de Krebs : elles catalysent la transformation de l'isocitrate en α -cétoglutarate. Les mutations touchant *IDH1* et *IDH2* conduisent à la production d'un oncométabolite, nommé 2-hydroxyglutarate (2HG), responsable de l'inhibition de TET2 (Figueroa et al. 2010).

- Mutations de facteurs de transcription myéloïdes : fusions *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11*, mutations de *RUNX1* et *CEBPA*

Le *core binding factor* (CBF) est un complexe hétérodimérique régulant l'hématopoïèse et la différenciation. Il est composé d'une sous-unité alpha se liant à l'ADN (impliquant *RUNX1*, *RUNX2* ou *RUNX3*) et d'une sous-unité beta stabilisant le complexe et son interaction avec l'ADN (impliquant *CBFB*). Les fusions *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11* induisent un blocage de différenciation et une hausse de l'auto-renouvellement (Kuo et al. 2006; Mulloy et al. 2002). Les mutations des gènes *RUNX1* et *CEBPA* impactent également la différenciation myéloïde (Gombart et al. 2002; Sood, Kamikubo, et Liu 2017).

- Mutations touchant le complexe de la cohésine (*STAG2*, *RAD21*, *SMC3*, *SMC1A*)

Le complexe de la cohésine est constitué de différentes sous-unités encodées par les gènes *STAG1/2*, *RAD21*, *SMC3* et *SMC1A*. Il assure la cohésion des chromatides sœurs durant la phase S et est impliqué dans la réparation de l'ADN ainsi que la régulation de la transcription. Les mutations survenant dans les gènes du complexe de la cohésine altèrent la différenciation hématopoïétique (Mazumdar et al. 2015).

- Mutations impactant les modifications de la chromatine (*ASXL1*, *EZH2*, fusions *KMT2A*)

Les modifications des histones jouent un rôle critique dans la régulation de l'expression génique responsable du développement hématopoïétique. *EZH2* est une histone méthyltransférase catalysant la triméthylation de H3K27. Elle appartient au

complexe PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) qui est un régulateur négatif de la transcription. Des mutations entraînant un gain ou une perte de la fonction d'EZH2 sont toutes deux impliquées dans les hémopathies myéloïdes (Lund, Adams, et Copland 2014). La protéine ASXL1 active BAP1, une enzyme catalysant la déubiquitination de l'histone H2A (Sahtoe et al. 2016). Les mutations d'ASXL1 sont généralement des mutations gain de fonction (Balasubramani et al. 2015) qui conduisent à un blocage de la différenciation myéloïde (Asada et al. 2018). Le gène *KMT2A* code pour une histone méthyltransférase agissant sur H3K4. Les réarrangements et les duplications partielles en tandem de *KMT2A* conduisent à une expression constitutive de HOXA9 via le recrutement aberrant de l'histone méthyltransférase DOT1L agissant sur H3K79 (Bernt et al. 2011; Kühn et al. 2015). Les lésions de *KMT2A* confèrent des propriétés d'auto-renouvellement aux cellules souches leucémiques (CSL) (P. Wong et al. 2007).

➤ Mutations de *NPM1*

Le gène *NPM1* code pour la nucléophosmine, une protéine localisée majoritairement dans le nucléole, pouvant toutefois se déplacer entre le noyau et le cytoplasme. La nucléophosmine est une protéine chaperonne impliquée dans de multiples processus incluant la duplication des centrosomes, la biogénèse des ribosomes, la réparation de l'ADN et la réponse au stress cellulaire (Falini et al. 2020). La majorité des mutations de *NPM1* sont des insertions de 4 paires de bases (pb) induisant un décalage du cadre de lecture et la création d'un nouveau signal d'export nucléaire. Ces modifications ont pour conséquence une délocalisation cytoplasmique de la protéine NPM1 (Falini et al. 2005). Les mutations de *NPM1* induisent un blocage de la différenciation via l'augmentation de l'expression des gènes HOX (Brunetti et al. 2018).

➤ Mutations touchant le complexe du splicéosome (*SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*)

Le splicéosome est un large complexe formé de protéines et d'ARNs catalysant l'élimination des introns contenus dans les ARN pré-messagers. Les mécanismes de leucémogénèse associés aux mutations touchant les gènes du splicéosome sont hétérogènes et encore peu décrits.

L'hétérogénéité génétique intra-leucémique peut être évaluée par la mesure du nombre de clones distincts (diversité alpha), chaque clone étant défini par une combinaison spécifique de mutations (Duchmann, Laplane, et Itzykson 2021). Le séquençage du *bulk* leucémique (la population leucémique totale) permet d'approximer le nombre de clones en regroupant les mutations présentant des fréquences alléliques (VAFs) similaires dans un même clone (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013; Ding et al. 2012). Il a permis de déterminer que la majorité des LAM sont constituées de plusieurs clones distincts (Cancer Genome Atlas Research Network et al. 2013). Par ailleurs, il a permis de distinguer les mutations *drivers* clonales ayant un rôle initiateur dans les LAM (e.g mutations touchant des régulateurs épigénétiques) et les mutations *drivers* secondaires sous-clonales (e.g mutations touchant des gènes de signalisation), qui sont respectivement associées à des VAFs élevées et faibles (Metzeler et al. 2016). Toutefois, seul le séquençage unicellulaire permet d'établir la phylogénie clonale et de déterminer précisément le nombre de clones (Figure 5) (Morita et al. 2020). Il a révélé que l'architecture leucémique était linéaire dans la moitié des cas, et branchée dans l'autre moitié des cas (Figure 5) (Morita et al. 2020). Dans le modèle linéaire, le clone ancestral accumule des mutations les unes après les autres, chaque nouvelle mutation lui conférant un avantage sélectif. Toutefois, l'expansion du clone le plus tardif ne conduit pas nécessairement à l'extinction des clones antérieurs. Le modèle linéaire peut ainsi s'accompagner d'hétérogénéité génétique en lien avec la cohabitation des différents clones. Dans le modèle branché, un clone ancestral donne naissance à plusieurs populations présentant des mutations différentes, ce qui génère davantage de diversité génétique (Morita et al. 2020). Certaines mutations *drivers* sont fréquemment co-occurentes à l'échelle cellulaire, indiquant une probable collaboration, tandis que d'autres sont fréquemment exclusives à l'échelle cellulaire, indiquant une probable redondance fonctionnelle (Morita et al. 2020).

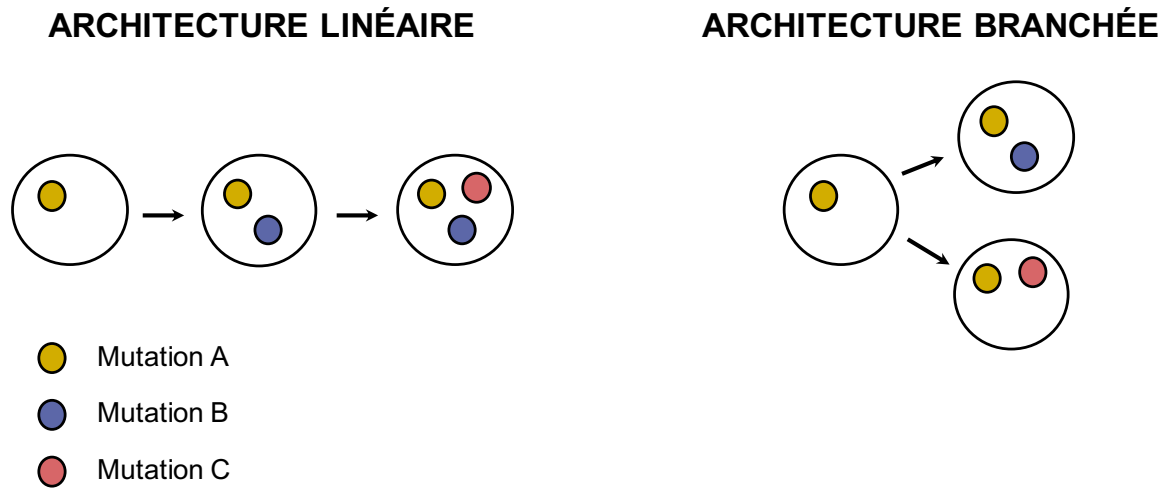


Figure 5 : Représentation schématique des différents types d'architecture leucémique

- Hétérogénéité fonctionnelle

Il existe également une hétérogénéité inter-leucémique et intra-leucémique fonctionnelle, concernant les programmes transcriptionnels, les réseaux de signalisation, l'expression des protéines de surface, la sensibilité aux drogues, ou encore la capacité de prise de greffe.

Les programmes transcriptionnels ainsi que les réseaux de signalisation activés varient considérablement d'un patient à l'autre et sont associés à certaines mutations *drivers* de la leucémogénèse (Assi et al. 2019; Tyner et al. 2018). L'hétérogénéité transcriptionnelle est très importante au niveau intra-leucémique également : des cellules malignes présentant un programme transcriptionnel similaire aux CSH peuvent cohabiter avec des cellules malignes présentant un programme analogue aux cellules différenciées (van Galen et al. 2019) (Figure 6).

L'étude du *bulk* leucémique a révélé certaines associations entre l'immunophénotype et le génotype des patients, par exemple l'absence d'expression de CD34 chez les patients mutés *NPM1* (Falini et al. 2005). De plus, les différents clones génétiques identifiés chez un même patient peuvent présenter des immunophénotypes distincts et spécifiques (de Boer et al. 2018; Morita et al. 2020).

Le profil de sensibilité aux chimiothérapies conventionnelles et aux thérapies ciblées est variable selon les patients (Dal Bello et al. 2022; Malani et al. 2022) et cette hétérogénéité est sous-tendue par des caractéristiques génétiques et transcriptionnelles (Malani et al. 2022; Tyner et al. 2018; Zeng et al. 2022).

La probabilité de succès de la xénotransplantation est également hétérogène et elle a été corrélée au profil mutationnel des patients (Kawashima et al. 2022). Par exemple, elle est plus élevée chez les patients présentant un pronostic altéré selon la classification ELN 2022 (Kawashima et al. 2022). En outre, les clones génétiques présents chez un même patient peuvent être amplifiés de manière différente après xénotransplantation (Kawashima et al. 2022).

Au total, les identités génétiques et fonctionnelles sont inter-corrélées de façon complexe. L'étude du *bulk* leucémique n'est pas optimale pour analyser ces corrélations car l'hétérogénéité intra-leucémique peut masquer des associations importantes. Le séquençage unicellulaire multi-omique s'avère très utile car il permet de corréler plusieurs identités à l'échelle unicellulaire (van Galen et al. 2019; Morita et al. 2020) (Figure 6).

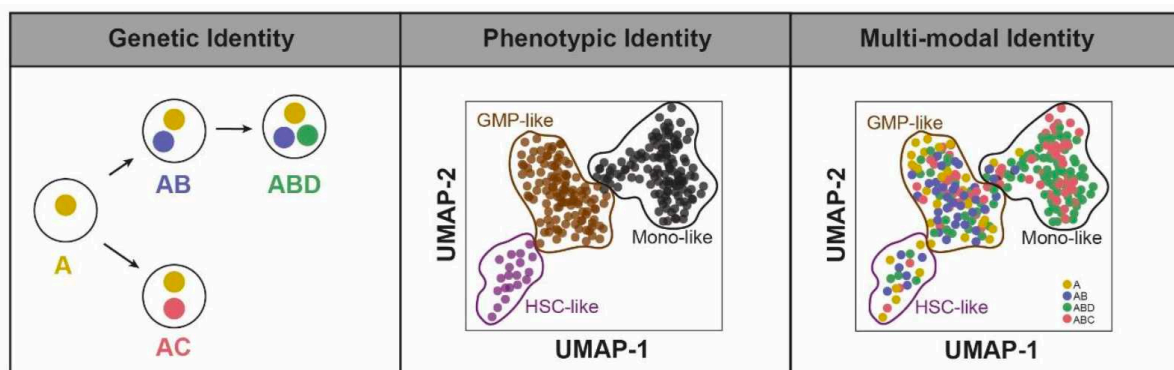


Figure 6 : Étude de l'identité génétique, fonctionnelle et multimodale par séquençage unicellulaire (Duchmann, Laplane, et Itzykson 2021)

GMP : granulocyte-monocyte progenitors, HSC : hematopoietic stem cells.

Prise en charge thérapeutique

Les LAM promyélocytaire bénéficient d'une prise en charge spécifique qui ne sera pas abordée dans ce manuscrit (Sanz et al. 2019).

Les patients atteints de LAM présentent une évolution rapidement défavorable en l'absence de traitement. Ainsi, la grande majorité d'entre eux reçoivent une thérapie anticancéreuse au diagnostic (Linet et al. 2024). Après le traitement, la plupart des patients atteignent la rémission complète (RC) (dans le cas contraire, ils sont qualifiés de « réfractaires ») (H. Döhner et al. 2022). Toutefois, une part importante des patients rechutent et les taux de deuxième RC sont nettement plus faibles, ce qui alourdit le pronostic des LAM.

Les modalités de traitement des LAM sont résumées dans le Tableau 1. Les critères d'éligibilité à la CTI ne sont pas unanimes et se fondent généralement sur l'âge (< 75 ans), les comorbidités et l'indice de performance (ECOG < 2) (H. Döhner et al. 2022). Pour les patients nouvellement diagnostiqués éligibles à la CTI, le traitement se compose d'une phase d'induction visant à l'obtention d'une RC, suivie d'une phase de consolidation et éventuellement d'une phase de maintenance, permettant l'obtention d'une rémission plus profonde et l'allongement de la durée de réponse au traitement. La chimiothérapie d'induction demeure la seule option curative et comprend 3 jours d'anthracyclines (daunorubicine, idarubicine ou mitoxantrone) et 7 jours de cytarabine (un antimétabolite), une association connue sous le nom de « 3 + 7 ». Concernant les LAM secondaires, l'induction est réalisée par CPX-351, une formulation liposomale encapsulant la cytarabine et la daunorubicine à un ratio molaire de 5 : 1 (Lancet et al. 2018). En l'absence de réponse à l'induction, il convient de réaliser une seconde induction à l'aide d'anthracycline et de cytarabine, ou de cytarabine à haute dose (H. Döhner et al. 2022). Le choix du traitement de consolidation dépend de la stratification pronostique du patient. Dans tous les cas, la consolidation comprend un traitement par cytarabine, préférentiellement à dose intermédiaire (Löwenberg 2013). Pour les patients dont le risque de rechute dépasse 35-40% uniquement (ELN défavorable, MRD positive...), une allogreffe de CSH est recommandée après le premier cycle de consolidation (Cornelissen et Blaise 2016). Le conditionnement de l'allogreffe de CSH est choisi en fonction de l'âge du patient et de ses comorbidités : il existe des conditionnements myéloablatifs et des conditionnements réduits. Des thérapies ciblées peuvent être ajoutées aux phases d'induction et de consolidation, à savoir un inhibiteur de FLT3 (iFLT3), nommé midostaurine ou MIDO, pour les LAM mutées *FLT3* (Stone et al. 2017) et un anticorps anti-CD33 combiné à une molécule cytotoxique, nommé gemtuzumab ozogamicine, pour les LAM exprimant le CD33 (Castaigne et al. 2012). Le traitement de maintenance, également nommé traitement d'entretien, est effectué à l'aide d'azacitidine (un agent hypométhylant) ou de MIDO. Chez les patients R/R éligibles à la CTI, l'allogreffe doit être privilégiée car elle offre les meilleures chances de survie (H. Döhner et al. 2022).

Pour les patients nouvellement diagnostiqués inéligibles à la CTI, la combinaison d'azacitidine et de vénétoclax (un inhibiteur de BCL-2) est le nouveau

standard de traitement (DiNardo et al. 2020). Des inhibiteurs d'IDH1/IDH2 sont indiqués chez les patients mutés *IDH1/IDH2* inéligibles à la CTI, nouvellement diagnostiqués ou R/R (DiNardo et al. 2018; Montesinos et al. 2022; Stein et al. 2017).

Tableau 1 : Schémas thérapeutiques utilisés pour la prise en charge des LAM, adapté d'après les recommandations ELN 2022 (H. Döhner et al. 2022)

AU DIAGNOSTIC		
Patients éligibles à la CTI	Mutation de <i>FLT3</i>	<i>Induction</i> : Anthracycline + Cytarabine + Midostaurine <i>Consolidation</i> : Cytarabine à dose intermédiaire + Midostaurine <i>Maintenance</i> : Midostaurine
	Pas de mutation de <i>FLT3</i>	<i>Induction</i> : Anthracycline + Cytarabine <i>Consolidation</i> : Cytarabine à dose intermédiaire <i>Maintenance</i> : Azacitidine
	Expression de CD33 positive, risque intermédiaire ou défavorable	<i>Induction</i> : Anthracycline + Cytarabine + Gemtuzumab Ozogamicine <i>Consolidation</i> : Cytarabine à dose intermédiaire ± Gemtuzumab Ozogamicine
	LAM avec des anomalies associées aux SMD ou LAM secondaire à un traitement	<i>Induction et consolidation</i> : CPX-351 (Daunorubicine + Cytarabine)
Patients inéligibles à la CTI		Azacitidine ou Décitabine + Vénétoclax
	Patient inapte à recevoir un agent hypométhylant	Cytarabine à faible dose + Vénétoclax
	Mutation d' <i>IDH1</i>	Azacitidine + Ivosidénib
	Patient en mauvais état général avec une mutation d' <i>IDH1</i>	Ivosidénib
	Thérapie non envisageable ou non souhaitée	Soins de supports, incluant l'hydroxyurée

À LA MALADIE RÉFRACTAIRE OU EN RECHUTE		
Patients éligibles à la CTI	Mutation de <i>FLT3</i>	Giltéritinib
		Cytarabine à dose intermédiaire ± Anthracycline
		FLAG-IDA (Fludarabine + Cytarabine + Idarubicine + G-CSF)
		MEC (Mitoxantrone + Étoposide + Cytarabine)
		CLAG-M (Cladribine + Cytarabine + Mitoxantrone + G-CSF)
		Allogreffe de CSH
Patients inéligibles à la CTI	Mutation de <i>FLT3</i>	Giltéritinib
	Mutation d' <i>IDH1</i>	Ivosidénib
	Mutation d' <i>IDH2</i>	Enasidénib

G-CSF : granulocyte-colony stimulating factor.

PARTIE II : MUTATIONS DE *FLT3*

Le récepteur *FLT3*

Le gène *FLT3* (*Fms-like tyrosine kinase 3*), également nommé *FLK-2* (*fetal liver kinase-2*), *STK-1* (*human stem cell kinase-1*) et CD135, est localisé sur le bras long du chromosome 13 en 13q12 et contient 24 exons (Carow et al. 1995). Il code pour un récepteur transmembranaire à activité tyrosine kinase nommé FLT3 comprenant 993 acides aminés. Le récepteur FLT3 appartient à la famille des récepteurs à activité tyrosine kinase de classe III, à l'instar de FMS, PDGFR et KIT. Il se compose d'un domaine extracellulaire comprenant 5 domaines immunoglobulines-like, d'un domaine transmembranaire (TMD), d'un domaine juxtamembranaire (JMD) et de deux domaines tyrosine kinase (TKD1 et TKD2) séparés par une séquence d'insert (*kinase insert*) (Figure 7) (Agnès et al. 1994). Il est exprimé de façon physiologique par les CSH et les progéniteurs hématopoïétiques (Rosnet et al. 1996).

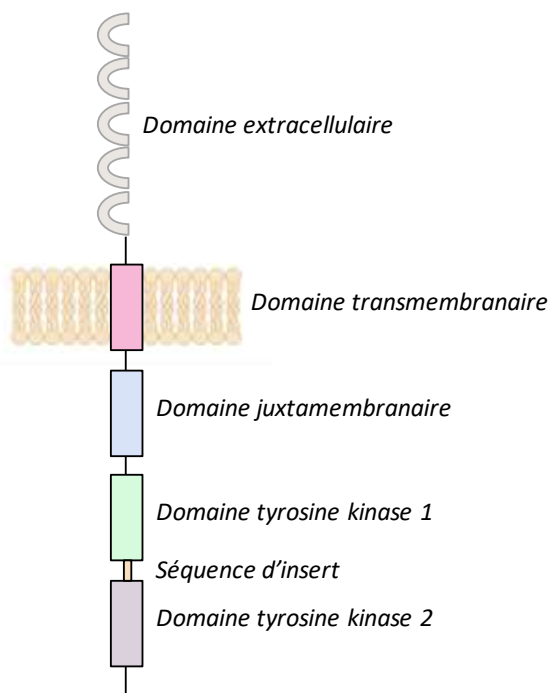


Figure 7 : Structure du récepteur *FLT3*

Le ligand du récepteur FLT3, nommé FLT3-ligand, existe à la fois sous une forme transmembranaire (présentant de nombreuses similarités avec KIT ligand et CSF1) et sous une forme soluble (Lyman et al. 1994; Derek L. Stirewalt et Radich 2003). Il est exprimé et excrété par les lymphocytes T ainsi que les cellules stromales de la MO telles que les fibroblastes (Lisovsky, Braun, et al. 1996; McClanahan et al. 1996).

FLT3-ligand stimule la formation de colonies de type GM (granulocyte-macrophage) à partir de cellules CD34+ cultivées sur méthylcellulose (Ebihara et al. 1997). Son activité est synergique avec d'autres cytokines présentes dans le microenvironnement médullaire telles que IL-3, G-CSF, CSF-1, GM-SCF et IL-6 (Ebihara et al. 1997; Rusten et al. 1996).

Les modèles murins ont permis de préciser les fonctions du récepteur FLT3 et de son ligand. Chez les souris déficientes pour le récepteur FLT3, les CSH ainsi que les progéniteurs lymphoïdes B sont impactés (Mackarehtschian et al. 1995). Par ailleurs, les souris *knock-out* pour FLT3-ligand présentent un nombre réduit de progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes B dans la MO (McKenna et al. 2000).

En l'absence de ligand, le récepteur FLT3 est inactif car le JMD exerce un effet auto-inhibiteur sur l'activité catalytique du TKD (Griffith et al. 2004). La liaison du FLT3-ligand conduit à la dimérisation du récepteur puis à la phosphorylation des TKD, induisant l'activation des effecteurs situés en aval (Figure 8). Les protéines SHC sont rapidement phosphorylées (Lavagna-Sévenier et al. 1998), puis elles interagissent avec d'autres protéines telles que GRB2 (S. Zhang, Mantel, et Broxmeyer 1999), GAB2 (S. Zhang et Broxmeyer 2000), SHIP (Marchetto et al. 1999), SHP2 (S. Zhang, Mantel, et Broxmeyer 1999) et CBL (Lavagna-Sévenier et al. 1998), induisant l'activation de la voie RAS-RAF-MEK-ERK (S. Zhang, Mantel, et Broxmeyer 1999) et de la voie PI3K-PDK1-AKT-mTOR (S. Zhang et Broxmeyer 2000), qui augmentent la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la signalisation du récepteur FLT3 stimule l'activateur de transcription STAT5A (S. Zhang et al. 2000) et réprime l'expression des gènes pro-apoptotiques tels que BAX (Lisovsky, Estrov, et al. 1996). Par la suite, les récepteurs dimérisés sont rapidement internalisés et dégradés (Turner et al. 1996).

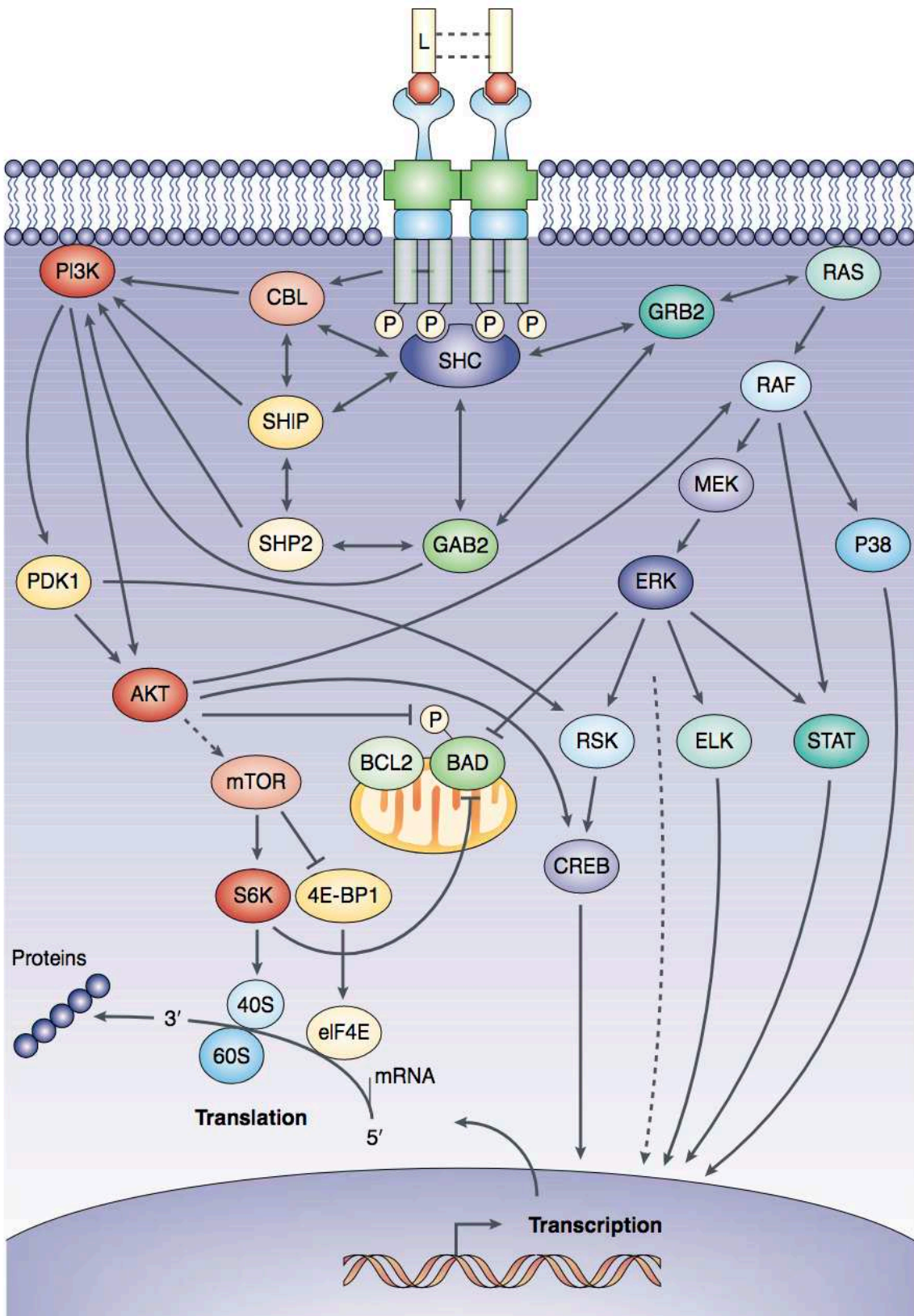


Figure 8 : Représentation schématique des voies de transduction du signal recrutées en aval du récepteur FLT3, après fixation de son ligand (Derek L. Stirewalt et Radich 2003)

Pathologies impliquant des mutations de FLT3

Les mutations de *FLT3* sont les lésions les plus fréquemment retrouvées dans les LAM, totalisant 30% des cas (Papaemmanuil et al. 2016). Elle sont également identifiées dans 3 à 6% des LAL (Ge et al. 2023; Y. Zhang et al. 2020), 4,3% des leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC) (Daver et al. 2013) et 1 à 4% des SMD (Daver et al. 2013; Ge et al. 2023). Plus rarement, des réarrangements de *FLT3* sont mis en évidence dans d'autres hémopathies malignes (Chao et al. 2020; Tang et al. 2021)

Les différents types de mutations de FLT3

- Mutations *FLT3*-ITD

Les duplications internes en tandem du gène *FLT3* (*FLT3*-ITD) ont été découvertes en 1996 (Nakao et al. 1996). Elles sont observées chez 22 à 24% des patients adultes atteints de LAM (Papaemmanuil et al. 2016; Susanne Schnittger et al. 2002). Elles sont plus fréquemment identifiées dans les LAM *de novo* (24,5%) que dans les LAM secondaires à un SMD (15,6%) ou à un traitement (11,5%) (Susanne Schnittger et al. 2002). Dans les LAM pédiatriques, leur prévalence augmente progressivement de 0 à 18 ans (< 1 an : 1%, 1-5 ans : 7%, 5-10 ans : 11%, 10-20 ans : 17%) (Meshinchi et al. 2006). Sur le plan clinique, les mutations *FLT3*-ITD sont associées à une leucocytose ainsi qu'un envahissement médullaire importants (Kottaridis et al. 2001; Metzeler et al. 2016; Thiede et al. 2002). Sur le plan biologique, elles sont plus fréquentes chez les patients présentant un caryotype normal (32% à 39%) (Kottaridis et al. 2001; Metzeler et al. 2016; Susanne Schnittger et al. 2002; Thiede et al. 2002), une t(15;17)(q22;q21) (30 à 37%) (Kottaridis et al. 2001; Susanne Schnittger et al. 2002; Thiede et al. 2002), une t(6;9) (80 à 90%) (Papaemmanuil et al. 2016; Thiede et al. 2002), un réarrangement de *NUP98* (Hollink et al. 2011) ou une duplication de *UBTF* (Duployez et al. 2023). Elles sont rares chez les patients présentant un réarrangement t(8;21) (10%) ou une inv(16) (3%) (Duployez et al. 2016). Elles sont fréquemment associées aux mutations touchant *NPM1*, *DNMT3A* et *WT1* (Metzeler et al. 2016).

Les mutations *FLT3*-ITD sont définies à la fois par leur longueur, leur site d'insertion et leur séquence nucléotidique et ces paramètres sont très hétérogènes (Figure 9). La longueur de l'ITD mesure entre 3 et 300 pb environ (Rücker et al. 2022)

et est toujours multiple de 3, de telle sorte que la mutation ne modifie pas le cadre de lecture. L'emplacement exact de l'ITD est défini par la position génomique de son site d'insertion. L'emplacement peut également être approximé par l'acide aminé situé au niveau du site d'insertion. Par convention, la position du site d'insertion est définie sur la séquence sauvage du *reverse strand*, qui est le brin codant pour le gène *FLT3* (Figure 9). Le site d'insertion est situé dans le JMD dans environ 70% des cas (exon 14) et dans le TKD1 dans environ 30% des cas (exons 14/15) (Figure 10) (Kayser et al. 2009). Par définition, les mutations *FLT3*-ITD résultent de la duplication d'un fragment sauvage du gène *FLT3*. Toutefois, l'insertion de quelques nucléotides ne correspondant pas à la séquence sauvage est observée dans 29 à 45% des cas (Borrow et al. 2019; Kayser et al. 2009; Thiede et al. 2002). Ces insertions sont systématiquement présentes pour préserver le cadre de lecture lorsque la copie de la seule séquence sauvage entraîne un décalage (Kayser et al. 2009). Par ailleurs, la duplication en tandem conduit à une modification de la séquence sauvage d'acides aminés au niveau du site d'insertion de l'ITD dans environ 70% des cas, comme illustré sur la Figure 9 (Kayser et al. 2009; Rucker et al. 2022).

Exon 14 sauvage



Exon 14 contenant une ITD

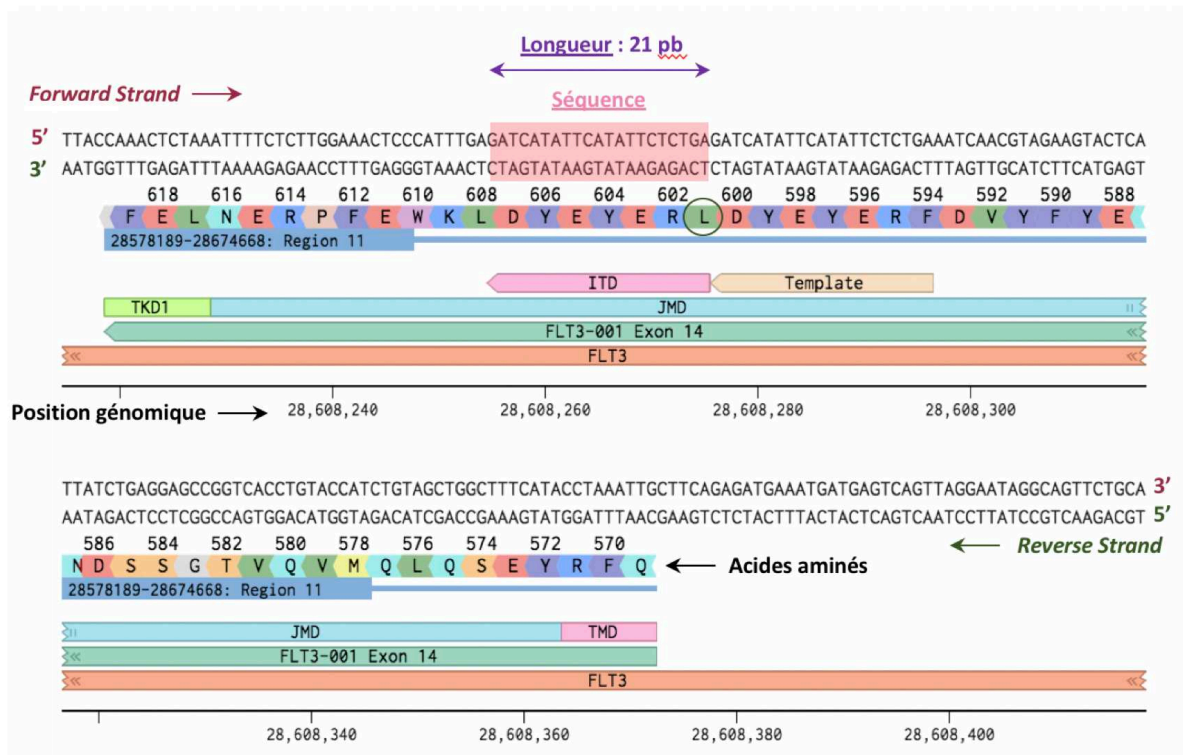


Figure 9 : Représentation du site d'insertion, de la longueur et de la séquence d'une mutation *FLT3*-ITD

L'ITD représentée mesure 21 pb et son site d'insertion est situé à la position génomique 28608255 (hg19) ou à l'acide aminé 601. Exon 14 sauvage : le site d'insertion de l'ITD est défini sur la séquence sauvage du *reverse strand*, qui est le brin codant pour le gène *FLT3*. La *template* de l'ITD correspond à la séquence sauvage qui sert de modèle pour la duplication. Exon 14 contenant une ITD : l'acide aminé entouré ne correspond pas à la séquence sauvage car il a été modifié suite à l'insertion de l'ITD. La figure a été réalisée à l'aide de la plateforme *Benchling*.

- Mutations *FLT3*-TKD

Le terme «mutations *FLT3*-TKD» désigne généralement des mutations *hotspots* qui affectent les codons D835 et I836 situés dans le TKD2 (Yamamoto et al. 2001). Dans une large étude incluant 3082 patients atteints de LAM, ces mutations *FLT3*-TKD ont été identifiées chez 4,8% d'entre eux (Bacher et al. 2008). La prévalence varie entre 5 à 10% dans d'autres études (Thiede et al. 2002; Yamamoto et al. 2001) et est identique dans les LAM pédiatriques (Meshinchi et al. 2006). Parmi les patients avec une mutation *FLT3*-TKD, 89,1% présentent une mutation dans le codon D835, 10,2% dans le codon I836, et 0,7% dans les deux codons (Bacher et al. 2008). Le séquençage des mutations *FLT3*-TKD touchant le codon D835 retrouve principalement des substitutions de type D835Y (56%), D835H (16%), D835V (11%), D835E (9%), et d'autres substitutions plus rares (Bacher et al. 2008). Les mutations du codon I836 sont généralement des délétions du codon (Bacher et al. 2008).

Les mutations *FLT3*-TKD sont plus fréquentes dans les LAM *de novo* (5,3%) que dans les LAM secondaires à un SMD (2,4%) ou à un traitement (2%) (Bacher et al. 2008). Sur le plan clinique, elles sont associées à une leucocytose et un envahissement médullaire et sanguin importants (Bacher et al. 2008; Fröhling et al. 2007). Sur le plan biologique, leur prévalence est plus importante dans les LAM à caryotype normal (6 à 12%) (Bacher et al. 2008; Thiede et al. 2002) et dans les LAM avec inv(16) (13 à 22%) (Duployez et al. 2016; Kok et al. 2013), mais moins importante dans les LAM à caryotype complexe (0,9%) (Bacher et al. 2008). Elles sont plus fréquemment retrouvées chez les patients mutés *NPM1* (8,8%) (Bacher et al. 2008). En revanche, elles sont rares dans les LAM mutées *FLT3*-ITD (2,9%) (Bacher et al. 2008).

- Mutations non canoniques de *FLT3*

Les mutations de *FLT3* les plus fréquentes sont illustrées sur la Figure 10.

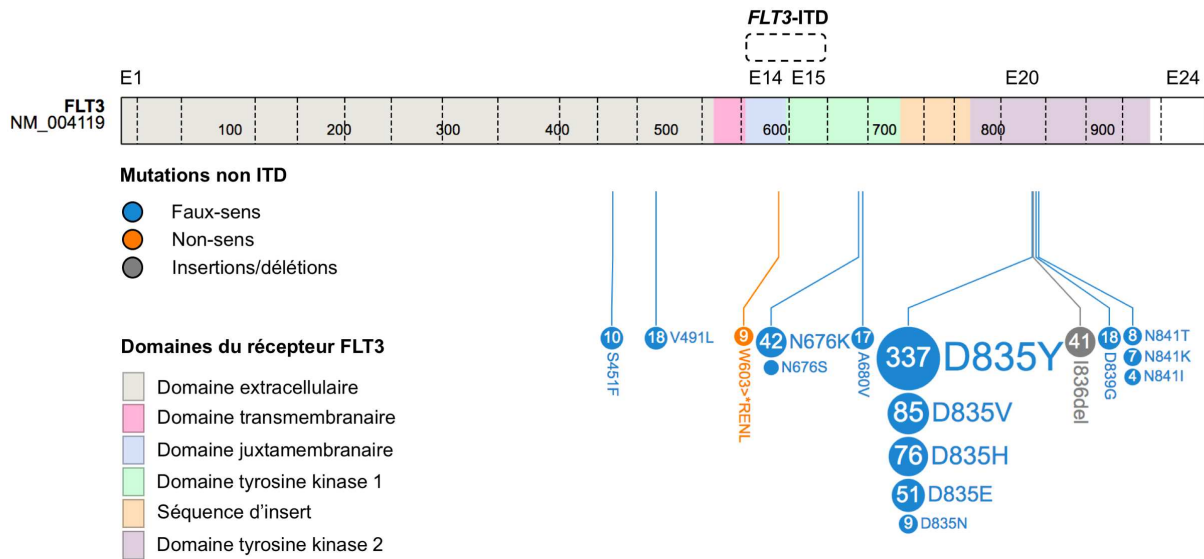


Figure 10 : Spectre des mutations de *FLT3* impliquées dans les leucémies aiguës myéloïdes

Seules les mutations identifiées chez plus de 1% des patients sont représentées. Les effectifs sont indiqués à l'intérieur des cercles. La figure a été réalisée à l'aide de l'interface *PeCan*, d'après la base de données COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*). E : exon.

Il existe des mutations de *FLT3* « non canoniques », à savoir des mutations qui ne sont ni des ITDs, ni des « mutations *FLT3*-TKD ». Elles représentent 21,2% de l'ensemble des mutations de *FLT3* (Ge et al. 2023) et sont retrouvées chez 5,5% des patients portant des mutations canoniques de *FLT3* (Jahn et al. 2022). Dans 91% des cas, les mutations non canoniques sont des mutations ponctuelles (Ge et al. 2023). Elles peuvent toucher le TKD2, à l'instar des mutations D839G (M. L. Smith et al. 2005), R834Q (Fröhling et al. 2007) et des mutations du codon N841 (Jiang et al. 2004). La mutation Y842C, touchant également le TKD2, a été identifiée chez des patients en rechute post-CTI (Kindler et al. 2005). Les mutations non canoniques peuvent également toucher le TKD1, à l'instar de la mutation N676K, initialement identifiée chez un patient en progression après traitement par MIDO (Heidel et al. 2006; Roloff et al. 2023) et de la mutation A680V, qui a été décrite principalement dans les LAM pédiatriques (Bolouri et al. 2018). Les mutations non canoniques ponctuelles peuvent enfin toucher le JMD (e.g V592G) (Fröhling et al. 2007; Reindl et al. 2006; Derek L. Stirewalt et al. 2004) ainsi que le domaine extracellulaire (e.g S451F (Fröhling

et al. 2007) et V491L (M. Levis et al. 2024; Zuo, Medeiros, et Yin 2023)). Plus rarement, les mutations non canoniques de *FLT3* se présentent sous la forme de délétions ou d'insertions/délétions de petite taille touchant le JMD (Chatain et al. 2015; Young et al. 2021), ou encore d'insertions touchant le TKD1 (Spiekermann et al. 2002).

Physiopathologie des mutations de FLT3

Bien que les conséquences conformationnelles de la mutation *FLT3*-ITD soient encore mal connues, il semblerait qu'elle entrave l'action inhibitrice intrinsèque du JMD sur le récepteur *FLT3*. À l'état basal, le JMD permet de prévenir la dimérisation du récepteur en l'absence de ligand (Griffith et al. 2004). La transduction de mutations *FLT3*-ITD *in vitro* conduit à une dimérisation ligand-indépendante des récepteurs *FLT3*, suivie d'une auto-phosphorylation et d'une activation constitutive (Hayakawa et al. 2000; Kiyoi et al. 1998), impactant la différenciation, la prolifération et l'apoptose (Mizuki et al. 2000; Zheng, Friedman, et Small 2002). En outre, la majorité des protéines encodées par l'allèle muté *FLT3*-ITD sont retenues au niveau du réticulum endoplasmique sous une forme hypoglycosylée (Schmidt-Arras et al. 2009) et activent la protéine *STAT5* de façon aberrante (Lv et al. 2021). Le résidu R595 de la protéine *FLT3* jouerait un rôle essentiel dans l'activation de *STAT5* (Vempati et al. 2007). Il appartient au motif YVDFREYEEY (acides aminés 591-599) qui semble crucial dans la physiopathologie des mutations *FLT3*-ITD, dans la mesure où plus de 90% des ITDs dupliquent tout ou partie de ce motif (Kayser et al. 2009; Rucker et al. 2022). L'introduction de mutations *FLT3*-ITD dans des modèles murins génère un SMP *LMMC-like* associé à une hausse du nombre, de la prolifération et de la survie des CSH et des progéniteurs hématopoïétiques (B. H. Lee et al. 2007).

Les mutations *FLT3*-TKD entraînent également une phosphorylation constitutive du récepteur *FLT3* et une croissance cellulaire ligand-indépendante (Yamamoto et al. 2001). Bien que la physiopathologie de ces mutations soit mal connue, il est probable qu'elles augmentent l'activité tyrosine kinase intrinsèque du récepteur (Derek L. Stirewalt et Radich 2003). De façon analogue aux mutations canoniques, les mutations non canoniques de *FLT3* peuvent induire une activation du récepteur et des voies de signalisation en aval, conférant une sensibilité aux iFLT3 (Fröhling et al. 2007; Pikman et al. 2021; Reindl et al. 2006; Spiekermann et al. 2002; Young et al. 2021).

Méthodes d'étude des mutations de *FLT3*

- Mutations *FLT3*-ITD

D'après les recommandations de l'ELN émises en 2022, l'analyse de fragments (AF) demeure la méthode de référence pour détecter et quantifier les mutations *FLT3*-ITD (H. Döhner et al. 2022). Cette méthode inclut une étape d'amplification par PCR, suivie d'une étape de séparation par électrophorèse capillaire (Thiede et al. 2002) (Figure 11).

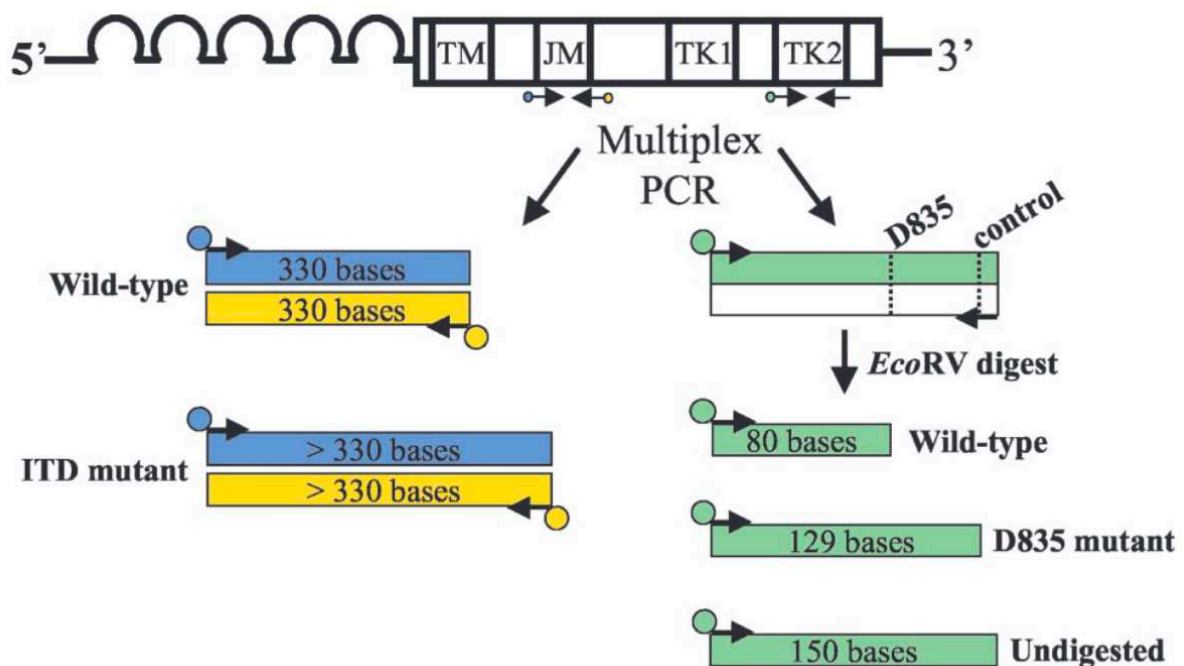


Figure 11 : Principe de la détection des mutations de *FLT3* par analyse de fragments (Murphy et al. 2003)

TM : domaine transmembranaire, JM : domaine juxtamembranaire, TK1 : domaine tyrosine kinase 1, TK2 : domaine tyrosine kinase 2.

L'AF permet de mettre en évidence toutes les ITDs, quelle que soit leur longueur, leur site d'insertion et leur séquence nucléotidique, à l'aide d'amplicons couvrant les exons 14 et 15. La présence d'une ITD se traduit par un allongement de la taille du fragment amplifié. Afin d'évaluer la longueur de l'ITD, il convient de soustraire la longueur du fragment sauvage à la longueur du fragment muté. La mutation est quantifiée à l'aide du ratio allélique (RA) ou plus rarement de la VAF. Le RA de la mutation est estimé en divisant l'aire sous la courbe (AUC) du fragment muté par l'AUC du fragment sauvage. La VAF de la mutation est calculée en divisant l'AUC du

fragment muté par la somme de l'AUC du fragment muté et de l'AUC du fragment sauvage. La limite de détection des mutations *FLT3*-ITD par AF est estimée entre 0,017 (Sakaguchi et al. 2020) et 0,053 (Murphy et al. 2003) (en RA). En pratique, le seuil retenu dans les études varie entre 0,03 et 0,05 (Perl et al. 2019; Schmalbrock et al. 2021; Stone et al. 2017; Xuan et al. 2020). La recherche de mutations *FLT3*-ITD par AF peut être réalisée à partir d'une matrice d'ADN génomique ou d'ADN complémentaire (ADNc), auquel cas elle est précédée d'une étape de rétrotranscription. La corrélation entre les RAs mesurés sur ADN génomique et sur ADNc est satisfaisante (Cucchi et al. 2018; Susanne Schnittger et al. 2002), bien que certaines études aient révélé un léger déséquilibre d'expression en faveur de l'allèle ITD (RA médian sur ADN : 0,58 vs RA médian sur ADNc : 0,65) (Cucchi et al. 2021). Ainsi, 4,2% des ITDs ne sont détectables que sur ADNc (Cucchi et al. 2021). Toutefois, la recherche de mutations *FLT3*-ITD sur ADN génomique demeure le standard (Stone et al. 2017).

À terme, le séquençage à haut débit (HTS) pourrait supplanter l'AF comme technique de référence car il présente de nombreux avantages. Tout comme l'AF, il permet de déterminer le RA et la longueur de l'ITD. Afin de déterminer le RA par HTS, il convient de diviser le nombre de *reads* (ou lectures) mutés par le nombre de *reads* sauvages. La VAF de la mutation est calculée en divisant le nombre de *reads* mutés par la somme des *reads* mutés et sauvages. En outre, le HTS est une approche beaucoup plus sensible que l'AF : il offre une limite de détection des mutations *FLT3*-ITD atteignant $10^{-4}/10^{-5}$ (Grob, Sanders, et al. 2022). Ainsi, il a permis de révéler la présence de mutations *FLT3*-ITD chez un quart des patients présentant un statut négatif en AF au diagnostic (Yokoyama et al. 2023; Zuffa et al. 2015). Par ailleurs, le HTS permet de détecter des clones *FLT3*-ITD chez les patients en rémission cytologique (cf : « Impact de la maladie résiduelle *FLT3*-ITD »). Enfin, contrairement à l'AF, le HTS permet de déterminer la séquence nucléotidique de l'ITD ainsi que son site d'insertion, et est multiplexable.

La recherche des mutations *FLT3*-ITD par HTS impose néanmoins quelques précautions. En effet, l'analyse des données de HTS comporte généralement une étape d'alignement des *reads* au génome humain de référence. Étant donné que les mutations *FLT3*-ITD résultent de la duplication parfaite ou quasi-parfaite d'une séquence sauvage du gène *FLT3*, elles sont difficiles à détecter à l'aide des outils

d'alignement conventionnels tels que SAMtools, Maq, Dindel, et GATK (Spencer et al. 2013). Selon la longueur de l'ITD, ces outils peuvent aligner les *reads* mutés de trois façons différentes. Si l'ITD est de faible longueur, elle est considérée comme une insertion lors de l'étape d'alignement. Si elle est de longueur moyenne, l'alignement est réalisé sur l'ITD ou sur la portion sauvage restante du *read* et la duplication est ignorée. Enfin, si la longueur de l'ITD excède la longueur du *read*, elle est alignée sans être détectée. De nombreux algorithmes ont été développés pour résoudre spécifiquement cette problématique et ainsi améliorer la détection des ITDs (Yuan et al. 2021) : pindel (Spencer et al. 2013), ITDseek (Au et al. 2016), Scan-ITD (T.-Y. Wang et Yang 2020), getITD (Blätte et al. 2019), FLT3_ITD_ext (Tsai et al. 2020), km (Audemard et al. 2019), Genomon ITDetector (GID) (Chiba et al. 2015), ITD-Assembler (Rustagi et al. 2016) et FiLT3R (Boudry et al. 2022). Par ailleurs, les différentes techniques d'enrichissement permettant de préparer la librairie de HTS ne sont pas équivalentes pour rechercher les ITDs. Afin de détecter une ITD, il convient de séquencer le site d'insertion et les régions adjacentes, au moins sur quelques pb. En raison de l'hétérogénéité importante de ces mutations, il est préférable de réaliser un enrichissement par capture et non par PCR. En effet, dans l'approche d'enrichissement par PCR, les sites de fixation des amorces sont fixes et déterminés lors de la conception du panel. Par conséquent, cette méthode ne permet pas de détecter certaines ITDs qui sont situées dans l'angle mort des amplicons. Au contraire, dans l'approche d'enrichissement par capture, l'ADN est fragmenté de façon aléatoire avant la fixation d'amorces universelles aux extrémités des fragments. Par la suite, les régions d'intérêt sont capturées à l'aide de sondes spécifiques. Ainsi, les amorces sont fixées à une infinité de sites distincts (Kozarewa et al. 2015) et toutes les mutations *FLT3*-ITD sont théoriquement détectables (He et al. 2020) (Figure 12).

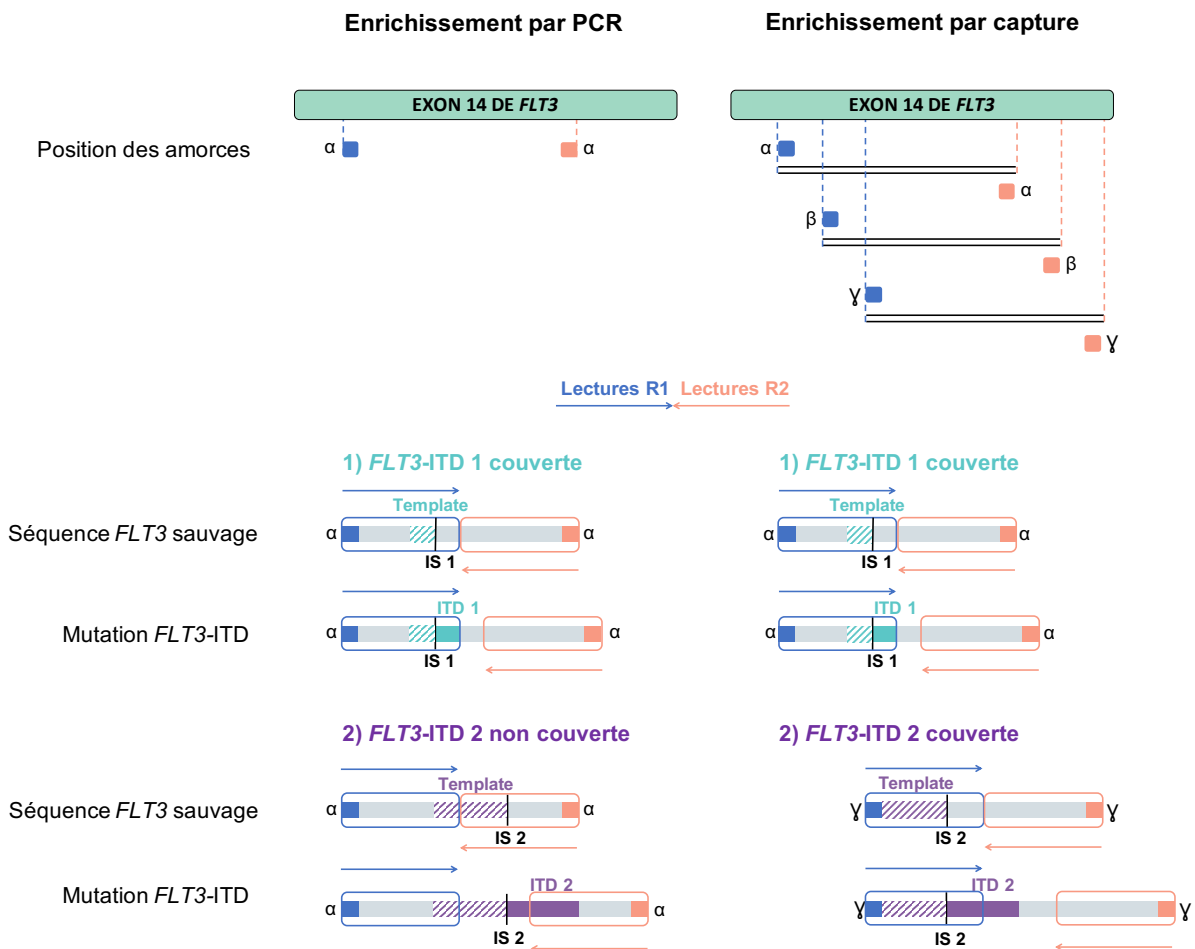


Figure 12 : Techniques d'enrichissement pour le séquençage à haut débit

Au total, trois couples d'amorces différents, définis par leur position sur l'exon 14 sauvage de *FLT3*, sont représentés (α , β et γ). La *template* d'une ITD correspond à la région sauvage qui sert de modèle pour la duplication. Le séquençage est réalisé en *paired-end*, à partir des amorces sens (lectures R1) et des amorces antisens (lectures R2). Pour détecter une ITD, il est nécessaire que certaines lectures ou *reads* couvrent le site d'insertion de l'ITD et quelques bases adjacentes de chaque côté. IS : site d'insertion.

- Mutations *FLT3*-TKD

L'AF est généralement utilisée pour rechercher les mutations *FLT3*-TKD touchant les codons D835 et I836, selon une méthode décrite en 2003 (Murphy et al. 2003). Cette méthode inclut une étape d'amplification par PCR, suivie d'une étape de digestion du produit de PCR par l'enzyme *EcoRV* et enfin d'une étape de séparation par électrophorèse capillaire (Figure 11). L'enzyme de restriction *EcoRV* clive la séquence palindromique 5'-GATATC-3' formée par les codons 835 et 836 sauvages. Si une mutation est présente sur ces codons, l'enzyme ne peut plus cliver l'ADN : les fragments mutés présentent ainsi une taille supérieure aux fragments sauvages. Par

ailleurs, un site de restriction additionnel est présent sur une des amorces, ce qui permet de contrôler que les fragments amplifiés ont bien été digérés. L'AF offre une limite de détection des mutations *FLT3*-TKD située autour de 5% (Murphy et al. 2003). Le HTS permet également de détecter les mutations *FLT3*-TKD.

- Mutations non canoniques de *FLT3*

Les mutations non canoniques de *FLT3* étant disséminées sur plusieurs exons, elles sont en général recherchées par HTS à l'aide de panels couvrant tous les exons du gène *FLT3* (Jahn et al. 2022).

Pronostic des mutations de FLT3

- Mutations *FLT3*-ITD

Chez les patients nouvellement diagnostiqués traités par CTI, il est depuis longtemps admis que les mutations *FLT3*-ITD sont associées à un mauvais pronostic en termes de SG et de survie sans évènement (SSE) (Kottaridis et al. 2001; Patel et al. 2012). D'après la classification ELN 2022, elles confèrent un pronostic intermédiaire au diagnostic, uniquement en l'absence des anomalies $t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1$, $inv(16)(p13.1q22)$ et $t(16;16)(p13.1;q22)/CBFB::MYH11$ qui confèrent un bon pronostic (RFL-Tableau 2) (H. Döhner et al. 2022). Chez les patients nouvellement diagnostiqués traités par azacitidine et vénétoclax, la présence d'une mutation *FLT3*-ITD est associée à un mauvais pronostic en termes de SG (H. Döhner et al. 2024).

L'impact pronostique des mutations *FLT3*-ITD indétectables par AF (en raison d'un RA trop faible) a peu été étudié à ce jour. Toutefois, les patients présentant des clones *FLT3*-ITD détectables uniquement par HTS ont un taux de rechute à un an plus élevé que les patients au statut *FLT3*-ITD doublement négatif, par HTS et AF (Yokoyama et al. 2023).

La présence d'une mutation *FLT3*-ITD est associée à une baisse de la SG chez les patients réfractaires recevant des CTI de deuxième ligne (Wattad et al. 2017) ainsi qu'à un taux de rémission complète/rémission complète avec récupération hématologique incomplète (RC/RCi) abaissé chez les patients en rechute traités par CTI (R. F. Schlenk et al. 2017).

- Mutations *FLT3*-TKD

Les mutations *FLT3*-TKD n'ont pas d'impact pronostique en général (Bacher et al. 2008). Toutefois, elles possèdent une valeur pronostique dans certains sous-groupes de LAM définis par des anomalies génétiques. Ainsi, elles améliorent la survie sans rechute (SSR) dans le sous-groupe des LAM mutées *NPM1* (Boddu et al. 2017). Par ailleurs, elles augmentent l'incidence cumulée de rechute (ICR) dans le sous-groupe des LAM à CBF (lorsque leur VAF dépasse 10%) (Duployez et al. 2016) et diminuent la SG dans le sous-groupe des LAM avec une duplication partielle en tandem de *KMT2A* (aussi nommé *MLL*) (Papaemmanuil et al. 2016).

Impact pronostique des caractéristiques initiales des mutations *FLT3*-ITD

- Impact du ratio allélique des mutations *FLT3*-ITD et du statut *NPM1*

Le RA médian des mutations *FLT3*-ITD dépend de la sensibilité de la technique de mesure : il est estimé entre 0,5 et 0,8 par technique d'AF (Kayser et al. 2009; Richard F. Schlenk et al. 2014; Thiede et al. 2002) et un log en dessous par technique de HTS (0,04) (Rücker et al. 2022). La présence d'une mutation *FLT3*-ITD avec un RA élevé a été associée à une diminution du taux de RC, de la SG et de la SSR chez les patients nouvellement diagnostiqués traités par CTI, en appliquant différents seuils : 0,78 (Thiede et al. 2002) et 0,20/0,53/0,80 (Richard F. Schlenk et al. 2014). En présence de plusieurs mutations *FLT3*-ITD, les RAs des différentes ITDs sont généralement additionnés pour obtenir un RA unique (Richard F. Schlenk et al. 2014; Thiede et al. 2002).

Par ailleurs, plusieurs études ont démontré que le statut *NPM1* modifiait le pronostic des mutations *FLT3*-ITD. Tout d'abord, les patients ont été stratifiés en trois groupes pronostiques fondés sur les statuts *NPM1* et *FLT3*-ITD, à savoir le groupe de bon pronostic (*FLT3*-ITD négatif [neg] *NPM1* positif [pos]), de pronostic intermédiaire (*FLT3*-ITDneg *NPM1*neg ou *FLT3*-ITDpos *NPM1*pos) et de mauvais pronostic (*FLT3*-ITDpos *NPM1*neg) (Gale et al. 2008). Dans des études ultérieures, ils ont été stratifiés en fonction du statut *NPM1* et du RA de *FLT3*-ITD, en utilisant un *cut-off* à 0,5 (Pratcorona et al. 2013; S. Schnittger et al. 2011). Parmi les patients mutés *NPM1*, les sujets avec un RA *FLT3*-ITD < 0,5 présentaient un pronostic similaire aux sujets *FLT3*-sauvages, en termes de SG, de risque de rechute et de SSR (Pratcorona et al. 2013). En comparaison, les patients mutés *NPM1* avec un RA *FLT3*-ITD > 0,5 présentaient

une SG (Pratcorona et al. 2013; S. Schnittger et al. 2011) et une SSE réduites (S. Schnittger et al. 2011). Parmi les patients *NPM1*-sauvages, les sujets avec une mutation *FLT3*-ITD présentaient un risque de rechute augmenté et une SG réduite par comparaison aux patients *FLT3*-sauvages, quel que soit le RA associé (Pratcorona et al. 2013). Par ailleurs, l'allogreffe de CSH en première RC permettait de réduire le risque de rechute dans tous les sous-groupes moléculaires excepté le sous-groupe des LAM mutées *NPM1* avec un statut *FLT3* sauvage ou un RA *FLT3*-ITD < 0,5 (Pratcorona et al. 2013). L'année suivante, une étude a démontré que seuls les patients avec une mutation *FLT3*-ITD au RA $\geq 0,51$ présentaient un bénéfice en termes de SG et de SSR à la suite d'une allogreffe de CSH en première RC (Richard F. Schlenk et al. 2014). Ces études ont conduit à prendre en compte le RA des mutations *FLT3*-ITD (au seuil de 0,5) ainsi que le statut *NPM1* pour stratifier les patients dans la classification ELN 2017 (H. Döhner et al. 2016).

Après 2017, la MIDO a été largement utilisée en première ligne et a permis d'harmoniser le pronostic des patients *NPM1*-sauvages avec une mutation *FLT3*-ITD, quel que soit le RA associé (K. Döhner et al. 2020). De plus, chez les patients mutés *NPM1*, la MRD *NPM1* possède un impact pronostique majeur, surpassant celui du RA des mutations *FLT3*-ITD (Balsat et al. 2017). Enfin, il existe un manque de standardisation de la technique d'AF pour la quantification des ITDs (Thiede et al. 2018). Pour ces différentes raisons, les patients avec une mutation *FLT3*-ITD ont été classés à risque intermédiaire dans la classification ELN 2022, indépendamment du RA de l'ITD et du statut *NPM1* (H. Döhner et al. 2022). Toutefois, il semblerait que la triple association des mutations *DNMT3A*, *NPM1* et *FLT3*-ITD ait un impact pronostique négatif au diagnostic de LAM (Bezerra et al. 2020; Papaemmanuil et al. 2016). Après traitement, ces LAM « triples mutées » présentent une MRD *FLT3*-ITD positive dans près d'un quart des cas tandis qu'aucune MRD *FLT3*-ITD positive n'a été détectée chez les patients doubles mutés *NPM1/FLT3*-ITD (Grob, Sanders, et al. 2022).

Par ailleurs, il est important de préciser que la valeur pronostique du RA des ITDs n'est pas établie chez les patients atteints de LAM R/R.

- Impact du site d'insertion des mutations *FLT3*-ITD

Une étude réalisée sur un large panel de 893 ITDs a mis en évidence que 70,8% d'entre elles étaient insérées dans le JMD tandis que les autres présentaient un site d'insertion plus distal, quasi-exclusivement dans le feuillet beta1 du TKD1 (28%) (Rücker et al. 2022). A de très faibles fréquences ($\leq 1\%$), le site d'insertion était situé dans d'autres domaines du TKD1 (*nucleotide-binding loop*, feuillet beta2, en aval du feuillet beta2) (Rücker et al. 2022).

Les ITDs s'insérant dans le TKD-1 (ITD-TKD1) et les ITDs s'insérant dans le JMD (ITD-JMD) présentent des propriétés distinctes. L'analyse du transcriptome complet de lignées cellulaires et de cellules primaires a révélé que les cellules mutées ITD-TKD1 présentaient une régulation anormale de la réparation cellulaire, de l'organisation de la chromatine et de l'adhésion, par comparaison aux cellules mutées ITD-JMD (Arreba-Tutusaus et al. 2016).

Chez les patients traités par CTI, la présence d'une ITD-TKD1 a été associée à une baisse du taux de RC, de la SSE et de la SG, par rapport aux patients mutés ITD-JMD (Kayser et al. 2009). *In vitro*, les cellules mutées ITD-TKD1 sont moins sensibles à la cytarabine que les cellules mutées ITD-JMD et cette résistance serait médiée par l'activation de la voie CDK2-CCNA2 et de la voie CDK7-Cycline H en aval, conduisant à une accumulation des cellules en phase S (Pugliese et al. 2023).

- Impact du nombre de clones *FLT3*-ITD

La technique de HTS ayant une meilleure sensibilité que la technique d'AF, le nombre moyen de clones *FLT3*-ITD détectés par patient au diagnostic est plus élevé dans les études s'appuyant sur le HTS (2,009) (Rücker et al. 2022) que dans les études antérieures se fondant sur l'AF (1,14-1,33) (Gale et al. 2008; Kayser et al. 2009; Schranz et al. 2018). En conséquence, la proportion de patients présentant plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic est plus élevée dans les études fondées sur le HTS (53,5%) (Rücker et al. 2022) que dans les études se basant sur l'AF (12,4%-27%) (Gale et al. 2008; Kayser et al. 2009; Kottaridis et al. 2001; Schranz et al. 2018). Plusieurs études fondées sur l'AF ont indiqué que le nombre de clones *FLT3*-ITD n'a pas de valeur pronostique (Gale et al. 2008; Kayser et al. 2009; Meshinchi et al. 2008). Toutefois, certaines équipes ont démontré que la présence de plusieurs clones *FLT3*-ITD était corrélée à un taux de RC (Richard F. Schlenk et al. 2014), une SSR et une

SG abaissés (Kottaridis et al. 2001) en analyse univariée, en se fondant sur l'AF ou le HTS. Il est nécessaire de préciser que l'augmentation du nombre de clones *FLT3*-ITD ne s'accompagne pas d'une augmentation du RA total (Gale et al. 2008; Rücker et al. 2022).

- Impact de la longueur des mutations *FLT3*-ITD

La longueur des ITDs s'étend de 3 à 300 pb environ (Rücker et al. 2022) et la médiane se situe autour de 45-48 pb (Gale et al. 2008; Kayser et al. 2009; Rücker et al. 2022). L'impact pronostique de la longueur des ITDs est encore débattu. Certaines études ont démontré qu'une longueur élevée était associée à une baisse de la SSR (Meshinchi et al. 2008; Derek L. Stirewalt et al. 2006), de la SSE (Y. Kim et al. 2015) et de la SG (Y. Kim et al. 2015; Meshinchi et al. 2008), en utilisant différents seuils : 40pb (Derek L. Stirewalt et al. 2006), 48 pb (Meshinchi et al. 2008) et 70pb (Y. Kim et al. 2015). De plus, une étude a démontré que le taux de RC diminuait lorsque la longueur de l'ITD augmentait (Gale et al. 2008).

Toutefois, d'autres études ont démontré que la longueur de l'ITD n'avait pas d'influence sur le risque de rechute et la SG (Gale et al. 2008; Ponziani et al. 2006). Il existe une corrélation entre la longueur de l'ITD et le site d'insertion : plus le site d'insertion est distal (i.e vers l'extrémité C-terminale de la protéine), plus la longueur de l'ITD est importante (Kayser et al. 2009; Rücker et al. 2022). Cette corrélation est logique si on l'envisage d'un point de vue finaliste : plus le site d'insertion est distal, plus la séquence dupliquée doit être longue pour inclure le motif YVDFREY EY (codons 591-599) qui est situé dans l'exon 14.

- Impact du statut allélique des mutations *FLT3*-ITD

Dans les LAM avec mutation *FLT3*-ITD, on peut observer une perte de l'allèle sauvage de *FLT3*. Tout d'abord, ce phénomène a été suspecté chez des patients présentant un RA très élevé en AF, indiquant que l'allèle ITD était plus fréquent que l'allèle sauvage (Kottaridis et al. 2001; Thiede et al. 2002). Plus tard, des analyses par FISH (Thiede et al. 2002), puis par *Single Nucleotide Polymorphism-array* (SNP-Array) (Raghavan et al. 2008; Walker et al. 2019) ont permis de démontrer que la perte de l'allèle sauvage de *FLT3* ou perte d'hétérozygotie (LOH) résultait d'une disomie uniparentale acquise (UPD) 13q et non d'une simple délétion de l'allèle sauvage. L'UPD est un phénomène dans lequel un segment chromosomique (ici un segment

d'un chromosome 13 contenant une ITD) est dupliqué et remplace le segment homologue.

Bien que des UPDs puissent être observées dans d'autres régions au diagnostic de LAM, les UPDs 13q sont les plus fréquemment décrites et touchent 3,8% (L. Bullinger et al. 2010) à 7% des LAM à caryotype normal de l'adulte (Walker et al. 2019; Yi et al. 2011), soit 18,9% des LAM *FLT3*-ITD à caryotype normal de l'adulte (Walker et al. 2019). Elles concernent 14% des LAM pédiatriques au diagnostic, soit 34% des LAM pédiatriques *FLT3*-ITD (D L Stirewalt et al. 2014). Les UPDs 13q sont associées dans la quasi-totalité des cas à la présence d'une mutation *FLT3*-ITD (Walker et al. 2019).

Au diagnostic de LAM, la présence d'une UPD 13q (mise en évidence par SNP-array) a été associée à une diminution de la SG en analyse univariée (Gronseth et al. 2015; Walker et al. 2019) et de la survie sans maladie en analyse multivariée (Walker et al. 2019). Sur le plan biologique, la LOH de *FLT3*-ITD, dépistée par AF, a été associée à une hyperleucocytose (Gale et al. 2008; Kottaridis et al. 2001), une hyperexpression de CD33 (D L Stirewalt et al. 2014) et une expression aberrante des gènes impliqués dans la recombinaison et la réparation de l'ADN (D L Stirewalt et al. 2014). Plusieurs études ont suggéré que les LOH de *FLT3*-ITD seraient plus fréquentes à la rechute qu'au diagnostic de LAM, en se fondant sur l'AF (Shih et al. 2002) ou sur le SNP-array (Krönke et al. 2013; Raghavan et al. 2008).

Dans des modèles murins, la LOH de *FLT3*-ITD conduit au développement spontané de leucémies, alors que ce phénomène n'est pas observé chez les souris hétérozygotes (L. Li et al. 2011). Elle a été associée à une expansion du compartiment des CSH (Lin⁻ Sca1⁺ ckit⁺ ou LSK), présentant également une prolifération et une survie accrues (B. H. Lee et al. 2007). Concernant les cellules circulantes, elle a été associée à une augmentation des leucocytes et à une diminution des thrombocytes et de l'hémoglobine (B. H. Lee et al. 2007; L. Li et al. 2011). Les cellules homozygotes pour *FLT3*-ITD présentent une expression membranaire de *FLT3* réduite au profit d'une expression intracellulaire augmentée, et une hausse de l'activation de *STAT5* (L. Li et al. 2011).

Le SNP-array permet de mettre en évidence les clones porteurs d'une UPD lorsqu'ils représentent au moins 20% de la population leucémique totale. Or, la mutation *FLT3*-ITD homozygote peut être présente dans un sous-clone de faible taille,

en particulier au diagnostic de LAM (T. Kim et al. 2022; D L Stirewalt et al. 2014). Le séquençage unicellulaire est une approche plus sensible : il permet de détecter les clones homozygotes pour *FLT3*-ITD lorsqu'ils représentent au moins 0,1% de la population leucémique totale (T. Kim et al. 2022; Morita et al. 2020). Ainsi, cette technique pourrait permettre de préciser l'impact des sous-clones *FLT3*-ITD homozygotes dans les années à venir.

Évolution des mutations de FLT3 à la progression après traitement intensif

La recherche de mutations *FLT3*-ITD par AF sur des échantillons appariés a permis d'établir que 80 à 94% des patients initialement mutés *FLT3*-ITD conservaient un statut *FLT3*-ITD positif à la rechute post-CTI (Cloos et al. 2006; Krönke et al. 2013; Shih et al. 2002). Une étude réalisée par HTS sur une cohorte plus large a estimé que ce taux de persistance s'élevait à 67% (50/75) (Garg et al. 2015). Dans une de ces études, les VAFs des mutations *FLT3*-ITD augmentaient significativement entre le diagnostic et la rechute, démontrant le rôle prépondérant des clones *FLT3*-ITD dans la progression de la pathologie (VAF moyenne : 17,9% vs 40,5%) (Shih et al. 2002). Par ailleurs, ces études ont révélé une positivation du statut *FLT3*-ITD à la rechute chez environ 8,5% des patients atteints de LAM (Cloos et al. 2006; Shih et al. 2002), et plus spécifiquement 31% des patients présentant initialement une mutation de *NPM1* (Krönke et al. 2013). Chez les patients allogreffés, le taux de persistance de *FLT3*-ITD à la rechute s'élève à 53% (Xuan et al. 2020).

Les mutations *FLT3*-TKD étant moins fréquentes que les mutations *FLT3*-ITD, les études décrivant leur évolution entre le diagnostic et la rechute sont plus rares. Toutefois, les mutations *FLT3*-TKD semblent plus instables que les mutations *FLT3*-ITD : seuls 31% (4/13) des patients initialement mutés *FLT3*-TKD conservent un statut *FLT3*-TKD positif à la rechute (Bacher et al. 2008). Ainsi, la mutation *FLT3*-TKD ne constitue pas un bon marqueur de MRD.

Impact de la maladie résiduelle FLT3-ITD

Le suivi de la MRD *FLT3-ITD* est principalement réalisé par HTS pour plusieurs raisons. Tout d'abord, la technique d'AF présentant une limite de détection située autour de 0,05, elle ne permet pas de repérer les clones indétectables par l'analyse cytologique et ne convient donc pas pour l'analyse de la MRD. Par ailleurs, les mutations *FLT3-ITD* présentent une hétérogénéité très importante en termes de longueur et de site d'insertion. Ainsi, les techniques qui sont communément employées pour le suivi de la MRD, telles que la PCR quantitative et la PCR digitale, ne conviennent pas car elles nécessiteraient de concevoir des systèmes spécifiques pour chaque mutation *FLT3-ITD* (Heuser et al. 2021). Par conséquent, le HTS est la technologie la plus adaptée pour le suivi de la MRD *FLT3-ITD* car elle offre une bonne sensibilité et elle permet de détecter un large spectre de mutations *FLT3-ITD* (Blätte et al. 2019).

Dans une étude réalisée chez 161 patients traités par CTI, la MRD *FLT3-ITD* était positive après deux cycles chez 29% des patients seulement, et la positivité était associée de façon significative à un statut *NPM1* sauvage (Grob, Sanders, et al. 2022). Dans cette étude, la présence d'une MRD positive pour *FLT3-ITD* (à un seuil de $10^{-4}/10^{-5}$) était associée à une diminution de la SG et à une augmentation du risque de rechute en analyse multivariée (Grob, Sanders, et al. 2022). Par ailleurs, la VAF de la mutation *FLT3-ITD* au moment de la RC était corrélée au risque de rechute (Grob, Sanders, et al. 2022). Dans une large étude parue récemment incluant 537 patients, une MRD *FLT3-ITD* positive en RC1 pré-allogreffe (au seuil de 10^{-4}) était associée à un risque de rechute et de décès accrus (Dillon et al. 2024).

PARTIE III : INHIBITEURS DE *FLT3*

Généralités sur les inhibiteurs de FLT3

Parmi les iFLT3, on distingue les molécules de première génération (sorafénib, MIDO) et celles de seconde génération (quizartinib, crénolanib, giltéritinib). Les molécules de première génération sont peu spécifiques du récepteur FLT3 (Daver et al. 2019) et présentent une efficacité limitée en monothérapie ainsi qu'une toxicité assez importante (Borthakur et al. 2011; Fischer et al. 2010; Stone et al. 2005). Les inhibiteurs de seconde génération étant plus spécifiques et plus puissants (Daver et al. 2019), ils sont généralement efficaces en monothérapie (Perl et al. 2019). Ces agents, toutes générations confondues, sont des inhibiteurs compétitifs se liant au niveau de la poche ATP du TKD et leur mode d'interaction permet par ailleurs de distinguer les inhibiteurs de type I (se liant au récepteur placé en conformation active, tels que la MIDO, le crénolanib, et le giltéritinib) des inhibiteurs de type II (se liant au récepteur placé en conformation inactive, tels que le sorafénib, le ponatinib, et le quizartinib) (Ke et al. 2015). Les mutations de type ITD peuvent être ciblées par les deux types d'inhibiteurs alors que les mutations de type TKD ne doivent pas être ciblées par les inhibiteurs de type II car elles stabilisent la conformation active du récepteur FLT3 (Catherine C. Smith et al. 2012).

Les iFLT3 peuvent avoir des mécanismes d'action différents selon les patients : ils ont une activité cytotoxique marquée chez certains patients, tandis qu'ils provoquent une différenciation myéloïde des cellules leucémiques chez d'autres patients (McMahon, Canaani, et al. 2019; Sexauer et al. 2012). La différenciation pourrait être médiée par l'inactivation de EZH2 qui appartient au complexe répresseur PRC2 (Sung et al. 2024).

Les essais cliniques ayant conduit à intégrer les iFLT3 dans l'arsenal thérapeutique des LAM sont décrits dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Essais cliniques majeurs incluant des inhibiteurs de FLT3

DCI	Indication	Conception de l'étude	Schéma d'administration	Population	Nombre total de patients	Efficacité
Midostaurine	AMM dans les LAM nouvellement diagnostiquées en association à la CTI	RATIFY (Stone et al. 2017) -Phase III -Midostaurine vs Placebo 1:1 -Double aveugle	Par voie orale de J8 à J21 de chaque cycle de CTI + entretien 1 an	Patients âgés de 18 à 59 ans avec RA <i>FLT3</i> -ITD ou <i>FLT3</i> -TKD $\geq 0,05$	717	HR SSE 0,78 HR SG 0,78 SG à 4 ans : 51,4% vs 44,3% SSE à 4 ans : 28,2% vs 20,6%
Sorafénib	Entretien post-allogreffe (hors AMM)	SORMAIN (Burchert et al. 2020) -Phase II -Sorafénib vs Placebo 1:1 -Double aveugle	Par voie orale à partir de J60-J100 post-transplantation et pendant 2 ans	Patients âgés de 18 à 75 ans avec <i>FLT3</i> -ITD positif	83	HR SSR 0,39 SSR à 2 ans : 85% vs 53,3%
Sorafénib	Entretien post-allogreffe (hors AMM)	NCT02474290 (Xuan et al. 2020) -Phase III -Sorafénib vs Contrôle 1:1 -Open label	Par voie orale de J30-J60 à J180 post-transplantation	Patients âgés de 18 à 60 ans avec RA <i>FLT3</i> -ITD $\geq 0,03$	202	HR ICR 0,25 ICR à 1 an : 7% vs 24,5%
Giltéritinib	AMM à la maladie réfractaire ou en rechute en monothérapie	ADMIRAL (Perl et al. 2019) -Phase III -Giltéritinib vs chimiothérapie de rattrapage 2:1 -Open label	Par voie orale en cycles de 28 jours jusqu'à progression ou toxicité	Patients âgés de 18 à 85 ans avec RA <i>FLT3</i> -ITD ou <i>FLT3</i> -TKD $\geq 0,05$	371	RC 21,1% vs 10,5% HR SG 0,64 SG médiane 9,3 vs 5,6 mois
Quizartinib	AMM européenne dans les LAM nouvellement diagnostiquées en association à la CTI	QuANTUM-First (Erba et al. 2023) -Phase III -Quizartinib vs Placebo 1:1 -Double aveugle	Par voie orale de J8 à J21 de chaque cycle de CTI + entretien 3 ans	Patients âgés de 18 à 75 ans avec VAF <i>FLT3</i> -ITD $> 3\%$	539	HR SG 0,78 SG médiane 31,9 mois vs 15,1 mois

DCI : dénomination commune internationale, AMM : autorisation de mise sur le marché, HR : hazard ratio.

La midostaurine

La MIDO a initialement été développée comme inhibiteur de la protéine kinase C, sous le nom de CGP41251 puis PKC412 (Thavasu et al. 1999). Elle possède également une activité contre KIT, PDGFR et VEGFR-2 (Fabbro et al. 1999). Il s'agit du premier iFLT3 à avoir obtenu une autorisation de mise sur le marché (AMM) pour la prise en charge des LAM, suite à l'essai RATIFY ayant démontré son efficacité en association à la CTI dans les LAM nouvellement diagnostiquées (Stone et al. 2017). Elle a également été approuvée pour le traitement de la mastocytose avancée (Gotlib et al. 2016).

Le sorafénib

Le sorafénib est indiqué dans le traitement des cancers rénaux, hépatocellulaires et thyroïdiens (Brose et al. 2014; Escudier et al. 2007; Llovet et al. 2008). Il a initialement été découvert sous le nom de BAY 43-9006 pour sa capacité à inhiber les kinases Raf-1 et BRAF ainsi que les récepteurs VEGFRs (2 et 3), PDGFR- β , KIT et FLT3 (Wilhelm et al. 2004). Actuellement, il est utilisé en maintenance post-allogreffe hors AMM (Burchert et al. 2020; Xuan et al. 2020). Il ne permet pas d'améliorer significativement la SSE lorsqu'il est utilisé en association à la CTI puis en maintenance dans les LAM nouvellement diagnostiquées (Loo et al. 2023). Au-delà de son activité directe sur le récepteur FLT3, le sorafénib augmente la production d'IL-15 par les cellules leucémiques et stimule ainsi l'effet *Graft versus Leukemia* via l'activation des lymphocytes T CD8+ allogéniques (Mathew et al. 2018).

Le giltéritinib

Le giltéritinib est sélectif du récepteur FLT3 muté mais il possède également une activité envers KIT et AXL (L. Y. Lee et al. 2017; Mori et al. 2017). Il est indiqué en monothérapie chez les patients R/R à la suite de l'essai ADMIRAL qui a démontré son efficacité en termes de SG (Perl et al. 2019). Toutefois, seuls 6,2% des patients inclus dans cet essai avaient reçu de la MIDO en première ligne (Perl et al. 2019). Depuis, plusieurs études ont démontré que le giltéritinib est aussi efficace en monothérapie chez les patients ayant précédemment reçu un iFLT3 que chez les patients naïfs (Dumas et al. 2023; Numan et al. 2022; Perl et al. 2022). L'essai évaluant l'efficacité du giltéritinib en entretien post-allogreffe n'ayant pas atteint son objectif principal d'amélioration de la SSR, le giltéritinib n'aura pas d'AMM dans cette indication (M. J.

Levis et al. 2024). Toutefois, l'étude a révélé que les patients qui avaient une MRD *FLT3*-ITD positive bénéficiaient du traitement d'entretien en termes de SSR alors que les patients qui avaient une MRD négative n'en bénéficiaient pas (M. J. Levis et al. 2024). Une étude nommée « HOVON 156 AML » comparant l'efficacité du giltéritinib à celle de la MIDO en association à la CTI est actuellement en cours (NCT04027309).

Le quizartinib

Le quizartinib est un inhibiteur de *FLT3*, *KIT*, *PDGFRA*, *PDGFRB*, *RET* et *CSF1R* (Zarrinkar et al. 2009). Il a obtenu une AMM européenne pour le traitement des LAM nouvellement diagnostiquées, en association à la CTI (Erba et al. 2023). Dans l'étude de phase III « Quantum-R » réalisée chez des patients R/R, le quizartinib a permis d'améliorer la SG (Cortes et al. 2019).

Le crénolanib

Parmi les i*FLT3* prometteurs, on peut citer le crénolanib qui est un inhibiteur de type I et de seconde génération. L'administration de crénolanib en association à la CTI chez 44 patients mutés *FLT3* a permis d'obtenir un taux de réponse (RC/RCi) de 86% en première ligne (E. S. Wang et al. 2024). Un essai randomisé ayant pour objet de comparer le crénolanib à la MIDO, en association à la CTI, est en cours chez 510 patients (NCT03258931).

PARTIE IV : RÉSISTANCE AUX INHIBITEURS DE FLT3

Résistance liée aux caractéristiques des mutations FLT3-ITD

- Impact du site d'insertion sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3

Parmi les sujets randomisés dans l'étude RATIFY (évaluant l'apport de la MIDO en association à la CTI), les patients présentant uniquement des ITDs-TKD1 avaient une SG diminuée et une ICR augmentée par rapport à ceux présentant uniquement des ITDs-JMD ou les deux types d'ITDs (Rücker et al. 2022). Dans cette étude, seuls les patients présentant uniquement des ITDs-JMD bénéficiaient de l'ajout de la MIDO en termes de SG et d'ICR (Rücker et al. 2022). Les patients présentant uniquement des ITDs-JMD arboraient plus fréquemment des mutations *NPM1* que les autres patients (Rücker et al. 2022). Les patients doubles mutés ITD-JMD/*NPM1* étaient ceux qui bénéficiaient le plus de la MIDO (SG à 4 ans 65% vs 44%) (Rücker et al. 2022).

In vitro, les lignées mutées ITD-TKD1 ont démontré une résistance à l'apoptose sous traitement par MIDO, quizartinib et giltéritinib (Arreba-Tutusaus et al. 2016; Breitenbuecher et al. 2009; Massacci et al. 2023), probablement médiée par les protéines anti-apoptotiques MCL-1 et BCL2 (Breitenbuecher et al. 2009; Massacci et al. 2023). Il semblerait que les cellules mutées ITD-TKD1 exposées à la MIDO progressent dans le cycle cellulaire à l'aide de l'accumulation du complexe CDK1-Cycline B médiée par WEE1, ce qui les protège de l'apoptose (Massacci et al. 2023).

- Impact des autres caractéristiques des ITDs sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3

Une analyse post hoc de l'étude RATIFY a démontré le bénéfice de la MIDO au sein des trois catégories pronostiques de la classification ELN 2017 considérées indépendamment (K. Döhner et al. 2020). Ces catégories étaient définies par le RA de la mutation *FLT3*-ITD (au seuil de 0,5) et le statut *NPM1* (H. Döhner et al. 2016). Le RA de *FLT3*-ITD n'a pas d'impact sur le pronostic des patients traités par giltéritinib ou sorafénib (Burchert et al. 2020; Catherine C. Smith et al. 2022).

La mise en évidence d'un nombre élevé de clones *FLT3*-ITD par HTS a été corrélée à un taux de RC abaissé chez les patients randomisés dans l'étude RATIFY, dans les bras placebo et MIDO confondus (Rücker et al. 2022). Chez les patients portant uniquement des mutations ITD-JMD, la présence de plusieurs ITDs avait un

impact négatif sur la SG et l'ICR (Rücker et al. 2022). Toutefois, le nombre de clones *FLT3*-ITD n'a pas d'impact sur le pronostic des patients traités par giltéritinib (Catherine C. Smith et al. 2022).

Impact des co-mutations sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3

Une analyse post hoc étudiant l'influence des mutations additionnelles chez les patients randomisés dans l'essai RATIFY a révélé que les co-mutations *NPM1* et *WT1* avaient l'impact le plus important sur la SG, respectivement favorable et défavorable (Jahn et al. 2022). Concernant les patients doubles mutés *FLT3/WT1*, la présence d'une co-mutation *NPM1* ainsi que le traitement par MIDO permettaient d'améliorer la SG (Jahn et al. 2022). Les patients bénéficiant le plus du traitement par giltéritinib sont les triples mutés *DNMT3A/NPM1/FLT3* (Perl et al. 2019; Catherine C. Smith et al. 2022). Les patients mutés *NRAS*, *KRAS* ou *PTPN11* traités par giltéritinib ont une SG diminuée par rapport aux patients non mutés (4,9 mois vs 7,8 mois) (Numan et al. 2022).

Impact de la maladie résiduelle FLT3-ITD sur la réponse aux inhibiteurs de FLT3

Plusieurs études ont démontré l'apport pronostique du suivi de la MRD *FLT3*-ITD après traitement par iFLT3. Dans une étude de phase II nommée AMLSG16-10 évaluant l'efficacité de la MIDO en association à la CTI, les patients avec une MRD positive (au seuil de $10^{-4}/10^{-5}$) après 2 cycles de CTI ainsi que les patients positivisant leur MRD après la fin du traitement avaient un pronostic altéré en termes d'ICR et de SG (Rücker et al. 2024). Par ailleurs, l'absence de mutation *NPM1* était associée à une plus haute probabilité d'obtenir une MRD positive (Rücker et al. 2024). De même, dans l'essai randomisant le sorafénib vs placebo en association à la CTI, une MRD négative (< 0,001%) post-induction était associée à une amélioration de la SSE et de la SG à 2 ans dans les deux bras confondus (Loo et al. 2023). Dans le bras sorafénib, la SSR à 2 ans était plus élevée chez les patients ayant une MRD négative que chez les patients ayant une MRD positive (Loo et al. 2023). Dans l'essai randomisant le quizartinib vs placebo en association à la CTI, une MRD négative post-induction (< 0,01%) était associée à une amélioration de la SG dans les deux bras confondus (Erba et al. 2023). Dans l'essai CHRYSALIS, une MRD positive (> 0,01%) après traitement par giltéritinib était associée à une diminution de la SG (M. J. Levis et al. 2018).

La MRD *FLT3*-ITD évaluée à proximité d'une allogreffe de CSH possède un impact pronostique sur le devenir du patient après l'allogreffe. Dans une cohorte de 104 patients traités par CTI en association ou non avec des iFLT3, la SSR à 2 ans était de 78%, 32%, 40%, et 0% pour des niveaux de MRD pré-allogreffe respectivement < 0,001%, compris entre 0,001% à 0,1%, compris entre 0,1% à 1%, et $\geq 1\%$ (Loo et al. 2022). Dans l'étude randomisant le giltéritinib vs placebo en maintenance post-allogreffe, une MRD positive pré- ou post-allogreffe (au seuil de 10^{-6}) était associée à une diminution de la SSR et de la SG, dans les deux bras de traitement confondus (M. J. Levis et al. 2024).

Par ailleurs, la MRD *FLT3*-ITD peut permettre de prédire le bénéfice d'un traitement par iFLT3. Ainsi, l'étude MORPHO a démontré que les patients présentant une MRD *FLT3*-ITD positive pré- ou post-allogreffe (au seuil de 10^{-6}) tiraient profit du traitement d'entretien post-allogreffe par giltéritinib en termes de SSR alors que les patients qui avaient une MRD négative n'en bénéficiaient pas (M. J. Levis et al. 2024). L'obtention d'une MRD *FLT3*-ITD négative peut être utilisée comme témoin de l'efficacité des iFLT3 dans des essais cliniques, à l'instar de l'essai évaluant le crénolanib en première ligne en association à la CTI (E. S. Wang et al. 2024).

Résistance liée à l'acquisition de mutations

Les résistances présentées dans ce chapitre sont attribuées à des mutations émergentes, détectables au moment de la résistance au traitement (stade R/R), mais indétectables avant l'introduction du traitement (Tableau 3). Toutefois, il n'est pas toujours possible de déterminer si ces mutations émergentes sont réellement survenues après le traitement ou si elles préexistaient à la thérapie en quantité indétectable, comme suggéré par plusieurs études (Man et al. 2012; McMahon, Ferng, et al. 2019; Catherine C. Smith et al. 2012).

- Résistance liée à l'acquisition de mutations *on-target*

Les mécanismes de résistance diffèrent selon le type d'iFLT3. Comme développé dans le chapitre « Généralités sur les inhibiteurs de FLT3 », les inhibiteurs de type I se lient au récepteur FLT3 placé en conformation active tandis que les inhibiteurs de type II se lient au récepteur FLT3 placé en conformation inactive. Ainsi, les mutations touchant le résidu D835 sont fréquemment retrouvées à la rechute après traitement par inhibiteurs de type II car elles stabilisent la conformation active du récepteur (Alotaibi et al. 2021; Catherine C. Smith et al. 2017). Les traitements associés aux iFLT3 de type II affectent les mécanismes de résistance : seuls 6% (1/17) des patients traités par sorafénib ou quizartinib en association à une CTI rechutent avec une mutation D835 vs 45% (13/29) des patients traités pas sorafénib ou quizartinib en association à une thérapie non intensive (Alotaibi et al. 2021). La modélisation de différentes mutations touchant le codon D835 dans des cellules exprimant *FLT3*-ITD a démontré que toutes les substitutions ne conféraient pas le même degré de résistance aux inhibiteurs de type II : les variants D835Y/V/I/F étant les plus résistants tandis que les variants D835E/N sont les plus sensibles (C. C. Smith et al. 2015).

De plus, des mutations *gatekeeper* touchant le résidu F691 ont été retrouvées chez les patients résistants au quizartinib et au sorafénib (Baker et al. 2013; Catherine C. Smith et al. 2015, 2017). Ces mutations déstabilisent la conformation inactive de la boucle d'activation. Les mutations touchant le résidu D835 ainsi que les mutations *gatekeeper* peuvent co-exister chez un même patient (Catherine C. Smith et al. 2012).

Les mécanismes de résistance aux inhibiteurs de type I sont davantage hétérogènes selon la molécule considérée. L'étude de patients mutés *FLT3* traités par giltéritinib a révélé que 15% d'entre eux acquéraient des mutations non canoniques de *FLT3* à la rechute post-giltéritinib (6/40), à savoir 10% de mutations *gatekeeper* F691L, 2,5% de mutations E598D du JMD et 2,5% des deux types de mutations (Catherine C. Smith et al. 2022). Concernant les patients mutés *FLT3*-ITD traités par MIDO, 6% d'entre eux (3/54) acquéraient des mutations non canoniques de *FLT3* au stade R/R, touchant principalement le codon N676 (Schmalbrock et al. 2021).

Tableau 3 : Principales mutations impliquées dans la résistance aux inhibiteurs de FLT3

DCI	Type	Génération	Mutations de résistance <i>on-target</i>	Mutations de résistance <i>off-target</i>
Midostaurine	I	Première	N676K (Heidel et al. 2006)	Voie RAS/MAPK <i>WT1</i> <i>RUNX1</i> (Schmalbrock et al. 2021)
Giltéritinib	I	Seconde	F691L (Catherine C. Smith et al. 2022)	Voie RAS/MAPK <i>WT1</i> (Catherine C. Smith et al. 2022)
Sorafénib	II	Première	D835Y/H (Man et al. 2012) F691L (Baker et al. 2013)	<i>IDH1/IDH2</i> <i>TP53</i> <i>WT1</i>
Quizartinib	II	Seconde	D835Y/V/F F691L (Catherine C. Smith et al. 2012)	Voie RAS/MAPK (Alotaibi et al. 2021)

DCI : dénomination commune internationale, MAPK : MAP kinases.

- Résistance liée à l'acquisition de mutations *off-target*

Dans une cohorte de 46 patients traités par inhibiteurs de type II (incluant 39 patients traités par sorafénib et 7 patients traités par quizartinib), les mutations *off-target* les plus fréquemment acquises à la rechute touchaient les gènes *IDH1/IDH2*, *TP53* et *WT1*, qui étaient chacun impliqués dans 10% des cas (Alotaibi et al. 2021). Les mutations de la voie RAS étaient concernées dans seulement 6% des cas (Alotaibi et al. 2021).

Plus d'un tiers des patients mutés *FLT3* traités par giltéritinib acquièrent une mutation *NRAS*, *KRAS* ou *PTPN11* post-giltéritinib (McMahon, Ferng, et al. 2019; Catherine C. Smith et al. 2022). La majorité de ces patients acquièrent plusieurs mutations dans la voie RAS/MAP kinases (MAPK) (McMahon, Ferng, et al. 2019; Catherine C. Smith et al. 2022). Par ailleurs, 7,5% des patients traités par giltéritinib

présentent une nouvelle mutation de *WT1* à la rechute post-giltéritinib (3/40) (Catherine C. Smith et al. 2022). Enfin, 55,2% des patients (16/29) acquièrent de nouvelles anomalies cytogénétiques après traitement par giltéritinib, parmi lesquels 12,5% gagnent des fusions *BCR-ABL* (2/16) (McMahon, Ferng, et al. 2019). Dans une étude réalisée chez 54 patients traités par MIDO et CTI, les mutations émergeant le plus fréquemment au stade R/R touchaient les gènes *WT1* (6%), *RUNX1* (6%) et la voie RAS/MAPK (9%) (Schmalbrock et al. 2021).

Des études *in vitro* ont suggéré que la dose de giltéritinib avait un impact sur la nature des mutations de résistance. Il semblerait que l'exposition à de faibles doses de traitement privilégie la sélection de clones portant la mutation *gatekeeper* F691L tandis que l'exposition à de fortes doses privilégie la sélection de clones mutés *NRAS* (McMahon, Ferng, et al. 2019).

En conclusion, la majorité des patients traités par iFLT3 présentent au moins une mutation émergente à la rechute (55% [37/67]), qu'elle soit *on-target* ou *off-target* (Alotaibi et al. 2021). Les patients traités par inhibiteurs de type II sont davantage concernés que les patients traités par inhibiteurs de type I (65% [30/46] vs 33% [7/21]) (Alotaibi et al. 2021).

Évolution des mutations *FLT3-ITD* sous inhibiteurs de *FLT3*

Parmi les patients traités par CTI et MIDO, 54% (29/54) des sujets conservent un statut *FLT3-ITD* positif par AF au stade R/R (Schmalbrock et al. 2021). S'agissant des patients R/R traités par giltéritinib, 71,4% (10/14) à 77,1% (27/35) d'entre eux présentent toujours une mutation *FLT3-ITD* à la rechute post-giltéritinib (Dumas et al. 2023; Catherine C. Smith et al. 2022). Dans une étude associant le sorafénib à la CTI en première ligne, le statut *FLT3-ITD* était toujours positif à la rechute chez 53% des patients (10/19), lorsqu'il était évalué par AF. En évaluant le statut *FLT3-ITD* par HTS avec une limite de détection à 10^{-5} , la proportion de patients positifs à la rechute s'élevait à 71% (10/14) (Loo et al. 2023). Dans une étude réalisée chez 46 patients traités par sorafénib ou quizartinib, 73% des sujets conservaient un statut *FLT3-ITD* positif à la rechute en AF (Alotaibi et al. 2021). Tout iFLT3 confondus, les patients qui perdent leurs mutations *FLT3* à la rechute post-iFLT3 ont une SG améliorée après la rechute par comparaison aux patients qui conservent un statut *FLT3* muté (Alotaibi et al. 2021).

Autres mécanismes de résistance

- Rôle du micro-environnement

Certains facteurs solubles sous-tendent la résistance des cellules leucémiques aux iFLT3. Tout d'abord, la persistance initiale de cellules cancéreuses sous iFLT3 dépend de facteurs de survie libérés dans le microenvironnement, tels que FGF2 et FLT3-ligand (Joshi et al. 2021; Traer et al. 2016). Le FLT3-ligand atténue l'efficacité des iFLT3 (MIDO, sorafénib, quizartinib) tandis que le FGF2 active FGFR1 et des effecteurs de la voie des MAPK en aval (Sato et al. 2011; Traer et al. 2016). La résistance médiée par ces facteurs de croissance pourrait être liée à l'activation de CDC7/AURKB (Joshi et al. 2021). Par ailleurs, les couples ligand/récepteur CD62E/E-sélectine et CXCL12/CXCR4 jouent un rôle majeur dans la migration des CSL vers la MO (Sipkins et al. 2005). En inhibant ERK, les iFLT3 tels que le quizartinib et le sorafénib provoquent une surexpression de CXCR4 et de l'E-sélectine, favorisant la résistance des cellules cancéreuses (Jia et al. 2023). La résistance au traitement dépendante de CXCL12 est médiée par la protéine p38 (Anderson et al. 2023).

De plus, l'enzyme CYP3A4 joue un rôle important dans le métabolisme de plusieurs iFLT3 tels que le sorafénib, le quizartinib et le giltéritinib (Chang et al. 2019). Elle est sécrétée par le micro-environnement médullaire et contribue à la résistance des cellules leucémiques dans la MO (Chang et al. 2019).

L'hypoxie est également impliquée dans la résistance aux iFLT3. Le sorafénib augmente l'hypoxie médullaire car il possède une action anti-angiogénique médiée par l'inhibition de VEGF. L'augmentation de l'hypoxie médullaire contribue à une hausse de l'expression de BMX et permet ainsi de restaurer la phosphorylation de STAT5 et AKT (Oosterwijk et al. 2018).

- Mécanismes anti-apoptotiques

Certaines cellules leucémiques exposées aux iFLT3 maintiennent une expression importante des protéines anti-apoptotiques de la famille BCL2 et peuvent ainsi survivre sous traitement (Kohl et al. 2007).

- Activation de kinases

Les cellules primaires résistantes aux iFLT3 *ex vivo* présentent une hyperactivation basale de la voie des MAPK, par rapport aux cellules primaires sensibles (Malani et al. 2022). De plus, la protéine ERK est réactivée dans les heures suivant le traitement par iFLT3, probablement car les iFLT3 entraînent une diminution du rétrocontrôle négatif de la voie RAS et potentialisent ainsi la signalisation ligand-dépendante via les récepteurs FLT3 sauvages exprimés à la surface cellulaire (Bruner et al. 2017). Par ailleurs, même si les récepteurs FLT3 sont inhibés de façon adéquate par les iFLT3, d'autres kinases peuvent prendre le relai et conduire à l'échappement au traitement. L'activation du récepteur tyrosine kinase AXL est impliquée dans la résistance à la MIDO et au quizartinib (Park et al. 2015). Par ailleurs, l'activation de SYK potentialise la signalisation du récepteur muté *FLT3-ITD* et conduit à une résistance au quizartinib (Puissant et al. 2014).

- Activation de facteurs de transcription

Dans les LAM présentant une résistance primaire aux iFLT3 de type I et II, on retrouve une hyperexpression du facteur de transcription CEBPA (H. Wang et al. 2023). Par ailleurs, la résistance aux iFLT3 pourrait être liée à l'inactivation de p53 par HDAC8, dont l'activation est médiée par les facteurs de transcription FOXO1 et FOXO3 (Long et al. 2020).

- Modification du métabolisme cellulaire

L'exposition au quizartinib entraîne une surexpression de PDP1 qui active le *pyruvate dehydrogenase complex*, permettant de détourner le pyruvate vers le cycle de Krebs. Ce mécanisme permet d'augmenter le métabolisme oxydatif du glucose et contribue à la résistance au traitement (Alshamleh et al. 2023). Par ailleurs, bien que les iFLT3 entraînent une diminution globale de la traduction via l'inactivation de mTOR (X. M. Ma et Blenis 2009), ils augmentent la traduction des protéines liées à l'autophagie (Koschade et al. 2022). L'inhibition pharmacologique ou génétique de l'autophagie améliore la sensibilité aux iFLT3, dévoilant le rôle de ce phénomène dans la résistance aux iFLT3 (Koschade et al. 2022). Enfin, la résistance au sorafénib pourrait être liée à l'activation d'un échangeur ionique Na⁺/H⁺ nommé NHE1 (Man et al. 2014).

Nouvelles associations permettant de contourner les mécanismes de résistance

L'identification de nombreux agents impliqués dans la résistance aux iFLT3 a conduit à évaluer l'efficacité d'inhibiteurs spécifiques de ces agents en association avec des iFLT3. Des inhibiteurs de CXCL12 (Anderson et al. 2023), p38 (Anderson et al. 2023), CXCR4/E-sélectine (Jia et al. 2023), CYP3A4 (clarithromycine) (Chang et al. 2019), SYK (Puissant et al. 2014), HDAC8 (Long et al. 2020) ou encore de l'autophagie (Koschade et al. 2022) ont démontré leur efficacité *in vitro* et/ou *in vivo* dans des modèles murins, en association avec des iFLT3. Une étude de phase I évaluant la combinaison du sorafénib avec le G-CSF et le plerixafor (un inhibiteur de CXCR4) chez 28 patients en rechute mutés *FLT3*-ITD a permis d'obtenir un taux de réponse de 36% (RC/RCi/rémission partielle [RP]/rémission complète avec récupération plaquettaire incomplète [RCp]) (Borthakur et al. 2020).

La combinaison d'iFLT3 avec des agents pro-apoptotiques, tels que le vénétoclax, est la plus prometteuse et pourrait modifier les standards de traitement dans les années à venir. Dans un premier temps, des études précliniques conduites sur des lignées et des cellules primaires mutées *FLT3*-ITD, ainsi que des souris xénogreffées avec des LAM *FLT3*-ITD, ont démontré une synergie entre les iFLT3 et le vénétoclax, médiée par l'inhibition de MCL-1 et Bcl-xL (J. Ma et al. 2019; Singh Mali et al. 2021). Par la suite, une étude de phase Ib (NCT03625505) a été réalisée chez 54 patients R/R afin d'évaluer la réponse à l'association vénétoclax/giltéritinib. Le taux de réponse (RC/RCi/*Morphologic leukemia-free State* [MLFS]/RCp) s'élevait à 74,5% chez les patients mutés *FLT3* (38/51), avec une survie médiane de 10 mois et une durée médiane de réponse de 5,4 mois (Daver et al. 2021). L'association vénétoclax/giltéritinib serait également efficace dans les LAM *FLT3*-sauvages (Janssen et al. 2022).

L'association d'iFLT3 avec des agents déméthylants est également prometteuse. La combinaison de 5-azacitidine et de sorafénib a donné des résultats encourageants dans une étude de phase II menée sur 43 patients (Ravandi et al. 2013). Par la suite, une étude de phase II a évalué l'association décitabine /vénétoclax/iFLT3 chez 25 patients atteints de LAM mutées *FLT3*, nouvellement diagnostiqués ou R/R (Maiti et al. 2021). Le choix de l'iFLT3 était à la discrétion du clinicien. Les résultats étaient très encourageants : chez les patients nouvellement

diagnostiqués, le taux de RC composite (RC/RCi/RCp) s'élevait à 92%. De plus, les patients répondeurs présentaient une MRD négative dans 56% des cas par CMF, et dans 91% des cas par HTS. Chez les patients R/R, le taux de RC composite s'élevait à 62% et les patients répondeurs présentaient une MRD négative dans 63% des cas par CMF, et dans la totalité des cas par HTS (Maiti et al. 2021). Plus tard, une étude de phase I/II a évalué l'association décitabine/vénétoclax/quizartinib chez 10 patients nouvellement diagnostiqués et 40 patients R/R, présentant tous une LAM mutée *FLT3*-ITD (Yilmaz et al. 2023). Chez les patients nouvellement diagnostiqués, le taux de réponse (RC/RCi/MLFS) était de 100%. Chez les patients R/R, le taux de réponse était de 68% et la MRD *FLT3*-ITD était négative par HTS dans 36% des cas (8/22) (Yilmaz et al. 2023). Enfin, une étude de phase I/II publiée en 2024 a évalué l'association azacitidine/vénétoclax/giltéritinib chez 30 patients nouvellement diagnostiqués et 22 patients R/R, présentant tous une LAM mutée *FLT3*-ITD et/ou *FLT3*-TKD (Short et al. 2024). Chez les patients nouvellement diagnostiqués, le taux de RC/RCi était de 96%, et 65% des patients évaluables présentaient une MRD *FLT3*-ITD négative par HTS. Chez les patients R/R, le taux de RC/RCi était de 27% (Short et al. 2024).

OBJECTIFS

Au diagnostic de LAM, les approches de biologie moléculaire permettent de rechercher un grand nombre de mutations récurrentes ayant un impact diagnostique, pronostique et/ou thérapeutique. Parmi ces anomalies, les plus fréquentes sont les mutations de *NPM1* et les mutations *FLT3*-ITD.

Les LAM mutées *NPM1* ont un pronostic globalement favorable. Toutefois, elles peuvent présenter des co-mutations et des phénotypes très hétérogènes qui sont susceptibles d'influencer le pronostic ainsi que la réponse au traitement. Le premier objectif de ce travail fut d'explorer le lien entre les mutations somatiques et la différenciation phénotypique à l'échelle unicellulaire dans les LAM mutées *NPM1*.

Bien que les mutations *FLT3*-ITD soient historiquement associées à un mauvais pronostic, de nombreux travaux ont révélé que celui-ci pouvait être pondéré en fonction de certaines caractéristiques telles que le RA, le site d'insertion et la longueur des mutations ou encore le nombre de clones *FLT3*-ITD. L'utilisation de la MIDO en première ligne depuis 2017 a permis d'améliorer la survie des patients mutés *FLT3*. Cependant, les taux de RC obtenus demeurent proches de 60-70% et les rechutes surviennent encore dans plus de 40% des cas. Nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires sous-tendant l'échec d'induction et/ou la rechute chez les patients mutés *FLT3*. En particulier, nous avons cherché à déterminer si les caractéristiques initiales des mutations *FLT3*-ITD modulaient les mécanismes de résistance au traitement.

RÉSULTATS

Premier article : Étude de la différenciation hématopoïétique à l'échelle unicellulaire dans les leucémies aiguës myéloïdes mutées *NPM1*

Résumé

Les LAM mutées *NPM1* partagent des caractéristiques clinico-biologiques communes. Toutefois, elles présentent des co-mutations et des phénotypes très hétérogènes, susceptibles d'influencer le pronostic de la maladie ainsi que la réponse au traitement. L'étude de la population leucémique globale n'a pas révélé d'association forte entre l'immunophénotype et le génotype chez les patients mutés *NPM1*. Afin d'évaluer si l'hétérogénéité intra-leucémique pourrait masquer des associations importantes, nous avons utilisé une technologie de séquençage unicellulaire multi-omique (Tapestri, Mission Bio®) permettant d'explorer le lien entre les mutations somatiques et la différenciation phénotypique à l'échelle unicellulaire chez 11 échantillons diagnostiques de LAM mutées *NPM1*. Le développement d'un outil de correction du génotype fondé sur la phylogénie a permis d'augmenter considérablement le nombre de cellules exploitables. La présence d'une hétérogénéité génétique intra-leucémique a été constatée chez tous les patients, décrivant une architecture branchée pour 9 d'entre eux. Deux groupes de LAM mutées *NPM1* ont pu être distingués, l'un présentant un phénotype typique des progéniteurs et l'autre un phénotype monocyttaire. Des associations spécifiques entre certaines mutations somatiques et l'expression de protéines de surface ont été mises en évidence. Ces associations étaient propres à chaque patient : elles n'étaient pas partagées par l'ensemble de la cohorte. L'étude d'un cas illustratif a démontré que les corrélations génotype-phénotype établies par l'analyse unicellulaire permettaient l'enrichissement en clones génétiques spécifiques par FACS (*fluorescence-activated cell sorting*).

Manuscript : Hematopoietic Differentiation at Single-Cell Resolution in NPM1-Mutated AML

Auteurs : Matthieu Duchmann*, Romane Joudinaud*, Augustin Boudry, Justine Pasanisi, Giuseppe Di Feo, Rathana Kim, Maxime Bucci, Clémentine Chauvel, Laureen Chat, Lise Larcher, Kim Pacchiardi, Stéphanie Mathis, Emmanuel Raffoux, Lionel Adès, Céline Berthon, Emmanuelle Clappier, Christophe Roumier, Alexandre Puissant, Claude Preudhomme, Nicolas Duployez*, et Raphaël Itzykson* (*equally contributors)

Stade : publié en 2022

Revue : *Blood Cancer Journal*

CORRESPONDENCE OPEN

Hematopoietic differentiation at single-cell resolution in *NPM1*-mutated AML

© The Author(s) 2022

Blood Cancer Journal (2022)12:136; <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00734-1>

Dear Editor,

Recent data suggest that *NPM1*-mutated AMLs are heterogeneous in terms of co-mutations and expression of transcriptional programs and surface proteins [1, 2]. Such heterogeneity may reflect a variable differentiation blockade of leukemic cells. Indeed, blasts in some *NPM1*-mutated AMLs may display an immature progenitor morphology, immunophenotype, and transcriptional program, or have a more mature monocytic and/or dendritic differentiation in other patients [1–3]. These differences can be clinically important, as immature blasts might have higher stemness capacity, a feature associated with poorer outcomes in AML [4]. Conversely, blasts with monocytic differentiation may have immunosuppressive capacities, and relative BCL-2 independence [5]. Previous reports based on bulk sequencing revealed only weak associations between *NPM1/FLT3-ITD* genotype and immature phenotype and between *NPM1/FLT3-TKD* or *NPM1/RAS* genotypes and monocytic/dendritic differentiation [2, 3]. Novel technologies allow simultaneous genotyping and analysis of surface protein expression at single-cell resolution and may help to resolve the interconnection between genotype and cell differentiation in leukemia [6, 7]. We used a droplet-based multi-omics single-cell platform to characterize the genetic clonal architecture in eleven *NPM1*-mutated AML diagnostic samples and investigate the relationship between co-mutations and phenotypic hematologic differentiation at the single-cell level.

We retrospectively included viably frozen samples from 11 patients with *NPM1*-mutated AMLs diagnosed in Saint Louis or Lille university hospitals banked after informed consent between May 2016 and July 2019. The project was approved by INSERM IRB (CEEI-20-274). Samples were selected if they had an *NPM1* mutation and at least two additional mutations covered by the Mission Bio AML amplicons panel. Molecular information was available from routine bulk high-throughput sequencing (HTS) using previously published custom capture panels at Saint Louis ($n = 8$, Table S1) or Lille ($n = 3$, Table S2) university hospitals [8]. Cryopreserved mononucleated cells were thawed and live cells were stained using a 15 antibodies derived tags (ADT) panel (Fig. 1A and Table S3). Cells were processed according to the manufacturer protocol, using Mission Bio 20-genes AML amplicon panel (Table S4). Libraries were sequenced on a Novaseq 6000 (Illumina). Fastq files were analyzed using Mission Bio Tapestry Pipeline V2 (Fig. 1B). Filt3R was used for *FLT3-ITD* detection. sc-DNAseq analysis was focused on variants also detected on bulk HTS, using the

TapestryR package. A genotype was considered informative if the single-cell sequencing depth (scDP) was $\geq 10\times$. An allele was retained if supported by at least 3 reads, and a single-cell variant allelic frequency (scVAF) $\geq 15\%$ for an scDP between 20–100 \times or $\geq 10\%$ for an scDP >100 \times , or considered non-informative otherwise. infSCITE was used to infer phylogenetic trees from mutation matrices as published [7]. Inferred clonal architectures (Fig. S1A) were used to correct raw cell genotypes. Cells with insufficient genotype information or with a genotype violating the clonal hierarchy owing to cell doublets or sequencing errors were excluded for downstream analyses (Fig. S1B). Protein data was analyzed using Seurat package V4.0 [9]. ADT counts were transformed using centered log-ratio transformation and differential expression was tested using ALDEX2 [10]. Bulk and single-cell DNA-Seq will be available at European Genome-phenome Archive (EGA) under accession code EGAS00001006565. Other data will be available upon reasonable request to the principal investigator.

Characteristics of the 11 *NPM1*-mutated AML diagnostic samples are summarized in Table S5. A total of 61 mutations were detected by bulk HTS (Tables S5, 6), with a median number of five mutations per patient [range: 3–8]. The most frequently mutated genes were *FLT3* (9/11, 82%), *NRAS* (5/11, 45%), *DNMT3A* (4/11, 36%), *IDH2* (4/11, 36%), and *PTPN11* (4/11, 36%). Most patients (91%) had multiple signaling mutations, with a median number of three per patient [range: 1–5].

To correct the noise of sc-DNAseq data on ill-covered genomic regions, we developed a framework to perform phylogeny-driven genotype correction (Fig. S1A, B). This strategy increased the number of cells with complete genotype information from 34,722 to 52,103 single cells (Fig. 1C and S1C). The median number of cells per sample was 5123 [range: 2301–7127]. Most somatic mutations identified by bulk HTS (55/61, 90%) were detected by sc-DNAseq. Three patients had one mutation not covered by the sc-DNAseq panel, and one patient had two. These mutations affected *SRSF2* ($n = 2$), *RAD21* ($n = 1$), *SMC3* ($n = 1$), and *NFE2* genes ($n = 1$, Tables S5, 6). One covered *FLT3-ITD* was not detected by sc-DNAseq owing to its long size (102 bp). Our genotype correction strategy did not bias the data as pseudo-bulk VAF from sc-DNAseq were highly correlated to bulk HTS VAF (Spearman $\rho = 0.95$, $p < 10^{-16}$, Fig. S2A). Two patients had one homozygous mutation, and both bulk HTS and sc-DNAseq showed a copy-neutral loss of heterozygosity of *FLT3-ITD* in PH01 (Fig. S2B) and a deletion of the wild-type allele of *TET2* in PH05 (Fig. S2C). In keeping with previous findings, intra-leukemic genetic heterogeneity was detectable in all cases (Fig. S2D) [6, 7]. Clonal branching was detectable in nine patients. One additional patient (PH12) would presumably also have had a parallel evolution of the two *FLT3-ITD* clones if both had been detected. All cases of branched architectures involved

Received: 12 August 2022 Revised: 5 September 2022 Accepted: 7 September 2022
Published online: 23 September 2022

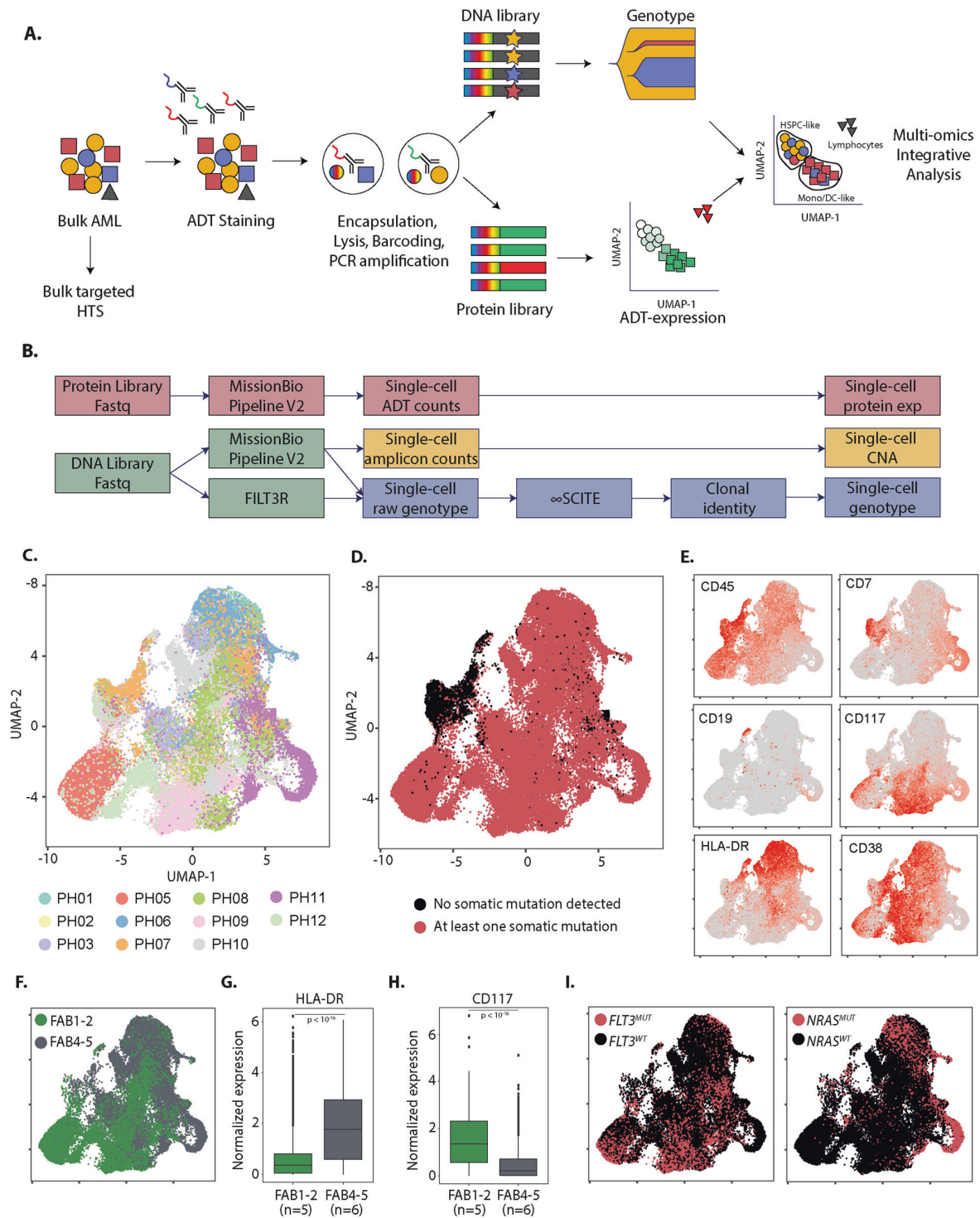


Fig. 1 Single-cell multi-omics workflow and application to 11 *NPM1*-mutated AMLs. **A** Overview of the single-cell multi-omics platform. AML acute myeloid leukemia; HTS high-throughput sequencing; ADT antibody-derived tags. **B** Overview of the bioinformatics analyses performed on sequencing data. CAN copy number alterations. **C** Uniform manifold approximation and projection (UMAP) plot of ADT-seq expression of the 52,103 single-cells from the 11 AML samples. Cells are colored by sample. **D** UMAP plot of ADT-seq expression of the 52,103 single-cells from the 11 AML samples. Cells are colored according to the presence (red) or absence (black) of at least one somatic mutation. **E** UMAP plot of ADT-seq expression of the 52,103 single-cells from the 11 AML samples. Cells are colored according to specific ADT expressions. **F** UMAP plot of ADT-seq expression of the mutated cells from the 11 AML samples. Cells are colored according to the FAB classification at diagnosis: FAB1-2 (green) or FAB4-5 (gray). **G** Expression of HLA-DR ADT by mutated cells according to the FAB classification at diagnosis. **H** Expression of CD117 ADT by mutated cells according to the FAB classification at diagnosis. **I** UMAP plot of ADT-seq expression of the mutated cells from the 11 AML samples. Cells are colored according to the presence (red) or absence (black) of *FLT3* (left) or *NRAS* (right) mutations. *P* values from *t*-tests were corrected using the Benjamini & Hochberg method.

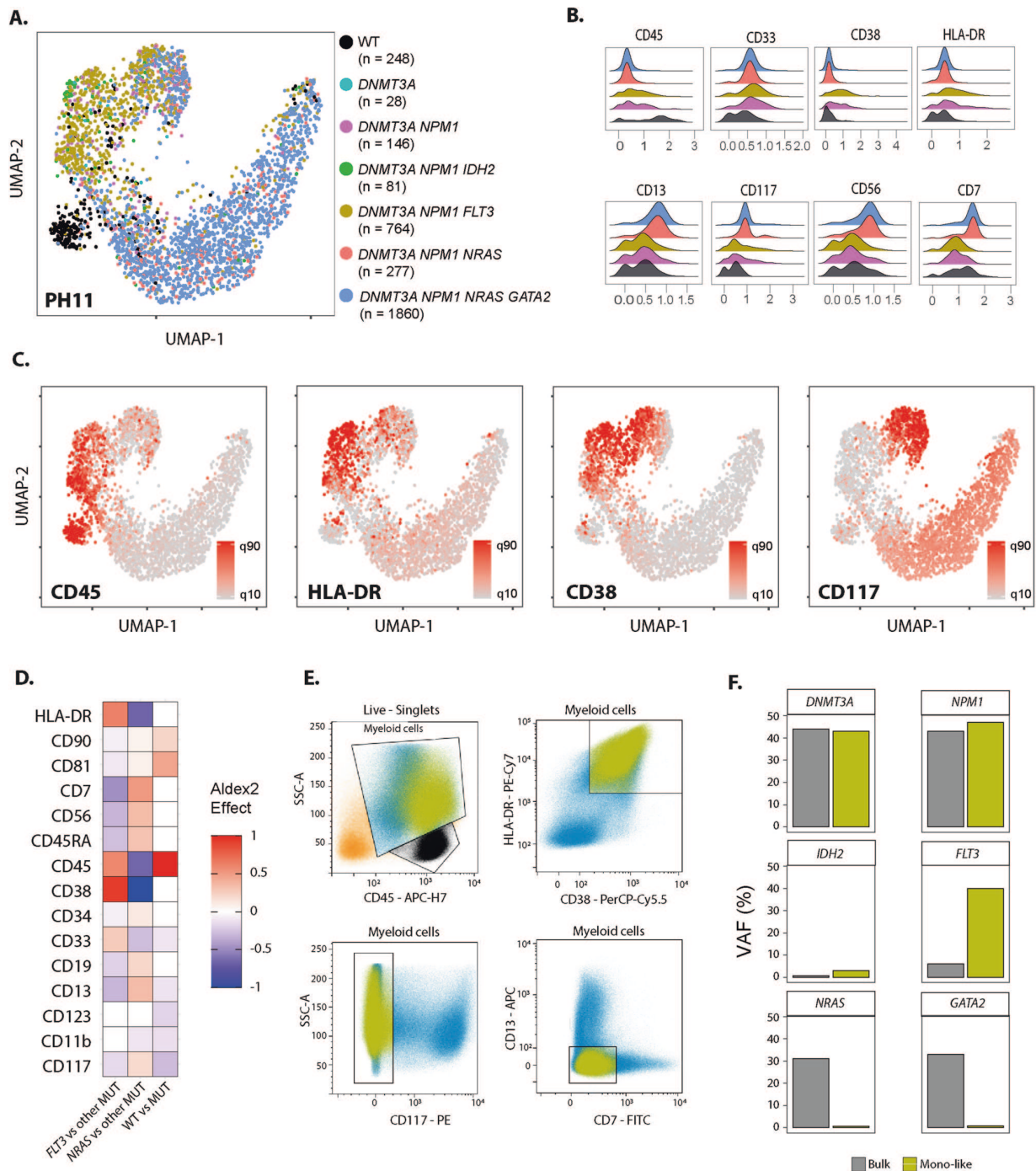


Fig. 2 Clone-specific immunophenotypes in an *NPM1*-mutated AML. **A** UMAP plot of ADT-seq expression of the 3,404 single-cells from sample PH11. Cells are colored according to the genotype of the cell from the PH11 sample (only genotypes with >100 cells are displayed). **B** Ridge plots showing CLR-transformed expression of eight ADT according to the genotype of the cell from the PH11 sample (only genotypes with >100 cells are displayed). **C** UMAP of ADT-seq expression of the 3404 single-cells from sample PH11. Cells are colored according to the CLR-transformed expression of four ADT markers. **D** Differentially expressed ADT between *FLT3*-mutated and other cells harboring at least one mutation (left), *NRAS*-mutated and other cells harboring at least one mutation (middle), cells with at least one mutation, and cells without any mutation (right). The size of the difference is evaluated by the Effect parameter of Aldex2, which is displayed only for differentially expressed ADT (adjusted *p* value <0.05). **E** Gating strategy for FACS sorting monocyte-like leukemic cells (Boolean: Myeloid cells and HLA-DR⁺ and CD38⁺ and CD117⁻ and CD7⁻ and CD13⁻). Lymphocytes are colored black, monocyte-like cells are colored yellow, and other leukemic cells are colored blue. **F** Variant allelic fractions of the specified mutations on leukemic bulk (gray) and the sorted monocyte-like population (yellow).

co-occurring signaling mutations, as previously reported in other AML subtypes [6, 7].

Upon dimensional reduction on ADT-seq data across all samples, some degree of patient-centric clustering was noticeable, owing to specific combinations of surface markers (Fig. 1C). As expected in *NPM1*-mutated AMLs, leukemic cells did not express CD34 [3]. ADT-seq was able to discriminate normal lymphoid cells from all patients, as they did not harbor somatic mutation (Fig. 1D) and expressed high levels of CD45 with either CD7 or CD19 expression (Fig. 1E). As previously reported on flow cytometry analyses [1–3], ADT-seq was able to discriminate the 6 patients with a predominant morphologic myelomonocytic differentiation (FAB4-5) from the 5 patients with poorly differentiated cytology (FAB1-2, Fig. 1F). Leukemic cells from FAB4-5 patients had a higher expression of HLA-DR ($p < 10^{-16}$, Fig. 1G) and a lower expression of CD117 ($p < 10^{-16}$, Fig. 1H). Larger ADT panels, the addition of UMIs [10], and control isotypes will likely further improve the resolution of ADT-seq in single-cell multi-omics platforms.

We identified various degrees of intra-leukemic immunophenotype heterogeneity, as previously suggested [3]. Specific associations between surface proteins expression and somatic mutations were patient-specific (Fig. S3) rather than shared across patients (Fig. 1I), and larger studies will be requested to analyze cohort-wide genotype-phenotype correlations. Patient PH11 is shown as an illustrative case (Fig. 2). Unsupervised clustering of single cells based on ADT-seq revealed a marked clustering of cells harboring the *FLT3* p.A680V mutation (Fig. 2A). *FLT3*-mutated cells had higher expression of CD45, CD38, and HLA-DR and lower expression of CD117 compared to other leukemic cells (Fig. 2B–D), a phenotype reminiscent of monocytic differentiation. Conventional multiparametric flow cytometry confirmed the presence of distinct leukemic cell subpopulations. Bulk HTS of the FACS-sorted monocyte-like subpopulation (intermediate SSC, high CD45, HLA-DR+, CD38+, CD117–, CD13–, CD7–, Fig. 2E) confirmed the enrichment for *FLT3*-mutated cells (VAF of 40 vs 6% in bulk) at the expense of the *NRAS* and *GATA2* mutated clones (Fig. 2F and Table S7). This result comforts previous studies showing genetic differences between phenotypically distinct leukemic cell populations in individual patients [11]. To our knowledge, this is the first validation of ADT-seq results on sorted subpopulations defined by a specific combination of multiple cell-surface markers. Further validation could be conducted, e.g., using genetically engineered cell lines. The development of ADT panels larger than the first-generation 15-protein panel used in our study may alleviate the limitation of the compositional structure of small ADT panels. Further technological improvements, such as the addition of UMIs in ADT sequencing to remove PCR duplicates [10] and spiking of control isotypes to estimate unspecific binding and define positivity thresholds, will likely further improve the resolution of surface protein expression analysis in single-cell multi-omics platforms. Recent clonal phylogenies inference and single-cell protein expression normalization tools will also need to be benchmarked across various single-cell proteogenomic datasets [12]. Clone-specific immunophenotypes might allow the study of clone-specific drug sensitivity in phenotype-based ex vivo drug screening experiments [13–15]. Our study paves the way for single-cell multi-omics deciphering of the genetic and non-genetic contributions to differentiation blockade in AML and provides a proof of concept for precision oncology instructed by single-cell resolution of the genetic and phenotypic diversity of leukemic cells.

Matthieu Duchmann^{1,6}, Romane Joudinaud^{1,2,6}, Augustin Boudry², Justine Pasanisi¹, Giuseppe Di Feo¹, Rathana Kim^{1,3}, Maxime Buccicci², Clémentine Chauvel³, Laureen Chat¹, Lise Larcher³, Kim Pacchiardi¹, Stéphanie Mathis³, Emmanuel Raffoux⁴, Lionel Adès⁴, Céline Berthon⁵, Emmanuelle Clappier^{1,3}, Christophe Roumier², Alexandre Puissant¹, Claude Preudhomme², Nicolas Duployez^{2,7} and Raphaël Itzykson^{1,4,7}✉

¹Université Paris Cité, Unité 944/7212-GenCellDi, INSERM and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Paris, France. ²Hematology Laboratory, Unité 1277-Cancer Heterogeneity Plasticity and Resistance to Therapies (CANThER), Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille, University of Lille, Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), Lille, France. ³Hematology Laboratory, Saint Louis Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris (AP-HP), Paris, France. ⁴Hematology Department, Saint Louis Hospital, AP-HP, Paris, France. ⁵Hematology Department, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille, University of Lille, Lille, France. ⁶These authors contributed equally: Matthieu Duchmann, Romane Joudinaud. ⁷These authors jointly supervised this work: Nicolas Duployez, Raphaël Itzykson. ✉email: raphael.itzykson@aphp.fr

DATA AVAILABILITY

Bulk and single-cell DNA-Seq will be available at European Genome-phenome Archive (EGA) under accession code EGAS00001006565. Other data will be available upon reasonable request to the principal investigator.

REFERENCES

- Mason EF, Hasserjian RP, Aggarwal N, Seegmiller AC, Pozdnyakova O. Blast phenotype and comutations in acute myeloid leukemia with mutated *NPM1* influence disease biology and outcome. *Blood Adv.* 2019;3:322–32.
- Mer AS, Heath EM, Madani Tonekaboni SA, Dogan-Artun N, Nair SK, Murison A, et al. Biological and therapeutic implications of a unique subtype of *NPM1* mutated AML. *Nat Commun.* 2021;12:1054.
- van Galen P, Hovestadt V, Wadsworth II MH, Hughes TK, Griffin GK, Battaglia S, et al. Single-cell RNA-seq reveals AML hierarchies relevant to disease progression and immunity. *Cell.* 2019;176:1265–1281 e1224.
- Ng SW, Mitchell A, Kennedy JA, Chen WC, McLeod J, Ibrahimova N, et al. A 17-gene stemness score for rapid determination of risk in acute leukaemia. *Nature.* 2016;540:433–7.
- Pei S, Pollyea DA, Gustafson A, Stevens BM, Minhajuddin M, Fu R, et al. Monocytic subclones confer resistance to venetoclax-based therapy in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Discov.* 2020;10:536–51.
- Miles LA, Bowman RL, Merlinsky TR, Csete IS, Ooi AT, Durruthy-Durruthy R, et al. Single-cell mutation analysis of clonal evolution in myeloid malignancies. *Nature.* 2020;587:477–82.
- Morita K, Wang F, Jahn K, Hu T, Tanaka T, Sasaki Y, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun.* 2020;11:5327.
- Cerrano M, Duchmann M, Kim R, Vasseur L, Hirsch P, Thomas X, et al. Clonal dominance is an adverse prognostic factor in acute myeloid leukemia treated with intensive chemotherapy. *Leukemia* 2020;35:712–23.
- Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM 3rd, Zheng S, Butler A, et al. Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell.* 2021;184:3573–3587 e3529.
- Stoeckius M, Hafemeister C, Stephenson W, Houck-Loomis B, Chattopadhyay PK, Swerdlow H, et al. Simultaneous epitope and transcriptome measurement in single cells. *Nat Methods.* 2017;14:865–8.
- de Boer B, Prick J, Pruis MG, Keane P, Imperato MR, Jaques J, et al. Prospective isolation and characterization of genetically and functionally distinct AML subclones. *Cancer Cell.* 2018;34:674–89 e678.
- Kozlov A, Alves JM, Stamatakis A, Posada D. CellPhy: accurate and fast probabilistic inference of single-cell phylogenies from scDNA-seq data. *Genome Biol.* 2022;23:37.
- Kuusanmaki H, Leppä AM, Polonen P, Kontro M, Dufva O, Deb D, et al. Phenotype-based drug screening reveals association between venetoclax response and differentiation stage in acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2020;105:708–20.

14.

- Zeng AGX, Bansal S, Jin L, Mitchell A, Chen WC, Abbas HA, et al. A cellular hierarchy framework for understanding heterogeneity and predicting drug response in acute myeloid leukemia. *Nat Med.* 2022;28:1212–23.
15. Dal Bello R, Pasanisi J, Joudinaud R, Duchmann M, Pardieu B, Ayaka P, et al. A multiparametric niche-like drug screening platform in acute myeloid leukemia. *Blood Cancer J.* 2022;12:95.

ACKNOWLEDGEMENTS

This project was supported by La Ligue contre le Cancer (RS21/75-91) and by ITMO Cancer AVIESAN.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MD, RJ, AP, CP, ND, and RI designed the study. MD, RJ, JP, GDF, MB, LC, and KP performed the experiments. MD and AB performed bioinformatics analyses. RK, CC, LL, SM, EC, CR, CP, and ND performed flow cytometry and bulk HTS at diagnosis. ER, LA, CB, and RI managed patients and provided clinical data. MD and RI wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

ADDITIONAL INFORMATION

Supplementary information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1038/s41408-022-00734-1>.

Correspondence and requests for materials should be addressed to Raphaël Itzykson.

Reprints and permission information is available at <http://www.nature.com/reprints>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2022

Supplemental appendix

Hematopoietic differentiation at single-cell resolution in *NPM1*-mutated AML

Matthieu Duchmann*, Romane Joudinaud* et al.

Supplementary Methods

Supplementary Figure legends.

Supplementary Figure S1-S3.

Supplementary Tables 1-7

Supplementary Material

Single-cell DNA-seq + phenotype sequencing

Cryopreserved BMMC or PBMC were thawed and dead cells and debris were removed using magnetic beads (Dead cell removal, Miltenyi Biotec). Cells were stained using a custom panel of 15 antibodies (CD45, CD34, CD38, CD7, CD19, CD123, CD117, CD45RA, CD90, CD81, HLA-DR, CD56, CD11b, CD13, CD33, Biolegend) conjugated with specific DNA-oligonucleotides (**Figure 1A, Table S3**) for 30 minutes at room temperature. After three washes in PBS + 10% fetal bovine serum (FBS, Sigma), cells were resuspended in cell buffer (Mission Bio) and diluted to 3,500 cells/ μ L. Then, 35 μ L of cell suspension were loaded in a microfluidic cartridge for encapsulation, lysis and barcoding following Mission Bio protocol. Forward primers for protein library were added at the barcoding step (IDT, GTACTCGCAGTAGTCCGACTGAGATACTAGATCGGCTC, 2 μ L of 30 μ M). For genomic DNA library, we used a commercially available AML panel including 127 amplicons covering 20 genes recurrently mutated in AML (**Table S4**). A first PCR amplification was performed in emulsion with 24 cycles. Emulsions were then broken and DNA and protein libraries were purified using Ampure XP beads (Beckman Coulter) and custom biotinylated oligos (/5Biosg /CGAGATGACTACGCTACTCATGG/3C6/, IDT) respectively. Purified amplicons were indexed and amplified with a second PCR for 10 (DNA) and 20 (Protein) cycles. Libraries were finally purified using Ampure Beads, pooled and sequenced on a Novaseq 6000 (Illumina) at Lille university hospital's sequencing facility.

Bioinformatics analysis

Bcl2 files were then demultiplexed using bcl2fastq. The bioinformatic analysis strategy is summarized in **Figure 1B**. Briefly, fastq files were analyzed using the Tapestry pipeline V2 for pre-processing, alignment, cell barcode correction, cell identification, variant calling, genomic DNA amplicons and antibody-derived tags (ADT) counting. Analysis was focused on variants also detected on bulk HTS. Bulk and single-cell bam files were also analyzed using the Filt3R algorithm that allows the robust detection and quantification of *FLT3-ITD*.¹ Multiomics h5 files were then analyzed on R (version 4.0) using the *TapestryR* package. A genotype was considered for a genomic position if the single-cell sequencing depth (scDP) was $\geq 10x$. An allele was retained if it was supported by at least 3 reads, and if the single-cell variant allelic frequency (scVAF) was $\geq 15\%$ for a scDP between 20-100x, or a scVAF $\geq 10\%$ for a scDP $> 100x$. The genotype was otherwise considered as missing for this position. ScVAF distributions were visually inspected for each variant, and obvious cell doublets (2 mutually exclusive mutations with a scVAF distribution centered on 25%) were manually excluded from the analysis for one patient (PH09). The allelic drop-out (ADO) rate was determined for each sample by Mission Bio pipeline using

heterozygous polymorphisms. We then used infSCITE software² (<https://github.com/cbg-ethz/infSCITE>) to infer phylogenetic trees on the resulting mutations matrix for each sample, as already published.³ We set false-positive rate argument (-fd) to 1%, false-negative arguments (-ad) to the sample specific ADO rate determined by Mission Bio and the -cc argument to ADO/2*fd. For all samples, infSCITE algorithm retained only one phylogenetic tree. The inferred clonal architecture (**Figure S1A**) was used to correct the raw assigned genotype. Cells with insufficient genotype information (sparse genotype) or with a genotype violating the clonal hierarchy owing to cell doublets or sequencing errors (ambiguous genotype) were excluded for downstream analyses (**Figure S1B**). Such phylogeny-driven genotype inference strategy significantly increased the number of cells with retained genotype information for downstream analyses (**Figure S1C**) and was particularly useful when one of the mutations occurred on an amplicon with poor coverage. A homozygous genotype was considered only if the cell fraction involved was $> 2 \times$ ADO rate. Protein data was analyzed using Seurat package V4.0.⁴ The single-cell ADT sequencing depth was corrected using a centered log-ratio transformation as recommended for compositional data.⁴ Dimensionality reduction was performed using PCA and UMAP embeddings. Differential ADT expression between clones was performed using ALDEX2 package, which uses a Dirichlet-multinomial model to infer abundance from counts.⁵ Differential abundance testing was done using t tests, p-values were corrected using the Benjamini & Hochberg method and the “Effect” parameter was used to estimate the size of the abundance difference.

References

1. Boudry A, Darmon S, Duployez N, Figeac M, Geffroy S, Bucci M, *et al.* Frugal alignment-free identification of FLT3-internal tandem duplications with FILT3r. *Biorxiv* 2022: 2022.2006.2027.496265.
2. Kuipers J, Jahn K, Raphael BJ, Beerenwinkel N. Single-cell sequencing data reveal widespread recurrence and loss of mutational hits in the life histories of tumors. *Genome Res* 2017 Nov; **27**(11): 1885-1894.
3. Morita K, Wang F, Jahn K, Hu T, Tanaka T, Sasaki Y, *et al.* Clonal evolution of acute myeloid leukemia revealed by high-throughput single-cell genomics. *Nat Commun* 2020 Oct 21; **11**(1): 5327.
4. Hao Y, Hao S, Andersen-Nissen E, Mauck WM, 3rd, Zheng S, Butler A, *et al.* Integrated analysis of multimodal single-cell data. *Cell* 2021 Jun 24; **184**(13): 3573-3587 e3529.
5. Fernandes AD, Reid JN, Macklaim JM, McMurrrough TA, Edgell DR, Gloor GB. Unifying the analysis of high-throughput sequencing datasets: characterizing RNA-seq, 16S rRNA gene sequencing and selective growth experiments by compositional data analysis. *Microbiome* 2014; **2**: 15.

Supplementary figure legends.

Supplementary Figure S1. **A.** Example of a phylogeny tree inferred by infSCITE. **B.** Phylogeny-driven genotype correction strategy. Missing genotypes were inferred using the phylogeny tree. Cells with insufficient genotype information (sparse genotype, orange) or with a genotype violating the clonal hierarchy owing to doublets or PCR errors (ambiguous genotype, red) were excluded from downstream analyses. **C.** Summary of the number of cells detected by the Tapestry pipeline V2 (white), including those with complete raw genotype information (blue), the retained cells with complete genotype after phylogeny-driven correction (green) and those excluded owing to sparse (orange) or ambiguous (red) genotypes.

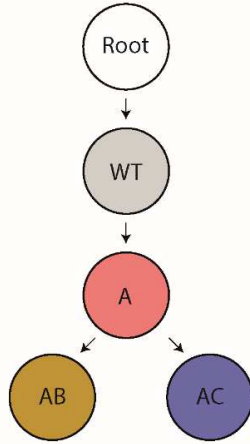
Supplementary Figure S2. **A.** Correlation between variant allelic frequency (VAF) on bulk HTS and pseudo-bulk VAF calculated on ADT-seq data. Points are colored according to the sample. Only mutations detected by both methods are displayed. Comparison was done using Spearman correlation. The two homozygous mutations are highlighted. **B.** Copy-number of the *FLT3* locus inferred on bulk HTS (Viscap, upper panel) and sc-DNAseq data (lower panel). **C.** Copy-number of the *TET2* locus inferred on bulk HTS (Viscap, upper panel) and sc-DNAseq data (lower panel). **D.** Fishplots showing inferred clonal architecture and clone abundances in the 11 *NPM1*-mutated AML samples.

Supplementary Figure S3. Uniform manifold approximation and projection (UMAP) plot of ADT-seq expression of the single-cells from the each of the 11 AML samples. Cells are colored according to the retained genotype.

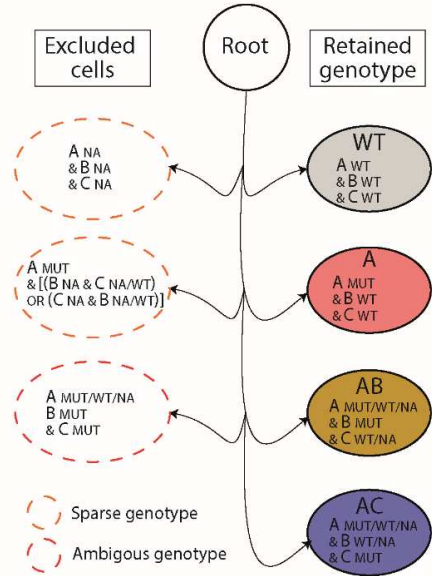
Supplementary Figure S1.

Duchmann, Joudinaud et al. Supplementary Figure 1.

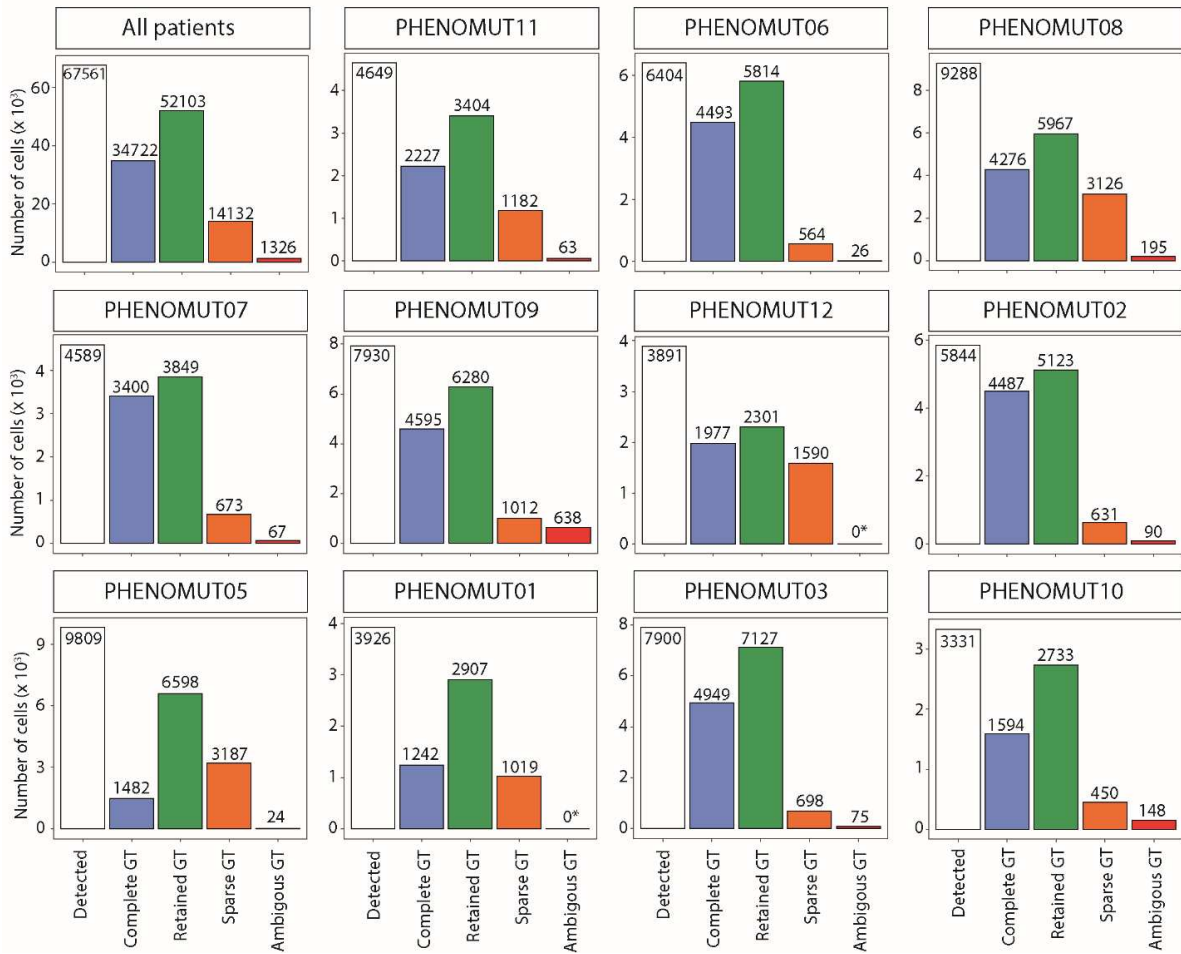
A.



B.

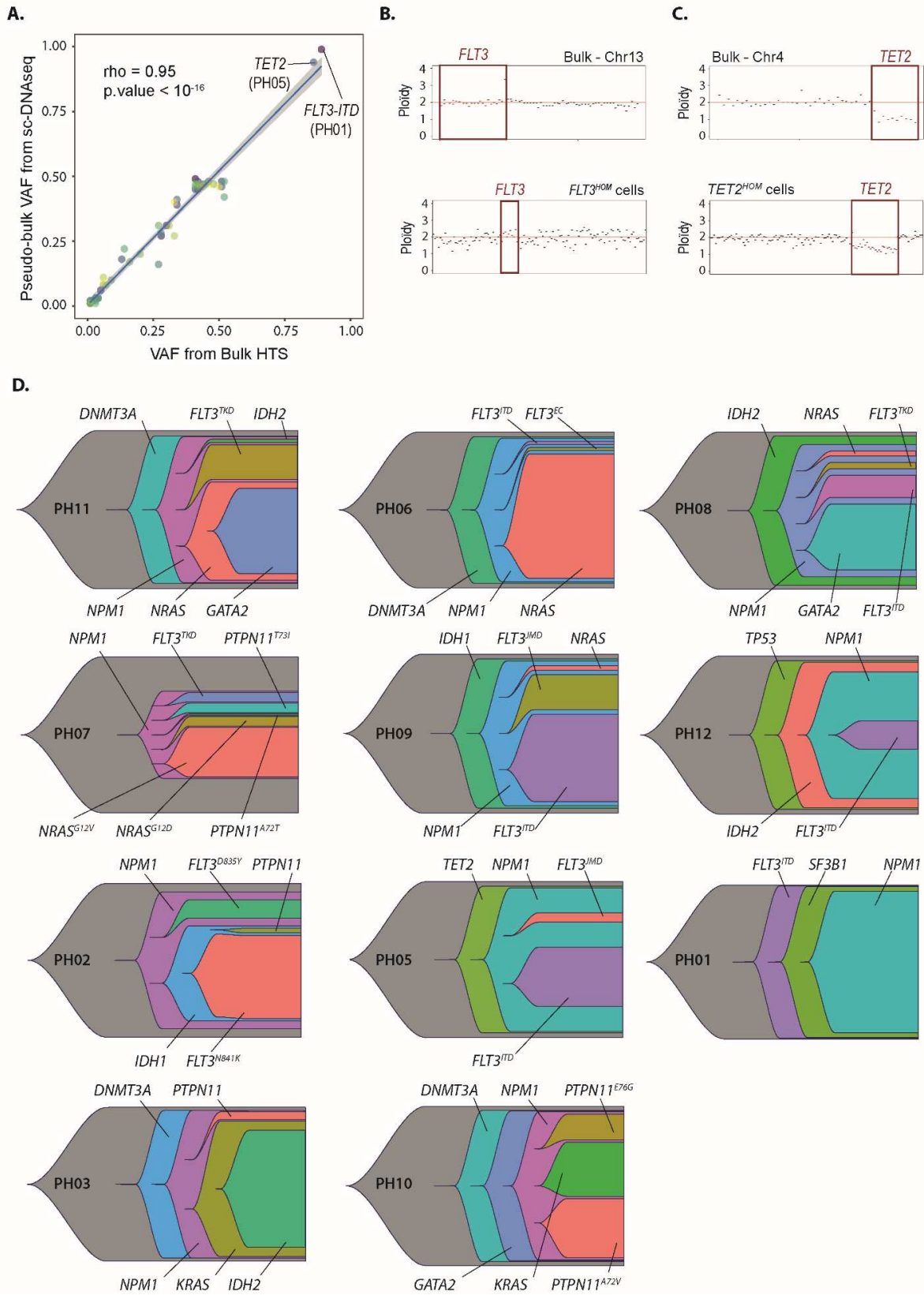


C.



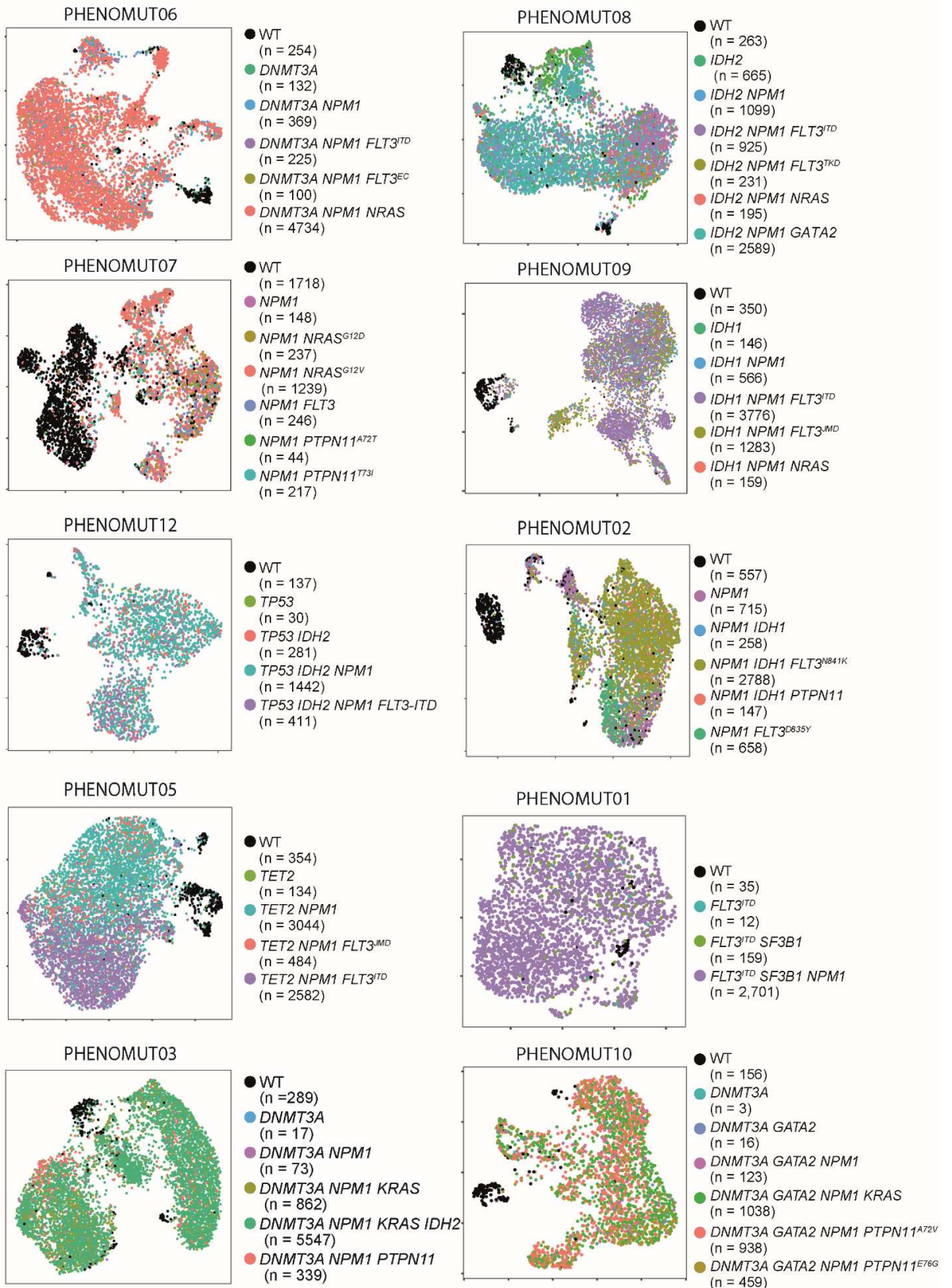
Supplementary Figure S2.

Duchmann, Joudinaud et al. Supplementary Figure 2.



Supplementary Figure S3.

Duchmann, Joudinaud et al. Supplementary Figure 3.



Supplementary Table 1. Overlapping genes covered in patients sequenced by Targeted HTS in St Louis hospital

Gene	Reference Sequence	Coverage
<i>ASXL1</i>	NM_015338	all exons
<i>ASXL2</i>	NM_018263	all exons
<i>ATRX</i>	NM_000489	all exons
<i>BCOR</i>	NM_017745	all exons
<i>BCORL1</i>	NM_021946	all exons
<i>BRAF</i>	NM_004333	all exons
<i>BRCA2</i>	NM_000059	all exons
<i>BRCC3</i>	NM_024332	all exons
<i>CALR</i>	NM_004343	all exons
<i>CBL</i>	NM_005188	all exons
<i>CEBPA</i>	NM_004364	all exons
<i>CREBBP</i>	NM_004380	all exons
<i>CSF3R</i>	NM_156039	all exons
<i>CTCF</i>	NM_006565	all exons
<i>CUX1</i>	NM_001913	all exons
<i>DDX41</i>	NM_016222	all exons
<i>DNMT3A</i>	NM_022552	all exons
<i>EP300</i>	NM_001429	all exons
<i>ERCC6L2</i>	NM_020207	all exons
<i>ETNK1</i>	NM_018638	all exons
<i>ETV6</i>	NM_001987	all exons
<i>EZH2</i>	NM_004456	all exons
<i>FLT3</i>	NM_004119	all exons
<i>GATA2</i>	NM_032638	all exons
<i>IDH1</i>	NM_005896	all exons
<i>IDH2</i>	NM_002168	all exons
<i>JAK2</i>	NM_004972	all exons
<i>KDM6A</i>	NM_021140	all exons
<i>KIT</i>	NM_000222	all exons
<i>KMT2A</i>	NM_001197104	all exons
<i>KMT2D</i>	NM_003482	all exons
<i>KRAS</i>	NM_033360	all exons
<i>MECOM</i>	NM_001105078	all exons
<i>MPL</i>	NM_005373	all exons
<i>NF1</i>	NM_001042492	all exons
<i>NPM1</i>	NM_002520	all exons
<i>NRAS</i>	NM_002524	all exons
<i>PHF6</i>	NM_001015877	all exons
<i>PRPF8</i>	NM_006445	all exons
<i>PTPN11</i>	NM_002834	all exons

<i>RAD21</i>	NM_006265	all exons
<i>RIT1</i>	NM_006912	all exons
<i>RUNX1</i>	NM_001001890	all exons
<i>SAMD9</i>	NM_017654	all exons
<i>SAMD9L</i>	NM_152703	all exons
<i>SETBP1</i>	NM_015559	all exons
<i>SF3B1</i>	NM_012433	all exons
<i>SMC1A</i>	NM_006306	all exons
<i>SMC3</i>	NM_005445	all exons
<i>SRP72</i>	NM_006947	all exons
<i>SRSF2</i>	NM_003016	all exons
<i>STAG2</i>	NM_001042749	all exons
<i>TET2</i>	NM_001127208	all exons
<i>TP53</i>	NM_001126112	all exons
<i>U2AF1</i>	NM_006758	all exons
<i>WT1</i>	NM_024426	all exons
<i>ZRSR2</i>	NM_005089	all exons

Supplementary Table 2. Genes covered in patients sequenced by Targeted HTS in Lille university hospital

Gene	Reference Sequence	Coverage
<i>ANKRD26</i>	NM_014915	5'UTR
<i>ASXL1</i>	NM_015338	Exons 11-12
<i>ASXL2</i>	NM_018263	Exons 11-12
<i>ATRX</i>	NM_000489	all exons
<i>BCOR</i>	NM_001123385	all exons
<i>BCORL1</i>	NM_021946	all exons
<i>BRAF</i>	NM_004333	Exons 11 and 15
<i>CALR</i>	NM_004343	Exon 9
<i>CBL</i>	NM_005188	Exons 8 and 9
<i>CEBPA</i>	NM_004364	Exon 1
<i>CRLF2</i>	NM_022148	Exon 6
<i>CSF3R</i>	NM_156039	Exons 14 and 17
<i>CUX1</i>	NM_181552	all exons
<i>DDX41</i>	NM_016222	all exons
<i>DNMT3A</i>	NM_022552	all exons
<i>ETNK1</i>	NM_018638	all exons
<i>ETV6</i>	NM_001987	all exons
<i>EZH2</i>	NM_004456	all exons
<i>FLT3</i>	NM_004119	all exons
<i>GATA1</i>	NM_002049	Exons 2 and 3
<i>GATA2</i>	NM_032638	Exons 2-6 and Intron 4
<i>GNAS</i>	NM_000516	Exons 8 and 9
<i>GNB1</i>	NM_002074	Exons 5 and 6
<i>HRAS</i>	NM_005343	Exon 2-4
<i>IDH1</i>	NM_005896	all exons
<i>IDH2</i>	NM_002168	all exons
<i>IKZF1</i>	NM_006060	all exons
<i>IL2RG</i>	NM_000206	Exon 8
<i>IL7R</i>	NM_002185	Exon 6
<i>JAK1</i>	NM_002227	all exons
<i>JAK2</i>	NM_004972	all exons
<i>JAK3</i>	NM_000215	all exons
<i>KDM6A</i>	NM_001291415	all exons
<i>KIT</i>	NM_000222	Exons 8-11 and 17
<i>KRAS</i>	NM_033360	Exons 2-4
<i>MPL</i>	NM_005373	all exons
<i>NF1</i>	NM_001042492	all exons
<i>NFE2</i>	NM_001136023	all exons
<i>NPM1</i>	NM_002520	Exons 10-11

<i>NRAS</i>	NM_002524	Exons 2-4
<i>PAX5</i>	NM_016734	all exons
<i>PHF6</i>	NM_001015877	all exons
<i>PPM1D</i>	NM_003620	all exons
<i>PTPN11</i>	NM_002834	all exons
<i>RAD21</i>	NM_006265	all exons
<i>RIT1</i>	NM_006912	Exon 5
<i>RUNX1</i>	NM_001754	all exons
<i>SAMD9</i>	NM_017654	all exons
<i>SAMD9L</i>	NM_152703	all exons
<i>SETBP1</i>	NM_015559	all exons
<i>SF3B1</i>	NM_012433	Exons 13-16
<i>SH2B3</i>	NM_005475	all exons
<i>SMC1A</i>	NM_006306	all exons
<i>SMC3</i>	NM_005445	all exons
<i>SRP72</i>	NM_006947	all exons
<i>SRSF2</i>	NM_003016	Exon 1
<i>STAG2</i>	NM_001042749	all exons
<i>STAT3</i>	NM_003150	all exons
<i>STAT5B</i>	NM_012448	all exons
<i>TERC</i>	NR_001566	all exons
<i>TERT</i>	NM_198253	all exons
<i>TET2</i>	NM_001127208	all exons
<i>TP53</i>	NM_001126112	all exons
<i>U2AF1</i>	NM_006758	Exons 2 and 6
<i>UBA1</i>	NM_003334	Exon 3
<i>WT1</i>	NM_024426	all exons
<i>ZRSR2</i>	NM_005089	all exons

Supplementary Table 3. List of conjugated antibodies with their respective DNA Oligos

Antibody	DNA-tag	Titration
CD34	CAGCCAGAA	1/2
CD117	GACTGACAA	1
CD33	AACACCGTT	1/3
CD123	GCAATGAGT	1
HLA-DR	GCCTGTTGA	1/3
CD13	CCTTAGACC	1
CD19	CCTCTATGC	1
CD38	CCAACACTA	1/5
CD11b	CCTGGAATC	1
CD45	TCGTGCCAA	1/2
CD90	AACGGACGT	1
CD45RA	CCTTAAGGT	1
CD56	AACGCCTCA	1
CD81	AACCGAACA	1/2
CD7	CAGTAACCT	1

Supplementary Table 4. List of genomic DNA amplicons (panel AML v2, Mission Bio®)

hg19	chr1	115256487	115256723	AML_v2_NRAS_115256512
hg19	chr1	115258609	115258825	AML_v2_NRAS_115258635
hg19	chr2	25457143	25457372	AML_v2_DNMT3A_25457166
hg19	chr2	25458518	25458763	AML_v2_DNMT3A_25458540
hg19	chr2	25459793	25460046	AML_v2_DNMT3A_25459813
hg19	chr2	25461880	25462137	AML_v2_DNMT3A_25461902
hg19	chr2	25463106	25463346	AML_v2_DNMT3A_25463127
hg19	chr2	25463493	25463717	AML_v2_DNMT3A_25463515
hg19	chr2	25464421	25464618	AML_v2_DNMT3A_25464443
hg19	chr2	25466621	25466871	AML_v2_DNMT3A_25466642
hg19	chr2	25467012	25467220	AML_v2_DNMT3A_25467033
hg19	chr2	25467371	25467631	AML_v2_DNMT3A_25467391
hg19	chr2	25468110	25468332	AML_v2_DNMT3A_25468130
hg19	chr2	25469006	25469231	AML_v2_DNMT3A_25469026
hg19	chr2	25469407	25469606	AML_v2_DNMT3A_25469428
hg19	chr2	25469925	25470185	AML_v2_DNMT3A_25469945
hg19	chr2	25470403	25470663	AML_v2_DNMT3A_25470423
hg19	chr2	25470930	25471190	AML_v2_DNMT3A_25470951
hg19	chr2	25472515	25472728	AML_v2_DNMT3A_25472538
hg19	chr2	198266103	198266322	AML_v2_SF3B1_198266130
hg19	chr2	198266442	198266688	AML_v2_SF3B1_198266472
hg19	chr2	198266693	198266913	AML_v2_SF3B1_198266718
hg19	chr2	198267319	198267569	AML_v2_SF3B1_198267340
hg19	chr2	209113085	209113297	AML_v2_IDH1_209113110
hg19	chr3	128200077	128200327	AML_v2_GATA2_128200102
hg19	chr3	128200668	128200928	AML_v2_GATA2_128200689
hg19	chr3	128202699	128202899	AML_v2_GATA2_128202719
hg19	chr4	55561579	55561792	AML_v2_KIT_55561605
hg19	chr4	55569875	55570095	AML_v2_KIT_55569899
hg19	chr4	55592077	55592282	AML_v2_KIT_55592099
hg19	chr4	55593509	55593744	AML_v2_KIT_55593532
hg19	chr4	55593963	55594183	AML_v2_KIT_55593987
hg19	chr4	55599270	55599486	AML_v2_KIT_55599293
hg19	chr4	55602651	55602862	AML_v2_KIT_55602675
hg19	chr4	106154923	106155158	AML_v2_TET2_106154951
hg19	chr4	106155158	106155416	AML_v2_TET2_106155178
hg19	chr4	106155469	106155729	AML_v2_TET2_106155489
hg19	chr4	106155913	106156173	AML_v2_TET2_106155932
hg19	chr4	106156237	106156489	AML_v2_TET2_106156259
hg19	chr4	106156503	106156762	AML_v2_TET2_106156523
hg19	chr4	106156793	106157046	AML_v2_TET2_106156812
hg19	chr4	106157077	106157332	AML_v2_TET2_106157098
hg19	chr4	106157426	106157679	AML_v2_TET2_106157447
hg19	chr4	106157756	106158015	AML_v2_TET2_106157777

hg19	chr4	106158029	106158288	AML_v2_TET2_106158049
hg19	chr4	106158293	106158544	AML_v2_TET2_106158314
hg19	chr4	106158545	106158805	AML_v2_TET2_106158576
hg19	chr4	106162388	106162618	AML_v2_TET2_106162415
hg19	chr4	106163952	106164192	AML_v2_TET2_106163979
hg19	chr4	106164705	106164952	AML_v2_TET2_106164725
hg19	chr4	106180718	106180956	AML_v2_TET2_106180745
hg19	chr4	106182829	106183072	AML_v2_TET2_106182858
hg19	chr4	106190733	106190955	AML_v2_TET2_106190758
hg19	chr4	106193540	106193777	AML_v2_TET2_106193572
hg19	chr4	106193777	106194032	AML_v2_TET2_106193797
hg19	chr4	106194035	106194295	AML_v2_TET2_106194057
hg19	chr4	106196179	106196429	AML_v2_TET2_106196202
hg19	chr4	106196437	106196692	AML_v2_TET2_106196456
hg19	chr4	106196771	106197024	AML_v2_TET2_106196791
hg19	chr4	106197028	106197278	AML_v2_TET2_106197048
hg19	chr4	106197335	106197593	AML_v2_TET2_106197355
hg19	chr4	106197598	106197858	AML_v2_TET2_106197618
hg19	chr5	170837384	170837659	AML_v2_NPM1_170837412
hg19	chr7	148504721	148504971	AML_v2_EZH2_148504743
hg19	chr7	148506025	148506265	AML_v2_EZH2_148506050
hg19	chr7	148506371	148506589	AML_v2_EZH2_148506394
hg19	chr7	148507404	148507618	AML_v2_EZH2_148507427
hg19	chr7	148508696	148508930	AML_v2_EZH2_148508719
hg19	chr7	148511032	148511276	AML_v2_EZH2_148511054
hg19	chr7	148511990	148512230	AML_v2_EZH2_148512017
hg19	chr7	148514917	148515124	AML_v2_EZH2_148514941
hg19	chr7	148523626	148523866	AML_v2_EZH2_148523652
hg19	chr7	148525653	148525888	AML_v2_EZH2_148525675
hg19	chr7	148526737	148526948	AML_v2_EZH2_148526763
hg19	chr7	148529630	148529890	AML_v2_EZH2_148529658
hg19	chr7	148543467	148543693	AML_v2_EZH2_148543492
hg19	chr7	148544266	148544493	AML_v2_EZH2_148544293
hg19	chr9	5073698	5073902	AML_v2_JAK2_5073725
hg19	chr11	32413427	32413633	AML_v2_WT1_32413452
hg19	chr11	32414185	32414405	AML_v2_WT1_32414209
hg19	chr11	32417758	32417989	AML_v2_WT1_32417780
hg19	chr11	32421511	32421750	AML_v2_WT1_32421532
hg19	chr11	32439082	32439321	AML_v2_WT1_32439105
hg19	chr12	25378534	25378794	AML_v2_KRAS_25378559
hg19	chr12	25380238	25380478	AML_v2_KRAS_25380260
hg19	chr12	25398206	25398433	AML_v2_KRAS_25398232
hg19	chr12	112888115	112888350	AML_v2_PTPN11_112888140
hg19	chr12	112890994	112891234	AML_v2_PTPN11_112891019
hg19	chr12	112910667	112910907	AML_v2_PTPN11_112910689

hg19	chr12	112915377	112915582	AML_v2_PTPN11_112915401
hg19	chr12	112924188	112924405	AML_v2_PTPN11_112924215
hg19	chr12	112926203	112926424	AML_v2_PTPN11_112926226
hg19	chr12	112926824	112927050	AML_v2_PTPN11_112926847
hg19	chr13	28589756	28589977	AML_v2_FLT3_28589783
hg19	chr13	28592473	28592726	AML_v2_FLT3_28592494
hg19	chr13	28597497	28597727	AML_v2_FLT3_28597520
hg19	chr13	28601130	28601358	AML_v2_FLT3_28601153
hg19	chr13	28602302	28602559	AML_v2_FLT3_28602324
hg19	chr13	28608188	28608395	AML_v2_FLT3_28608210
hg19	chr13	28608473	28608696	AML_v2_FLT3_28608497
hg19	chr13	28609571	28609790	AML_v2_FLT3_28609594
hg19	chr13	28610014	28610260	AML_v2_FLT3_28610043
hg19	chr15	90631740	90631990	AML_v2_IDH2_90631760
hg19	chr17	7572906	7573129	AML_v2_TP53_7572930
hg19	chr17	7573973	7574178	AML_v2_TP53_7573996
hg19	chr17	7576759	7576976	AML_v2_TP53_7576782
hg19	chr17	7577014	7577264	AML_v2_TP53_7577035
hg19	chr17	7577397	7577636	AML_v2_TP53_7577424
hg19	chr17	7578075	7578315	AML_v2_TP53_7578098
hg19	chr17	7578362	7578618	AML_v2_TP53_7578383
hg19	chr17	7579858	7580118	AML_v2_TP53_7579878
hg19	chr17	74732191	74732450	AML_v2_SRSF2_74732219
hg19	chr20	30956749	30956969	AML_v2_ASXL1_30956774
hg19	chr20	31015813	31016051	AML_v2_ASXL1_31015840
hg19	chr20	31021137	31021366	AML_v2_ASXL1_31021160
hg19	chr20	31021438	31021659	AML_v2_ASXL1_31021460
hg19	chr20	31022168	31022417	AML_v2_ASXL1_31022192
hg19	chr20	31022719	31022978	AML_v2_ASXL1_31022741
hg19	chr20	31023008	31023248	AML_v2_ASXL1_31023032
hg19	chr20	31023261	31023492	AML_v2_ASXL1_31023285
hg19	chr20	31023556	31023761	AML_v2_ASXL1_31023578
hg19	chr21	36171567	36171811	AML_v2_RUNX1_36171592
hg19	chr21	36206683	36206913	AML_v2_RUNX1_36206703
hg19	chr21	36231692	36231937	AML_v2_RUNX1_36231714
hg19	chr21	36252819	36253046	AML_v2_RUNX1_36252844
hg19	chr21	44514549	44514808	AML_v2_U2AF1_44514570
hg19	chr21	44524416	44524634	AML_v2_U2AF1_44524438

Supplementary Table 5. Patient characteristics.

Patient	Center	Age	Sex	WBC (x10 ⁹ /L)	PB Blasts	BM Blasts	FAB	Karyo-type	Mutations covered by MB	Not Co-vered	site	Treatment	Res-ponse	Re-lapse
PHENO-MUT01	St Louis	60 y.o	F	39	47%	93%	LAM5	Normal	<i>SF3B1</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3-ITD</i>	None	BM	3+7	CR	No
PHENO-MUT02	Lille	47 y.o	F	13	62%	75%	LAM2	Normal	<i>NPM1</i> , <i>IDH1</i> , <i>FLT3-TKD</i> x2, <i>PTPN11</i>	None	BM	3+7+Mi-dostaurine	CR	No
PHENO-MUT03	St Louis	44 y.o	F	88	73%	87%	LAM4	Normal	<i>DNMT3A</i> , <i>NPM1</i> , <i>KRAS</i> , <i>IDH2</i> , <i>PTPN11</i>	<i>RAD21</i>	BM	3+7	CR	No
PHENO-MUT05	St Louis	88 y.o	F	90	90%	96%	LAM1	Normal	<i>TET2</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-JMD</i>	<i>SRSF2</i>	BM	Sorafenib	PD	NA
PHENO-MUT06	St Louis	43 y.o	M	59	8%	60%	LAM4	Normal	<i>DNMT3A</i> , <i>NPM1</i> , <i>NRAS</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-EC</i>	None	BM	3+7	CR	No
PHENO-MUT07	Lille	24 y.o	M	32	10%	23%	LAM5	Normal	<i>NPM1</i> , <i>NRAS</i> x 2, <i>FLT3-TKD</i> , <i>PTPN11</i> x 2	None	BM	3+7+Mi-dostaurine	CR	Yes
PHENO-MUT08	St Louis	79 y.o	M	75	14%	75%	LAM1	Normal	<i>GATA2</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>NRAS</i> , <i>FLT3-TKD</i>	<i>SRSF2</i>	BM	AZA	PD	NA
PHENO-MUT09	St Louis	35 y.o	F	81	94%	92%	LAM1	Normal	<i>IDH1</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3-ITD</i> , <i>FLT3-JMD</i> , <i>NRAS</i>	None	BM	3+7+Mi-dostaurine	CR	No
PHENO-MUT10	St Louis	50 y.o	M	61	42%	84%	LAM5	Normal	<i>DNMT3A</i> , <i>NPM1</i> , <i>GATA2</i> , <i>KRAS</i> , <i>PTPN11</i> x 2	None	BM	3+7	CR	No
PHENO-MUT11	St Louis	68 y.o	M	32	6%	26%	LAM5	Normal	<i>DNMT3A</i> , <i>NPM1</i> , <i>GATA2</i> , <i>NRAS</i> , <i>FLT3-TKD</i> , <i>IDH2</i> , <i>NFE2</i>	<i>SMC3</i> , <i>NFE2</i>	BM	3+7	CR	No
PHENO-MUT12	St Louis	62 y.o	M	123	86%	96%	LAM1	Normal	<i>IDH2</i> , <i>TP53</i> , <i>NPM1</i> , <i>FLT3-ITD</i>	<i>FLT3-ITD</i>	PB	3+7+Mi-dostaurine	PD	NA

Supplementary Table 6. Variants detected by bulk HTS

Patient	Gene	Variant	VAF	Covered	De- tected
PHENOMUT01	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD21	0.89	Yes	Yes
PHENOMUT01	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.43	Yes	Yes
PHENOMUT01	<i>SF3B1</i>	SF3B1_p.K666N	0.41	Yes	Yes
PHENOMUT02	<i>NPM1</i>	NPM1_p.W288fs	0.42	Yes	Yes
PHENOMUT02	<i>FLT3</i>	FLT3_p.N841K	0.28	Yes	Yes
PHENOMUT02	<i>FLT3</i>	FLT3_p.D835Y	0.05	Yes	Yes
PHENOMUT02	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.D61G	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT02	<i>IDH1</i>	IDH1_p.R132H	0.3	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>IDH2</i>	IDH2_p.R140Q	0.34	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>KRAS</i>	KRAS_p.G12C	0.41	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>DNMT3A</i>	DNMT3A_p.567del	0.42	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.51	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.A72T	0.02	Yes	Yes
PHENOMUT03	<i>RAD21</i>	RAD21_p.R338X	0.43	No	No
PHENOMUT05	<i>TET2</i>	TET2_p.M695fs	0.86	Yes	Yes
PHENOMUT05	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.52	Yes	Yes
PHENOMUT05	<i>SRSF2</i>	SRSF2_p.P95H	0.4	No	No
PHENOMUT05	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD21	0.18	Yes	Yes
PHENOMUT05	<i>FLT3</i>	FLT3_p.F594C	0.03	Yes	Yes
PHENOMUT06	<i>DNMT3A</i>	DNMT3A_p.R882H	0.46	Yes	Yes
PHENOMUT06	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.44	Yes	Yes
PHENOMUT06	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12V	0.33	Yes	Yes
PHENOMUT06	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD27	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT06	<i>FLT3</i>	FLT3_p.V491L	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.28	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>FLT3</i>	FLT3_p.D835Y	0.04	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12V	0.27	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12D	0.04	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.T73I	0.03	Yes	Yes
PHENOMUT07	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.A72T	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.52	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>IDH2</i>	IDH2_p.R140Q	0.52	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>SRSF2</i>	SRSF2_p.P95H	0.49	No	No
PHENOMUT08	<i>GATA2</i>	GATA2_p.A372T	0.14	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12D	0.03	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD54	0.06	Yes	Yes
PHENOMUT08	<i>FLT3</i>	FLT3_D835Y	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT09	<i>IDH1</i>	IDH1_p.R132G	0.48	Yes	Yes
PHENOMUT09	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD39	0.27	Yes	Yes
PHENOMUT09	<i>FLT3</i>	FLT3_p.V592A	0.09	Yes	Yes
PHENOMUT09	<i>NPM1</i>	NPM1_p.W288fs	0.45	Yes	Yes
PHENOMUT09	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G13V	0.03	Yes	Yes

PHENOMUT10	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.E76G	0.07	Yes	Yes
PHENOMUT10	<i>PTPN11</i>	PTPN11_p.A72V	0.16	Yes	Yes
PHENOMUT10	<i>KRAS</i>	KRAS_p.G13D	0.2	Yes	Yes
PHENOMUT10	<i>DNMT3A</i>	DNMT3A_p.R882H	0.45	Yes	Yes
PHENOMUT10	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.42	Yes	Yes
PHENOMUT10	<i>GATA2</i>	GATA2_p.R307L	0.41	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>SMC3</i>	SMC3_p.382_387del	0.08	No	No
PHENOMUT11	<i>GATA2</i>	GATA2_p.R362Q	0.33	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12D	0.31	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.43	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>FLT3</i>	FLT3_p.A680V	0.06	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>DNMT3A</i>	DNMT3A_p.N879D	0.44	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>IDH2</i>	IDH2_p.R140Q	0.01	Yes	Yes
PHENOMUT11	<i>NFE2</i>	NFE2_p.R312fs	0.09	No	No
PHENOMUT12	<i>IDH2</i>	IDH2_p.R140Q	0.5	Yes	Yes
PHENOMUT12	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD102	0.11	Yes	No
PHENOMUT12	<i>TP53</i>	TP53_p.R267L	0.47	Yes	Yes
PHENOMUT12	<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.33	Yes	Yes
PHENOMUT12	<i>FLT3</i>	FLT3_ITD73	0.06	Yes	Yes

Supplementary Table 7. Variants detected by bulk HTS on bulk and subfractions of PHENOMUT11.

Gene	Variant	VAF in Bulk	VAF in Mono-like	log2(FC)
<i>DNMT3A</i>	DNMT3A_p.N879D	0.44	0.43	-0.03
<i>FLT3</i>	FLT3_p.A680V	0.06	0.40	2.74
<i>GATA2</i>	GATA2_p.R362Q	0.33	0.01	-5.04
<i>IDH2</i>	IDH2_p.R140Q	0.01	0.03	1.58
<i>NFE2</i>	NFE2_p.R312fs	0.09	0.47	2.38
<i>NPM1</i>	NPM1_p.L287fs	0.43	0.47	0.13
<i>NRAS</i>	NRAS_p.G12D	0.31	0.01	-4.95
<i>SMC3</i>	SMC3_p.382_387del	0.08	0.44	2.46

Deuxième article : La midostaurine module l'évolution des macroclones et des microclones dans les leucémies aiguës myéloïdes mutées *FLT3*

Résumé

Depuis plusieurs années, les patients mutés *FLT3* sont traités en première ligne par une thérapie ciblant *FLT3* (la MIDO), en association à la CTI classique. Cependant, les taux de RC obtenus demeurent proches de 60-70% et les rechutes surviennent encore dans plus de 40% des cas. Nous avons cherché à identifier les mécanismes moléculaires sous-tendant l'échec d'induction et/ou la rechute chez les patients initialement mutés *FLT3*. Pour cela, nous avons réalisé une étude rétrospective et multicentrique incluant 150 patients R/R présentant une mutation *FLT3*-ITD ($n = 130$) et/ou *FLT3*-TKD ($n = 26$) au diagnostic en AF. Les patients ont été traités en première ligne soit par l'association CTI et MIDO ($n = 54$), soit uniquement par CTI ($n = 96$), selon la date de diagnostic et d'approbation de la MIDO. Nous avons étudié l'évolution des clones *FLT3* et des co-mutations sur les échantillons appariés prélevés au diagnostic et lors du stade R/R, par une approche de HTS ciblée. À l'aide d'un algorithme spécifiquement conçu pour la détection des mutations *FLT3*-ITD, nous avons mis en évidence 189 microclones *FLT3*-ITD ($RA < 0,05$) et 225 macroclones ($RA \geq 0,05$) au total. Nous avons démontré que l'ajout de MIDO à la CTI diminue le taux de persistance de la mutation *FLT3*-ITD au stade R/R (CTI et MIDO : 68% des patients vs CTI : 87,5% des patients, $P = 0,011$). Chez les patients traités par CTI et MIDO, la détection de plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic (un phénomène qualifié d'interférence clonale) était associée à une hausse du taux de persistance de la mutation *FLT3*-ITD au stade R/R (clones multiples : 88% vs clone unique : 57%, $P = 0,049$). Au sein des deux groupes de traitement combinés, bien que seulement 24% des microclones *FLT3*-ITD détectés au diagnostic aient été conservés à la rechute, 43% d'entre eux sont devenus des macroclones. Au total, ces résultats identifient des paramètres influençant l'évolution des clones *FLT3*-ITD et soulignent l'importance d'utiliser des techniques sensibles pour rechercher les mutations *FLT3*-ITD en pratique clinique.

Manuscript : Midostaurin shapes macroclonal and microclonal evolution of FLT3-mutated acute myeloid leukemia

Auteurs : Romane Joudinaud*, Augustin Boudry*, Laurène Fenwarth, Sandrine Geffroy, Mikaël Salson, Hervé Dombret, Céline Berthon, Arnaud Pigneux, Delphine Lebon, Pierre Peterlin, Simon Bouzy, Pascale Flandrin-gresta, Emmanuelle Tavernier, Martin Carre, Sylvie Tondeur, Lamya Haddaoui, Raphaël A. Itzykson, Sarah Bertoli, Audrey Bidet, Eric Delabesse, Mathilde Hunault, Christan Récher, Claude Preudhomme, Nicolas Duployez*, et Pierre-Yves Dumas*

(*equally contributors)

Stade : publié en 2024

Revue : *Blood Advances*

Article Title: Midostaurin shapes macroclonal and microclonal evolution of *FLT3*-mutated acute myeloid leukemia

Short title: Midostaurin shapes clonal evolution of *FLT3*^{mut} AML

Authors: Romane Joudinaud^{*1,2}, Augustin Boudry^{*2,3}, Laurène Fenwarth^{1,2}, Sandrine Geffroy^{1,2}, Mikaël Salson⁴, Hervé Dombret⁵, Céline Berthon⁶, Arnaud Pigneux⁷, Delphine Lebon⁸, Pierre Peterlin⁹, Simon Bouzy¹⁰, Pascale Flandrin-Gresta¹¹, Emmanuelle Tavernier¹², Martin Carre¹³, Sylvie Tondeur¹⁴, Lamy Haddaoui¹⁵, Raphael Itzykson^{5,16}, Sarah Bertoli¹⁷, Audrey Bidet¹⁸, Eric Delabesse¹⁹, Mathilde Hunault²⁰, Christian Récher¹⁷, Claude Preudhomme^{1,2}, Nicolas Duployez^{*1,2} and Pierre-Yves Dumas^{*7}

Affiliations:

¹Inserm UMR1277, CNRS UMR9020-CANTHER, Université de Lille, Lille University Hospital, Lille, France

²Hematology Laboratory, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Lille, Lille, France

³Université de Lille, CHU de Lille, ULR 2694 – Metrics, 1 place de Verdun, 59045 Lille, France

⁴Univ. Lille, CNRS, Centrale Lille, UMR 9189 CRISAL, F-59000 Lille, France

⁵Département Hématologie et Immunologie, Hôpital Saint-Louis, Assistance Publique-Hôpitaux de Paris, F-75010 Paris, France

⁶Hematology Department, CHU Lille, Lille, France

⁷CHU Bordeaux, Service d'Hématologie Clinique et de Thérapie Cellulaire, F-33000, Bordeaux, France

⁸Hematology Department, CHU Amiens-Picardie, Amiens, France

⁹Service d'hématologie clinique, Nantes University Hospital, Nantes, France

¹⁰Hematology Biology, Nantes University Hospital, Nantes, France

¹¹Hematology Laboratory, University Hospital, Saint-Etienne, France

¹²Département d'hématologie clinique, Centre Hospitalier Universitaire de Saint-Étienne, Saint-Priest-en-Jarez, France

¹³Département d'hématologie, CHU de Grenoble, Grenoble, France

¹⁴CHU Grenoble, Laboratoire de Génétique des hémopathies, Institut de Biologie et Pathologie, Grenoble, France

¹⁵FILO Tumor Bank, Pitié-Salpêtrière Hospital, Paris, France

¹⁶Université Paris Cité, Génomes, biologie cellulaire et thérapeutique U944, INSERM, CNRS, F-75010 Paris, France

¹⁷Service d'Hématologie, CHU Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse Oncopole, Université Toulouse III Paul Sabatier, Toulouse, France

¹⁸CHU Bordeaux, Laboratoire d'Hématologie Biologique, F-33000 Bordeaux, France

¹⁹Laboratoire d'Hématologie Biologique, Centre Hospitalier Universitaire de Toulouse, Institut Universitaire du Cancer de Toulouse Oncopole, Toulouse, France

²⁰Département des Maladies du Sang, Centre Hospitalier Universitaire Angers, INSERM, CNRS, CRCI2NA, Fédération Hospitalo-Universitaire Grand Ouest Against Leukemia, Université d'Angers, Université de Nantes, Angers, France

Corresponding author:

Pr. Pierre-Yves Dumas, CHU Bordeaux, Hématologie Clinique et Thérapie Cellulaire, F-33000, Bordeaux, France. Phone: +33557656511, Fax: +33557656514, pierre-yves.dumas@u-bordeaux.fr

Text word count: 3623/4000

Abstract word count: 250/250

Number of figures and tables: 3 figures and 2 tables

Number of references: 24/100

Scientific category: Myeloid Neoplasia

Key Points:

- *FLT3*-ITD persist after intensive chemotherapy with and without midostaurin in 68% and 87.5% of patients, respectively
- The number of initial *FLT3*-ITD microclones and macroclones affects the *FLT3*-ITD persistence rate following midostaurin

Abstract

Despite the use of midostaurin (MIDO) with intensive chemotherapy (ICT) as the front-line treatment for *FLT3*-mutated acute myeloid leukemia (AML), complete remission rates are close to 60-70%, and relapses occur in over 40% of cases. Here we studied the molecular mechanisms underlying refractory/relapsed (R/R) situation in *FLT3*-mutated AML patients. We conducted a retrospective and multicenter study involving 150 patients with R/R AML harboring *FLT3*-ITD (n=130) and/or *FLT3*-TKD (n=26) at diagnosis assessed by standard methods. Patients were treated in front-line with ICT + MIDO (n=54) or ICT alone (n=96) according to the diagnosis date and label of MIDO. The evolution of *FLT3* clones and co-mutations was analyzed in paired diagnosis-R/R samples by targeted high-throughput sequencing. Using a dedicated algorithm for *FLT3*-ITD detection, 189 *FLT3*-ITD microclones (allelic ratio [AR] < 0.05) and 225 macroclones (AR ≥ 0.05) were detected at both time points. At R/R disease, the rate of *FLT3*-ITD persistence was lower in patients treated with ICT + MIDO compared with patients not receiving MIDO (68% vs. 87.5%, $P=0.011$). In patients receiving ICT + MIDO, detection of multiple *FLT3*-ITD clones (referred to as “clonal interference”) was associated with a higher *FLT3*-ITD persistence rate at R/R disease (multiple clones: 88% vs. single clones: 57%, $P=0.049$). Considering both treatment groups, if only 24% of *FLT3*-ITD microclones detected at diagnosis were retained at relapse, 43% of them became macroclones. Together, these results identify parameters influencing the fitness of *FLT3*-ITD clones and highlight the importance of using sensitive techniques for *FLT3*-ITD screening in clinical practice.

Introduction

Acute myeloid leukemia (AML) is a heterogeneous group of aggressive hematological malignancies defined by the infiltration of bone marrow (BM) and peripheral blood with immature hematopoietic myeloid cells, primarily diagnosed in the elderly.¹ The clinical, biological, and prognostic features of AML are driven by underlying genetic abnormalities.² Among these, *Fms-like tyrosine kinase 3 (FLT3)* gene mutations are one of the most common and play critical role in guiding therapeutic decisions.^{2,3} *FLT3* mutations mainly include *FLT3*-internal tandem duplications (*FLT3*-ITD) and point mutations in the tyrosine kinase domains (*FLT3*-TKD) affecting 22-30% and 5-10% of AML patients respectively.³⁻⁵ Only *FLT3*-ITDs are associated with higher rates of chemotherapy failure and relapse, and a poorer overall survival (OS).⁶ However, both types of mutations lead to constitutive activation of the *FLT3* receptor and downstream signaling pathways, making them targets for type I *FLT3* inhibitors (*FLT3*i).⁷ Standard method for *FLT3* screening is based on fragment analysis (FA) with PCR amplification followed by capillary electrophoresis detection, providing the allelic ratio (AR) and the length of the mutation.^{2,8}

In the RATIFY trial assessing the combination of the type I *FLT3*i midostaurin (MIDO) with intensive chemotherapy (ICT), an AR threshold of 0.05 was used for MIDO eligibility.⁹ For several years, this association has become the first-line standard of care in patients diagnosed with *FLT3*-mutated AML. However, complete remission (CR) rates are close to 60-70%, and relapses occur in over 40% of cases, demonstrating the ability of leukemic stem cells to resist and evade therapy.⁹ Such capacity may be related to the acquisition of on-target *FLT3* mutations or to the activation of alternative signaling pathways, especially the RAS pathway.¹⁰ The study of paired diagnosis/relapse samples has shown that *FLT3*-ITD status is still positive in 87.5% and 51% of cases following ICT alone and ICT + MIDO respectively.^{10,11} Moreover, it has been shown that *FLT3*-ITD mutated AML at relapse can originate from clones with a low AR (< 0.05) or ones that were undetectable at diagnosis by routine FA.^{12,13} However, little is known about the prevalence and overall behavior of such microclones (here defined as clones with an AR < 0.05) under therapy. In this context, high-throughput sequencing (HTS) appears to be a relevant technique for assessing the entire mutational landscape of AML, including the characteristics of *FLT3*-ITD mutations (i.e. nucleotide sequence

and gene insertion site) with increased sensitivity. Recently, our team reported a dedicated algorithm for *FLT3*-ITD detection from HTS data called FiLT3r, allowing the detection of *FLT3*-ITD clones at an AR threshold of 0.0003.¹⁴

In this study, we analyzed a cohort of 150 patients with relapsed or refractory (R/R) AML who had a positive *FLT3* screening with FA-based methods at diagnosis and were treated with either ICT alone or ICT combined with MIDO. By employing HTS at both diagnosis and R/R stage, we identified the evolution of *FLT3*-ITD positive microclones ($0.0003 \leq \text{AR} < 0.05$) and macroclones ($\text{AR} \geq 0.05$) as well as their co-mutations under selective pressure of ICT with or without MIDO.

Methods

Patients and samples

We conducted a retrospective and multicenter study involving patients with R/R AML harboring *FLT3* mutation at diagnosis detected by standard method. The presence of *FLT3* mutations was defined by a positive *FLT3*-ITD signal by FA on genomic DNA and/or *FLT3*-TKD positivity by FA on Eco RV-digested genomic DNA.⁸ The AR of the mutation was defined as the ratio of the area under the curve for *FLT3*-mutated signal divided by the area under the curve for *FLT3* wild-type (WT) signal (for samples harboring multiple *FLT3*-ITD mutations, the ARs of each clone were summed to obtain a single value per sample). Patients with unavailable samples at diagnosis and/or R/R disease were excluded.

Paired BM samples obtained at the time of *FLT3*-mutated AML diagnosis and R/R disease of 150 patients were studied. The patients were diagnosed between 2009 and 2023 and were treated with ICT alone (n=96, 64%) or ICT + MIDO (n=54, 36%), according to the applicable recommendations at the date of diagnosis. One hundred and three (69%) patients were in CR with or without (CRi) complete hematologic recovery after one induction course. Overall, 30 patients were classified as refractory (ICT + MIDO, n=12; ICT, n=18) and 120 patients were classified as relapsed (ICT + MIDO, n=42; ICT, n=78).

Additionally, 68 BM samples from patients at diagnosis of myeloproliferative neoplasms were used as *FLT3*-ITD negative controls. This study was approved by the institutional review board of the tumor bank of Lille University Hospital (CSTMT289) and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki and French ethics regulations.

High-throughput sequencing

Genomic DNA was extracted following standard procedures. For each sample, an amount of 40 ng of DNA was sequenced using the following methodology. Libraries were prepared according to the Twist next generation sequencing target enrichment solution (Twist Bioscience®), following the manufacturer's instructions with a custom-designed 48-gene panel (Table S1) and run on NovaSeq 6000 platform (Illumina®), using paired-end sequencing (2 × 151 base pairs [bp]). Regions of interest were successfully sequenced with an average depth of 3000X.

Bioinformatics analysis

The bioinformatics methodology followed a systematic procedure: BCL files generated by the sequencer were initially transformed into FASTQ format using bclconvert (v3.8.4). Subsequently, FASTQ were trimmed by fastp (v0.20.0). The processed reads were then aligned to the reference genome (hg19) using the bwa-mem aligner (v0.7.17). To identify genetic variants, we employed two distinct variant callers: Mutect2 (v4.1.0.0) and Vardict (v1.5.8). Copy number analysis was performed according to the "GATK Best Practices" (© Broad Institute 2022). Simultaneously, FASTQ were analyzed using the FiLT3r algorithm (4f569307), a specialized tool for robust detection and quantification of *FLT3*-ITD mutations.¹⁴ For each ITD detected, FiLT3r AR was assessed by the ratio between the mutated reads and the WT reads; FiLT3r variant allele frequency (VAF) was assessed by the ratio between the mutated reads and total reads (mutated reads added to WT reads). Normalized VAFs (Norm-VAFs) were defined by the ratio between the FiLT3r VAFs of *FLT3*-ITDs and the VAFs of *NPM1* mutations (considering such mutations are representative of the whole leukemic population), whenever applicable.

Statistical analysis

Continuous data were summarized descriptively including the number of patients (n), mean, standard deviation (SD), median, interquartile range (IQR=p25-p75), minimum and maximum. Categorical data were summarized by frequencies and percentages. Percentages were based on the number of patients with no missing data. For the comparison of continuous variables between two groups, either an unpaired two-sample t-test or a paired two-sample t-test was applied, depending on the nature of the data. In case of small sample (n < 30) exhibiting a non-normal

distribution, a non-parametric two-sided Wilcoxon test was used. The assessment of distribution normality was performed through graphical methods. The analysis of categorical variables was accomplished using chi-square or Fisher's exact test. To predict the outcome of individual *FLT3*-ITD clones based on their initial characteristics, we performed multivariate logistic regression on variables of interest including ITD AR, clonal interference, ITD length, ITD insertion site and treatment. Variables were discretized when continuous predictor variables and the logit of the outcome were not linear. The absence of multicollinearity was ascertained using the variance inflation factor method. Statistical analysis was performed using R version 4.3.2, and statistical significance was defined as a p-value of less than 0.05.

Data sharing statement

Some de-identified data will be shared with other researchers upon reasonable request to the corresponding author. The sharing will require a detailed proposal to the study investigators, and a data transfer agreement must be signed.

Results

Cohort characteristics

One hundred and fifty patients with R/R AML were included and harbored *FLT3*-ITD (n=130 with AR \geq 0.01 including 115 with AR \geq 0.05) and/or *FLT3*-TKD (n=26) at diagnosis, assessed by standard methods. Eighty-two (54.7%) patients had an *NPM1* co-mutation. The median age was 51.0 years (IQR: 43.0-57.0), with 134 patients (89.3%) having *de novo* AML. Biological characteristics were comparable between the two treatment groups (Table 1). Most of patients (n=98, 65.3%) had an intermediate European LeukemiaNet 2022 genetic risk.

Evolution of FLT3-ITD clones between diagnosis and R/R disease at the patient level

The evolution of *FLT3*-ITD mutations was examined by HTS in paired diagnosis and R/R BM samples from 150 patients. Sequencing data were processed with the FiLT3r algorithm allowing to detect small *FLT3*-ITD clones with an AR \geq 0.0003. Using this approach, we categorized *FLT3*-ITD mutations as microclones if the AR was less than 0.05 and as macroclones if the AR was 0.05 or greater. The specificity of *FLT3*-ITD detection was confirmed by processing negative controls, and the

presence of some *FLT3*-ITD microclones was validated using droplet digital PCR (Supplemental Methods). A total of 270 *FLT3*-ITD clones were detected in diagnostic samples including 141 (52%) microclones and 129 (48%) macroclones (Figure S1). Among 144 *FLT3*-ITD clones detected in R/R samples, 48 (33%) were microclones and 96 (67%) were macroclones. Among the patients included on the basis of a *FLT3*-TKD mutation and classified *FLT3*-ITD negative at diagnosis by FA (n=20), 25% (5/20 patients) actually harbored *FLT3*-ITD microclones at diagnosis unveiled by HTS. Thus, a total of 135 patients were initially positive for *FLT3*-ITD by HTS, among which 112 patients harbored at least one macroclone and the remaining 23 patients harbored only microclones. At the time of diagnosis, the characteristics of the microclones were similar to those of the macroclones in terms of length and insertion site (Table S2).

To describe the evolution of *FLT3*-ITD clones, we focused on patients harboring *FLT3*-ITD mutations at diagnosis. Considering *FLT3*-ITD macroclones only, the rate of *FLT3*-ITD persistence at R/R disease was lower in patients treated with ICT + MIDO compared to patients receiving ICT alone (58% [22/38] vs. 85% [63/74]; $P=0.0023$). The persistence rates were 64% (18/28) vs. 88% (51/58) at relapse ($P=0.019$) and 40% (4/10) vs. 75% (12/16) at refractory status in ICT + MIDO-treated patients and ICT-treated ones, respectively (Figure 1A). Considering both micro and macroclones, the rate of *FLT3*-ITD persistence at R/R disease was also lower in patients treated with ICT + MIDO compared to patients receiving ICT alone (68% [32/47] vs. 87.5% [77/88]; $P=0.011$). The persistence rates were 71% (25/35) vs. 87% (61/70) at relapse and 58% (7/12) vs. 89% (16/18) at refractory status in ICT + MIDO-treated patients and ICT-treated ones respectively (Figure 1A).

Among the 135 patients harboring *FLT3*-ITD micro or macroclones at diagnosis, 72 had a single *FLT3*-ITD clone and 63 had multiple *FLT3*-ITD clones (henceforth referred to as “clonal interference”), respectively (Figure 1B). Among patients with multiple *FLT3*-ITD clones, the median number of ITDs per patient was 3. In further detail, 27 patients had 2 ITDs (42.9%), 19 patients had 3 ITDs (30.2%), 8 patients had 4 ITDs (12.7%), 4 patients had 5 ITDs (6.3%), 3 patients had 6 ITDs (4.8%), 1 patient had 8 ITDs (1.6%) and 1 patient had 9 ITDs (1.6%). The majority of patients with multiple *FLT3*-ITD clones harbored a single macroclone and one or several microclone(s) (55.6% [35/63]). In the 72 patients with a single *FLT3*-ITD clone, the addition of MIDO to ICT was associated with a lower rate of *FLT3*-ITD

positivity at R/R disease compared to patients receiving ICT alone (57% [17/30] vs. 88% [37/42]; $P=0.005$). In the 63 patients who harbored multiple *FLT3*-ITD clones at diagnosis, the addition of MIDO to ICT did not impact the *FLT3*-ITD persistence rate at R/R disease (ICT + MIDO: 88% [15/17] vs. ICT: 87% [40/46]).

Accordingly, following ICT + MIDO, the *FLT3*-ITD persistence rate was lower in patients harboring a single *FLT3*-ITD clone compared to patients harboring multiple clones (57% [17/30] vs. 88% [15/17], $P=0.049$) whereas there was no difference in patients treated by ICT alone (88% [37/42] vs. 87% [40/46]). The evolution of patients harboring multiple *FLT3*-ITD clones at diagnosis was similar across the two treatment groups, predominantly shaped by the simplification of the *FLT3*-ITD repertoire upon R/R disease i.e. the loss of part of the initial clones (ICT + MIDO: 71% [12/17]; ICT: 67% [31/46]) (Figure 1B).

Among the 109 patients retaining a positive *FLT3*-ITD status at R/R disease following either ICT or ICT + MIDO, this simplification of *FLT3*-ITD repertoire is highlighted by the decrease in the rate of patients harboring multiple *FLT3*-ITD clones between diagnosis and R/R disease (50% [55/109] vs. 23% [25/109]; $P=0.014$) (Figure S2). In those 109 patients, enrichment of the *FLT3*-ITD repertoire upon R/R disease through the acquisition of new *FLT3*-ITD clones was a rare phenomenon (ICT + MIDO: 16% [5/32]; ICT: 9% [7/77]) (Figure 1B). All those results were consistent, although non-significant due to the small number of patients, when refractory and relapsed patients were analyzed separately (Figures S3A-B).

Evolution of the allele burden between diagnosis and relapse at the patient level

Following a qualitative analysis of clonal evolution based on the binary presence or absence of *FLT3*-ITD clones, we carried out a quantitative analysis (Table S3). Since the number of patients with refractory disease was limited, we restricted the quantitative analysis to relapsed patients. In *NPM1*-mutated patients, we calculated Norm-VAFs of *FLT3*-ITD mutations to limit the impact of sample dilution on the allele burden. For samples harboring multiple *FLT3*-ITD micro or macroclones, the ARs or the Norm-VAFs of each clone were summed to obtain a single value per sample, namely \sum ARs or \sum Norm-VAFs. We observed that \sum Norm-VAFs increased between diagnosis and relapse in each treatment group, strengthening the role of *FLT3*-ITD clones in the relapse process (median \sum Norm-VAFs; ICT + MIDO: 0.87 vs. 1.2; $P <$

0.001 and ICT: 0.96 vs. 1.7; $P < 0.001$) (Figure 2A, Table S3), independently of MIDO. Nevertheless, patients who received MIDO displayed lower \sum ARs ($P=0.034$) and \sum Norm-VAFs ($P=0.02$) at relapse as compared with patients who received ICT alone, indicating that the expansion of *FLT3*-ITD clones at relapse is probably dampened by MIDO.

Evolution of FLT3-ITD clones between diagnosis and relapse at the clone level

After investigating the evolution of *FLT3*-ITD mutations at the patient level, we examined their evolution at the clonal level. Overall, only the minority of initial *FLT3*-ITD micro and macroclones were conserved at relapse, both in the ICT + MIDO group (44% [27/61]) and in the ICT alone group (46% [72/157]) (Table S4). To determine the factors influencing the fate of the *FLT3*-ITD micro- and macroclones detected at diagnosis, we compared the initial characteristics between *FLT3*-ITD clones that were retained or lost at relapse in each treatment group (Table S4). Lost *FLT3*-ITDs had significantly lower ARs than retained ones, both in the ICT + MIDO group (median AR: 0.011 vs. 0.38; $P < 0.001$) and in the ICT group (0.0054 vs. 0.31; $P < 0.001$) (Figure 2B, Table S4). The results were consistent after adjusting for tumor dilution (Figure S4, Table S4). Accordingly, only 24% (28/117) of *FLT3*-ITD microclones were retained at the time of relapse in both treatment groups combined, of which 43% became macroclones (12/28) (Figure 2C). In further detail, 26% (23/88) of microclones were retained at the time of relapse in patients treated with ICT only, of which 48% (11/23) became macroclones. In patients receiving ICT + MIDO, only 17% of microclones (5/29) were retained at the time of relapse, of which 20% became macroclones (1/5).

In the whole cohort, the lost clones had significantly lower ITD lengths than retained clones (median length: 42 vs. 54 bp; $P=0.037$) (Table S4). In a multivariate logistic regression model, $AR \geq 0.5$ was strongly predictive of clone persistence (odds ratio [OR]: 7.89; 95% confidence interval [95% CI]: 2.7-29; $P < 0.001$) while microclones (OR: 0.31; 95% CI: 0.15-0.64; $P=0.0014$) as well as competing clones (clonal interference, OR: 0.40; 95% CI: 0.17-0.94; $P=0.038$) were more likely to be eradicated at relapse (Table 2). The ITD length, the insertion site and the treatment had no significant impact on clonal evolution in multivariate analysis (Table 2).

Molecular landscape at diagnosis and R/R disease

Molecular landscape was examined by HTS at diagnosis and R/R disease using a panel targeting 48 genes (Table S1). At diagnosis, the landscape of driver mutations was similar between the two treatment groups (Figure 3A-B). Genes most frequently mutated at diagnosis were *DNMT3A* and *NPM1*.

We focused on patients harboring *FLT3*-ITD mutations at diagnosis as assessed by HTS to identify molecular mechanisms of progression. Genes which most frequently became mutated at relapse were *FLT3* (regarding point mutations [9%]) and *WT1* (9%) in the 35 patients treated with ICT + MIDO vs. *WT1* (16%) in the 70 patients treated with ICT alone (Figure 3C). Excluding *FLT3* mutations, emerging mutations in genes involved in signaling pathways were found in 11% of patients who relapsed after treatment with ICT + MIDO (*NRAS*: 6% [2/35], *PTPN11* + *NF1*: 3% [1/35], *CSF3R*: 3% [1/35]). Several genes became mutated at the time of refractory disease, but each of these genes was involved only once (Figure 3D).

Discussion

We sought to identify the molecular mechanisms underlying R/R disease in patients diagnosed with *FLT3* mutated AML and treated with ICT +/- MIDO. To this end, *FLT3* mutations and co-mutations were screened by HTS at diagnosis and R/R disease to unravel clonal evolution. For accurate annotation and quantification of *FLT3*-ITDs from HTS data, we used the FiLT3r algorithm¹⁴, able to detect small *FLT3*-ITD clones with an AR ≥ 0.0003 . In our cohort, a total of 270 *FLT3*-ITD clones were detected by HTS at diagnosis, including 141 clones (52%) with an AR below 0.05 and 129 clones (48%) with an AR above this limit, respectively designated microclones and macroclones. The average number of *FLT3*-ITD clones per patient at diagnosis was higher in the current study (2.0 [270/135] *FLT3*-ITDs per patient) compared to previous studies using FA (1.14¹⁵, 1.17¹⁶, 1.33¹⁷ *FLT3*-ITD per patient). Moreover, the rate of patients harboring multiple *FLT3*-ITD clones at diagnosis was higher in the current study (47% [63/135]) compared to previous studies based on FA (12%¹⁵, 14%¹⁶, 23%⁶, 27%¹⁷). The presence of multiple *FLT3*-ITD clones was referred to as “clonal interference”, a concept from evolutionary biology describing the emergence of several clones harboring independent lesions and competing with each other in the same population.^{18,19}

At R/R disease, the rate of *FLT3*-ITD persistence was significantly lower in patients treated with MIDO (68%) compared with patients not receiving MIDO (87.5%), as previously described.¹⁰ More precisely, the persistence rates reached 71% vs. 87% at relapse and 58% vs. 89% at refractory disease, in ICT + MIDO-treated patients and ICT-treated ones respectively. Regarding relapsed patients treated with ICT alone, this rate is in line with former data.^{11,20,21} However, regarding R/R patients treated with the ICT + MIDO combination, there is a discrepancy with a previous study by Schmalbrock *et al.* in which the persistence rate amounted to 54% at R/R disease.¹⁰ This discrepancy is probably related to the use of distinct *FLT3*-ITD screening methods. Indeed, in the former study, *FLT3*-ITD mutations were screened by FA using an AR threshold of 0.05.^{9,10} In our study, the screening of *FLT3*-ITD mutations by HTS revealed that 46% of clones detected at both time points were microclones, defined by an AR below 0.05. Factoring in only the macroclones detected by HTS, the persistence rate after treatment with ICT + MIDO decreased to 58% at R/R disease, in keeping with the previous study by Schmalbrock *et al.*¹⁰

In R/R patients, a key finding of our work was that the addition of MIDO to ICT significantly decreased the *FLT3*-ITD persistence rate of patients harboring a single *FLT3*-ITD clone (ICT + MIDO: 57% vs. ICT: 88%) but not that of patients harboring multiple *FLT3*-ITD clones. Accordingly, in patients receiving ICT + MIDO, our data demonstrated that clonal interference was associated with a greater ability to select a *FLT3*-ITD clone at R/R disease (multiple clones: 88% vs. single clone: 57%, $P=0.049$). Further data are warranted to determine if clonal interference affects the prognosis of patients treated with ICT + MIDO or other *FLT3*i such as quizartinib.²² Regarding patients treated with ICT exclusively, the presence of multiple *FLT3*-ITD clones at diagnosis has been correlated with lower CR rates, event-free survival and OS^{6,15,23}, although these findings have been challenged by other studies.^{16,17,24}

After analyzing the evolution of *FLT3*-ITD mutations at the patient level, we performed a multivariate logistic regression to predict the outcome of individual *FLT3*-ITD clones based on their initial characteristics. In this model, an AR ≥ 0.5 favored clonal persistence at relapse whereas microclones and clones subjected to clonal interference were more likely to be eradicated, clearing the way to the fittest *FLT3*-ITD clone. Considering the limited number of persisting microclones in our cohort, additional studies are warranted to uncover the factors underlying the persistence of certain microclones.

Overall, the best predictor of *FLT3*-ITD persistence in a patient would likely be an indicator that reflects not only the number of *FLT3*-ITD clones but also the fraction of leukemic cells carrying each *FLT3*-ITD. However, as the bulk HTS approach cannot determine whether cells are heterozygous or homozygous for a given mutation, it is not suitable to calculate such an indicator.

Other relapse-related changes included the acquisition of additional mutations. In patients harboring *FLT3*-ITD mutations at diagnosis as assessed by HTS, *WT1* gene frequently became mutated at relapse both following ICT + MIDO (9%) and ICT only (16%). Moreover, genes involved in signaling pathways (except *FLT3*) were newly mutated in 11% of patients who relapsed after treatment with ICT + MIDO, in line with a previous study.¹⁰

In summary, MIDO shaped the evolution of patients with a single *FLT3*-ITD clone in our cohort. In these patients, the addition of MIDO to ICT was associated with a lower rate of *FLT3*-ITD persistence at R/R disease. These findings emphasize the need to reassess *FLT3*-ITD status at R/R disease before implementing targeted therapy. Moreover, our study revealed that *FLT3*-ITD microclones are capable of driving relapse. Prospective studies are warranted to elucidate the impact of *FLT3*-ITD microclones in AML patients tested *FLT3*-ITD negative at diagnosis using standard FA-based methods.

Acknowledgements: The authors thank Maxime Bucci and Nathalie Helevaut for technical help. They also thank Lamy Haddaoui and Krishshanti Sinnadurai (tumor bank for the FILO group, no. BB-033-00073, Hôpital Pitié-Salpêtrière, Paris) as well as Christophe Roumier (tumor bank for the ALFA group, certification NF 96900-2014/65453-1) for handling, conditioning, and storing patients' samples. The work of all investigators from the ALFA-FILO group and clinical research assistants is also acknowledged. This study was supported by the French National Cancer Institute (PRTK 15-125). R.J and N.D were supported by grants from the French League Against Cancer (AAP 2021 du Septentrion, Comité du Pas-de-Calais) and Lille University Hospital (AAP 2021 du Fonds Hospitalier d'aide à l'émergence). R.J received grants from INSERM, Fondation I-SITE ULNE and Laurette Fugain association.

Authorship Contributions: P.Y.D, N.D and C.P designed the study. H.D, C.B, A.P, D.L, P.P, E.T, M.C, L.H, R.I, S.Be, M.H and C.R managed patients and provided clinical data. S.Bo, P.F.G, S.T, A.Bi and E.D provided samples and biological data. S.G performed the experiments. N.D and L.F performed the molecular analyses. A.Bo and M.S performed the bioinformatics analysis. A.Bo and R.J performed the statistical analyses. R.J, N.D and P.Y.D wrote the manuscript. All authors reviewed and approved the manuscript.

Conflict of Interest Disclosures: M.C: Honoraria : Abbvie, Astellas, Jazz, BMS. R.I: Honoraria: Astellas, Daichii-Sankyo. Research support: Novartis. S.Be: Abbvie, Astellas, BMS-Celgene, Jazz Pharmaceuticals, Novartis, Pfizer. C.R: consulting or advisory role with Abbvie, Amgen, Astellas, BMS, Boehringer, Jazz Pharmaceuticals, J&J as well as Servier, received research funding from Abbvie, Amgen, Astellas, BMS, Iqvia and Jazz Pharmaceuticals, and support for attending meetings and/or travel from Abbvie, Novartis and Servier. The remaining authors declare no competing financial interests. P.Y.D: Novartis: Honoraria, Other: Research support for institution; Servier: Honoraria, Other: Research support for institution; BMS: Honoraria, Other: Research support for institution; Abbvie: Honoraria; Astellas: Honoraria, Other: Research support for institution; Daiichi-Sankyo: Honoraria, Other: Research support for institution; Jazz pharmaceutical: Honoraria; Janssen: Honoraria; Roche: Other: Research support for institution. The remaining authors declare no competing financial interests.

Footnotes:

*R.J and A.B, as well as N.D and P.Y.D contributed equally to this study.

Presented in part as an oral presentation (abstract 976) at the 65th annual meeting of the American Society of Hematology, San Diego, CA, 11 December 2023.

References:

1. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Reviews*. 2019;36:70–87.
2. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 2022;140(12):1345–1377.
3. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209–2221.
4. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012;366(12):1079–1089.
5. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016;128(5):686–698.
6. Kottaridis PD, Gale RE, Frew ME, 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;98(6):1752–1759.
7. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood*. 2002;100(5):1532–1542.
8. Thiede C, Steudel C, Mohr B, et al. Analysis of FLT3-activating mutations in 979 patients with acute myelogenous leukemia: association with FAB subtypes and identification of subgroups with poor prognosis. *Blood*. 2002;99(12):4326–4335.
9. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a *FLT3* Mutation. *N Engl J Med*. 2017;377(5):454–464.
10. Schmalbrock LK, Dolnik A, Cocciardi S, et al. Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin. *Blood*. 2021;137(22):3093–3104.
11. Krönke J, Bullinger L, Tleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013;122(1):100–108.
12. Ottone T, Zaza S, Divona M, et al. Identification of emerging FLT3 ITD-positive clones during clinical remission and kinetics of disease relapse in acute myeloid leukaemia with mutated nucleophosmin. *Br J Haematol*. 2013;161(4):533–540.
13. Yokoyama S, Onozawa M, Yoshida S, et al. Subclinical minute FLT3-ITD clone can be detected in clinically FLT3-ITD-negative acute myeloid leukaemia at diagnosis. *British Journal of Haematology*. 2023;201(6):1144–1152.
14. Boudry A, Darmon S, Duployez N, et al. Frugal alignment-free identification of FLT3-internal tandem duplications with FiLT3r. *BMC Bioinformatics*. 2022;23(1):448.
15. Schranz K, Hubmann M, Harin E, et al. Clonal heterogeneity of FLT3-ITD detected by high-throughput amplicon sequencing correlates with adverse prognosis in acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2018;9(53):30128–30145.
16. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to

chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009;114(12):2386–2392.

17. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008;111(5):2776–2784.

18. Maley CC, Aktipis A, Graham TA, et al. Classifying the evolutionary and ecological features of neoplasms. *Nat Rev Cancer*. 2017;17(10):605–619.

19. Lang GI, Rice DP, Hickman MJ, et al. Pervasive genetic hitchhiking and clonal interference in forty evolving yeast populations. *Nature*. 2013;500(7464):571–574.

20. Cloos J, Goemans BF, Hess CJ, et al. Stability and prognostic influence of FLT3 mutations in paired initial and relapsed AML samples. *Leukemia*. 2006;20(7):1217–1220.

21. Shih L-Y, Huang C-F, Wu J-H, et al. Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse. *Blood*. 2002;100(7):2387–2392.

22. Erba HP, Montesinos P, Kim H-J, et al. Quizartinib plus chemotherapy in newly diagnosed patients with FLT3-internal-tandem-duplication-positive acute myeloid leukaemia (QuANTUM-First): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2023;401(10388):1571–1583.

23. Schlenk RF, Kayser S, Bullinger L, et al. Differential impact of allelic ratio and insertion site in FLT3-ITD-positive AML with respect to allogeneic transplantation. *Blood*. 2014;124(23):3441–3449.

24. Meshinchi S, Stirewalt DL, Alonzo TA, et al. Structural and numerical variation of FLT3/ITD in pediatric AML. *Blood*. 2008;111(10):4930–4933.

Tables

Table 1. Baseline characteristics at diagnosis of 150 patients with *FLT3* mutated AML in R/R situation

	Total n=150 (100%)	ICT + MIDO n=54 (36%)	ICT n=96 (64%)	P
Age at diagnosis (years)				
Median (IQR)	51.0 (43.0-57.0)	52.5 (47.0-62.0)	50.0 (41.5-55.0)	0.09
Range	18.0-76.0	23.0-76.0	18.0-73.0	
Gender: n (%)				
Male	72 (48.0)	31 (57.4)	41 (42.7)	0.08
Female	78 (52.0)	23 (42.6)	55 (57.3)	
AML status: n (%)				
<i>De novo</i>	134 (89.3)	47 (87.0)	87 (90.6)	0.5
Secondary AML	16 (10.7)	7 (13.0)	9 (9.4)	
WBC at diagnosis ($\times 10^9/L$)				
Median (IQR)	43.6 (12.1-110.0)	52.0 (15.5-120.9)	36.5 (12.0-110.0)	0.5
Range	0.9-458.0	0.9-458.0	1.1-368.8	
Blasts BM: (%)				
Median (IQR)	81.0 (57.0-89.0)	82.0 (61.0-91.0)	76.5 (51.5-89.0)	0.4
Range	15.0-99.0	15.0-99.0	19.0-98.0	
Blasts PB: (%)				
Median (IQR)	62.0 (26.0-87.0)	68.0 (36.0-89.0)	57.0 (16.0-85.5)	0.3
Range	0.0-98.0	3.0-97.0	0.0-98.0	
ELN 2022 prognosis: n (%)				
Favorable	14 (9.3)	6 (11.1)	8 (8.3)	0.07
Intermediate	98 (65.3)	29 (53.7)	69 (71.9)	
Adverse	38 (25.3)	19 (35.2)	19 (19.8)	
<i>FLT3</i>-ITD†: n (%)				
Mutation	130 (86.7)	43 (79.6)	87 (90.6)	0.08
No mutation	20 (13.3)	11 (20.4)	9 (9.4)	
<i>FLT3</i>-TKD†: n (%)				
Mutation	26 (17.3)	13 (24.1)	13 (13.5)	0.12
No mutation	124 (82.7)	41 (75.9)	83 (86.5)	
<i>NPM1</i>†: n (%)				
Mutation	82 (54.7)	27 (50.0)	55 (57.3)	0.4
No mutation	68 (45.3)	27 (50.0)	41 (42.7)	

† Status assessed by fragment analysis

AML, acute myeloid leukemia; R/R, relapse/refractory; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; IQR, interquartile range; WBC, white blood cells; BM, bone marrow; PB, peripheral blood; ELN, European Leukemia Net

Table 2. Logistic regression model for the persistence of 218 *FLT3*-ITD clones at relapse

Parameter	Odds ratio	95% CI	<i>P</i>
AR \geq 0.5	7.89	2.7-29	< 0.001
Microclones	0.31	0.15-0.64	0.0014
Clonal interference	0.40	0.17-0.94	0.038
ITD length > 51 bp	1.70	0.77-3.8	0.19
Insertion site in TKD1	1.54	0.68-3.5	0.30
ICT + MIDO	0.65	0.30-1.4	0.26

AR, allelic ratio; bp, base pairs; TKD1, tyrosine kinase domain 1; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; CI, confidence interval

Legends

Figure 1: Evolution of FLT3-ITD mutations between diagnosis and R/R disease

A: *FLT3*-ITD status at R/R disease assessed by HTS, according to the treatment group and the type of progression. Left panel: only patients harboring *FLT3*-ITD macroclones at diagnosis are displayed. Only macroclones are taken into account to determine *FLT3*-ITD status at R/R disease. Right panel: patients harboring *FLT3*-ITD microclones and/or macroclones at diagnosis are displayed. Both macroclones and microclones are taken into account to determine *FLT3*-ITD status at R/R disease.

B: Patterns of evolution of *FLT3*-ITD microclones and macroclones between diagnosis and R/R disease, according to the number of *FLT3*-ITD clones detected at diagnosis (either a single clone or multiple clones) and the treatment group. Each square represents one patient. Patterns of evolution (diagnosis -> R/R disease) were assessed by HTS and defined as follows. Identical: clone A -> clone A. Loss: clone A + clone B -> clone A. Gain: clone A -> clone A + clone B. Switch: clone A -> clone B. Complex changes: clone A + clone B -> clone B + clone C. Eradication: clone A -> ∅.

R/R, relapsed/refractory; HTS, high-throughput sequencing; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; Pts, patients.

Figure 2: Quantification of FLT3-ITD clones at diagnosis and relapse by HTS

A: Σ Normalized VAFs per sample at diagnosis and relapse, according to the treatment group. Only patients with a positive *FLT3*-ITD status by HTS at both diagnosis and relapse are displayed.

B: AR at diagnosis for lost and retained *FLT3*-ITD microclones and macroclones upon AML relapse, according to the treatment group.

C: Evolution of the AR of *FLT3*-ITD microclones detected at AML diagnosis. Each line features the evolution of a *FLT3*-ITD microclone between diagnosis and relapse. The threshold is positioned at an AR of 0.05.

ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; AR, allelic ratio; MUT, mutated; VAF, variant allele frequency; Pts, patients; AML, acute myeloid leukemia; HTS, high-throughput sequencing.

Figure 3: Evolution of gene mutations between diagnosis and R/R disease assessed by HTS

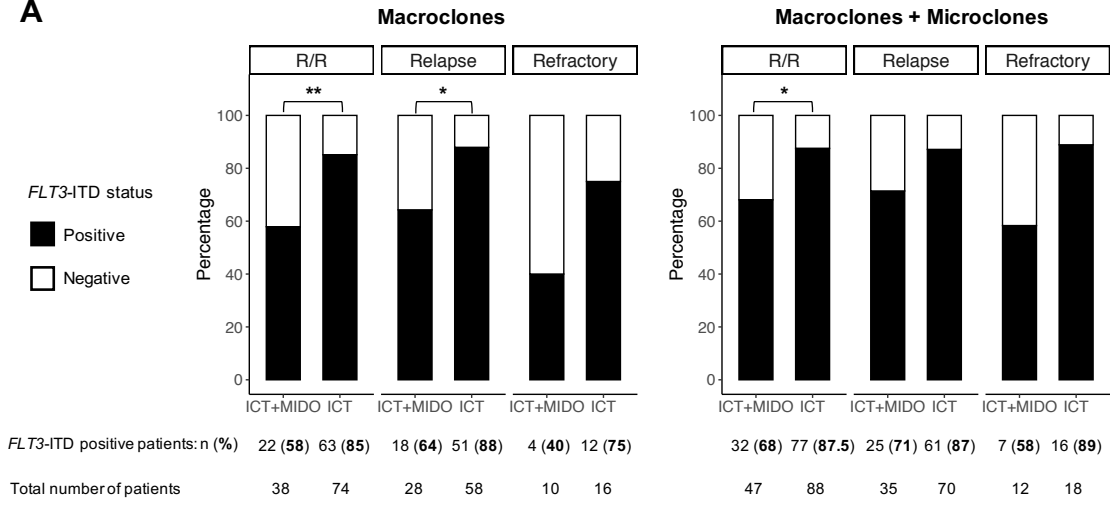
A-B: Evolution of gene mutations between diagnosis and R/R disease, according to the type of progression: relapse (A) or refractory disease (B) and the treatment group. Genes are organized according to their functional class. Each column represents a single patient. For each patient, the evolution of the gene status is indicated by the color of the boxes. For each gene, the number (n) and percentage (%) of mutated patients at each time point are displayed on the right of the figures.

C-D: Evolution of gene mutations among patients who experienced relapse (C) or refractory disease (D), according to the treatment group. Only patients harboring *FLT3*-ITD mutations at diagnosis as assessed by HTS are displayed.

ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; D, diagnosis; R, relapsed or refractory disease; HTS, high-throughput sequencing; R/R, relapsed/refractory; PM, point mutations.

FIGURE 1

A



B

R/R patients with FLT3-ITD mutations at diagnosis detected by HTS (n=135)

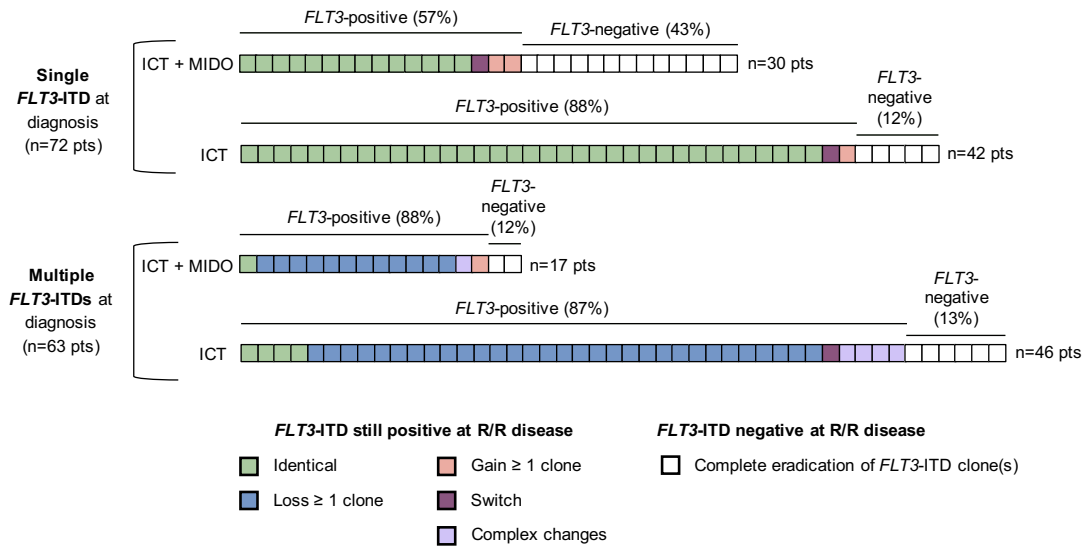
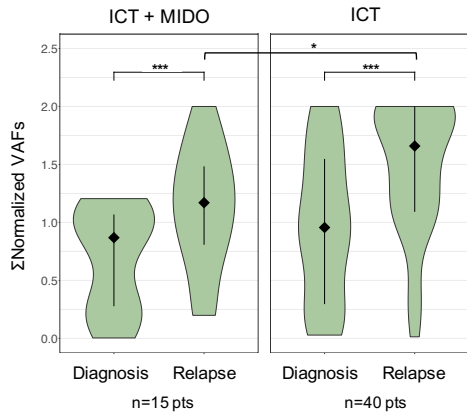
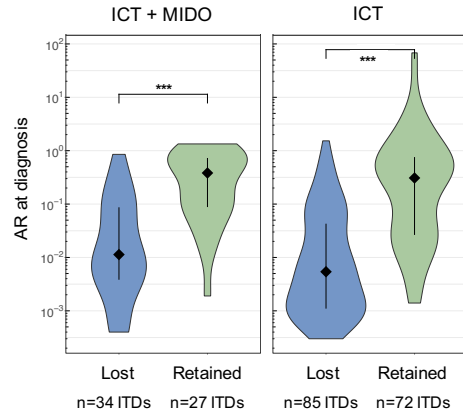


FIGURE 2

A Double mutated *FLT3*-ITD *NPM1*-MUT patients



B *FLT3*-ITD micro and macroclones



C Evolution of *FLT3*-ITD microclones

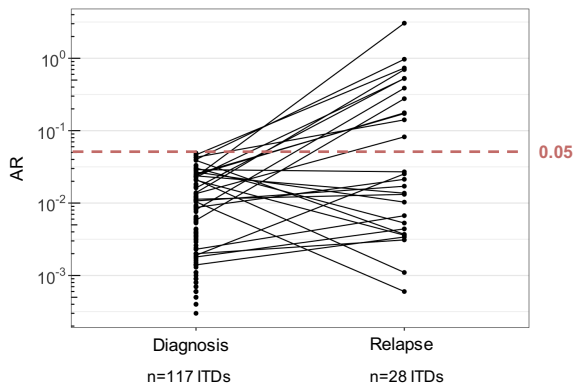
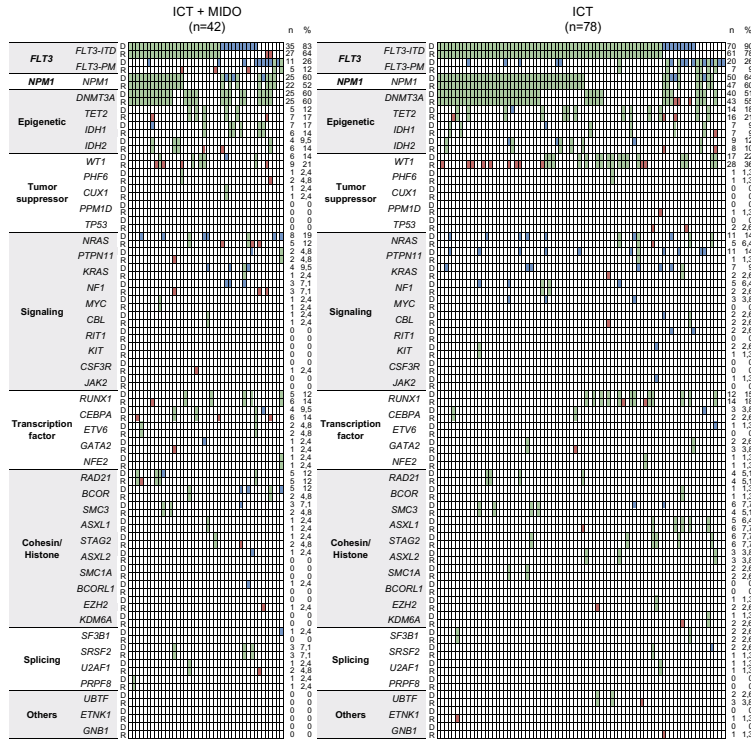
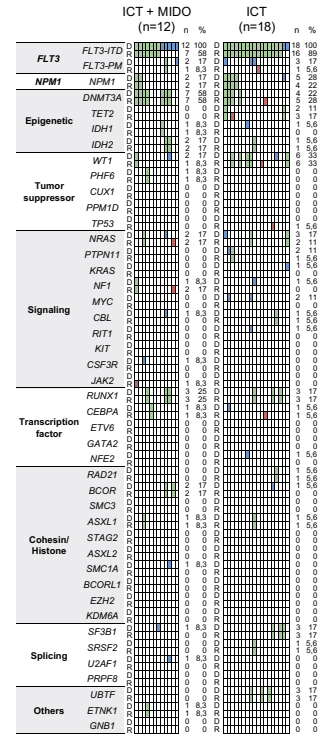


FIGURE 3

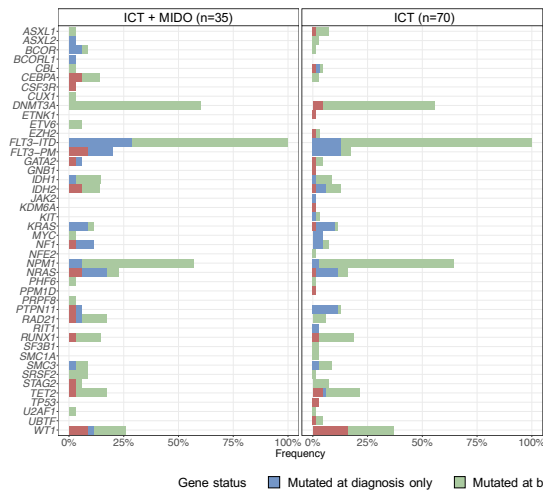
A Relapsed patients (n=120)



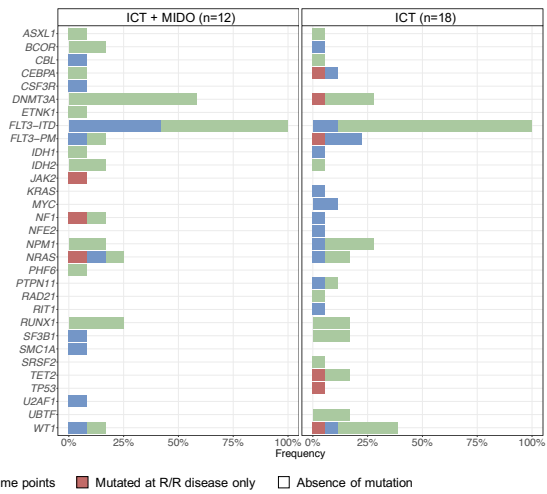
B Refractory patients (n=30)



C Relapsed patients with FLT3-ITD mutations at diagnosis detected by HTS (n=105)



D Refractory patients with FLT3-ITD mutations at diagnosis detected by HTS (n=30)



Supplemental data

Supplemental Methods

Detection and quantification of *FLT3*-ITD by high-throughput sequencing

FLT3-ITD mutations were screened by the FiLT3r algorithm based on high-throughput sequencing (HTS) data. Among the 150 patients included, a total of 414 *FLT3*-ITD clones were detected at both time points: median ITD reads were 234.5 (range: 2–5440), median allelic ratio (AR) was 0.08 (range: 0.0003–68.1), and the median length was 51 bp (range: 3–264 bp). At diagnosis, median *FLT3*-ITD AR were 0.0038 (range: 0.0003–0.049) and 0.46 (range: 0.056–68.1) for microclones and macroclones, respectively. There was no correlation between *FLT3*-ITD AR and length at diagnosis, indicating the absence of amplification bias towards particular ITDs.

Validation of FiLT3R specificity

To determine whether *FLT3*-ITD microclones could be false positive events, we deployed several approaches. Firstly, given that *FLT3*-ITD mutations are not involved in myeloproliferative neoplasms (MPN), we used 68 diagnostic samples from patients affected with MPN as *FLT3*-ITD negative controls. Sequencing of these samples using the same procedure as acute myeloid leukemia samples did not reveal any *FLT3*-ITD (Figure S1). Secondly, we verified 6 *FLT3*-ITD microclones detected by HTS (in 6 distinct samples) by using droplet digital PCR (ddPCR). The 6 *FLT3*-ITD microclones were successfully confirmed by ddPCR (Table S5). Those arguments suggest that *FLT3*-ITD microclones were very unlikely to be related to sequencing errors or sample cross-contamination. Thus, we treated any *FLT3*-ITD detected by FiLT3r as a genuine mutation.

Droplet digital PCR

Regarding *FLT3*-ITD mutations, ddPCR assay systems were designed based on *FLT3*-ITD sequences determined by the FiLT3r algorithm and manufactured by Eurofins®. Regarding wild-type albumin, ddPCR assay system was designed using Bio-Rad®'s “Assay Design Engine” and manufactured by Eurofins®. Droplet digital PCR was performed on genomic DNA, isolated as previously described. Every sample was analyzed in four wells each containing 75 ng of DNA, thus setting the minimum

detection threshold at an AR of 0.000033. Droplets were generated using the Automated Droplet Generator (Bio-Rad). End-point PCR amplification was carried out using the high-performance T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad), setting the hybridization temperature at the value predetermined by temperature gradient experiment. PCR products were then processed by the QX200 Droplet Reader (Bio-Rad), featuring a two-color detection system. Raw data were analyzed using QuantaSoft™ software (Bio-Rad). The quantity of mutated *FLT3*-ITD allele (labeled with FAM fluorochrome) was normalized by the quantity of wild type albumin allele (labeled with the HEX fluorochrome), yielding a ratio. We extrapolated the AR from the *FLT3*-ITD/albumin ratio according to the following procedure. First, we checked that the samples did not display any abnormalities in the copy number of the albumin and *FLT3* genes. Given the absence of such alterations, the quantities (n) of *FLT3* alleles and albumin alleles could be considered identical. Thus, the ratio $n_{FLT3\text{-ITD}}/n_{\text{albumin}}$ was comparable to the variant allele frequency (VAF) of *FLT3*-ITD= $n_{FLT3\text{-ITD}}/(n_{FLT3\text{-WT}}+n_{FLT3\text{-ITD}})$. Lastly, the AR was estimated by the following formula: $AR=VAF/(1-VAF)$.

Supplemental Tables

Table S1: Targets of high-throughput sequencing panel (hg19)

Gene	Target	Transcript
<i>ASXL1</i>	E11-E12	NM_015338.5
<i>ASXL2</i>	E11-E12	NM_018263.4
<i>BCOR</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15	NM_001123385.1
<i>BCORL1</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12	NM_021946.4
<i>BRAF</i>	E11-E15	NM_004333.4
<i>CBL</i>	E08-E09	NM_005188.3
<i>CEBPA</i>	E01	NM_004364.4
<i>CSF3R</i>	E14-E15-E16-E17	NM_156039.3
<i>CUX1</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24	NM_181552.3
<i>DDX41</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17	NM_016222.3
<i>DNMT3A</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23	NM_022552.4
<i>ETNK1</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08	NM_018638.4
<i>ETV6</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08	NM_001987.4
<i>EZH2</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20	NM_004456.4
<i>FLT3</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24	NM_004119.2
<i>GATA2</i>	E02-E03-E04-E05-E06	NM_032638.4
<i>GNAS</i>	E08-E09	NM_000516.5
<i>GNB1</i>	E05-E06	NM_002074.4
<i>HRAS</i>	E02-E03-E04	NM_005343.3
<i>IDH1</i>	E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10	NM_005896.3
<i>IDH2</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11	NM_002168.3
<i>JAK2</i>	E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25	NM_004972.3
<i>KDM6A</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25-E26-E27-E28-E29-E30	NM_001291415.1
<i>KIT</i>	E08-E09-E10-E11-E17	NM_000222.2
<i>KRAS</i>	E02-E03-E04	NM_033360.3
<i>MYC</i>	E01-E02-E03	NM_002467.4
<i>NF1</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25-E26-E27-E28-E29-E30-E31-E32-E33-E34-E35-E36-E37-E38-E39-E40-E41-E42-E43-E44-E45-E46-E47-E48-E49-E50-E51-E52-E53-E54-E55-E56-E57-E58	NM_001042492.2
<i>NFE2</i>	E02-E03	NM_001136023.2
<i>NPM1</i>	E10-E11	NM_002520.6
<i>NRAS</i>	E02-E03-E04	NM_002524.4

<i>PHF6</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10	NM_001015877.1
<i>PPM1D</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06	NM_003620.3
<i>PRPF8</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25-E26-E27-E28-E29-E30-E31-E32-E33-E34-E35-E36-E37-E38-E39-E40-E41-E42-E43	NM_006445.3
<i>PTPN11</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15	NM_002834.4
<i>RAD21</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14	NM_006265.2
<i>RIT1</i>	E05	NM_006912.5
<i>RUNX1</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09	NM_001754.4
<i>SF3B1</i>	E13-E14-E15-E16	NM_012433.3
<i>SMC1A</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25	NM_006306.3
<i>SMC3</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25-E26-E27-E28-E29	NM_005445.3
<i>SRSF2</i>	E01	NM_003016.4
<i>STAG2</i>	E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11-E12-E13-E14-E15-E16-E17-E18-E19-E20-E21-E22-E23-E24-E25-E26-E27-E28-E29-E30-E31-E32-E33-E34-E35	NM_001042749.2
<i>TET2</i>	E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11	NM_001127208.2
<i>TP53</i>	E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11	NM_001126112.2
<i>U2AF1</i>	E02-E06	NM_006758.2
<i>UBTF</i>	E10-E11-E12-E13-E14-E15	NM_014233.3
<i>WT1</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10	NM_024426.4
<i>ZRSR2</i>	E01-E02-E03-E04-E05-E06-E07-E08-E09-E10-E11	NM_005089.3

E, Exon

Table S2: Comparison of characteristics between microclones and macroclones at diagnosis

	All ITDs (microclones and macroclones) n=270 ITDs	Microclones (AR < 0.05) n=141 ITDs (52%)	Macroclones (AR ≥ 0.05) n=129 ITDs (48%)	P (microclones vs. macroclones)
<i>FLT3</i> -ITD bp length				
Median [IQR] (range)	51 [27–69] (3–264)	45 [27–66] (6–264)	51 [30–75] (3–225)	0.24
<i>FLT3</i> -ITD insertion site				
JMD: n (%)	184 (68%)	96 (68%)	88 (68%)	1
TKD1: n (%)	86 (32%)	45 (32%)	41 (32%)	

AR, allelic ratio; bp, base pair; IQR, interquartile range; JMD, juxtamembrane domain; TKD1, tyrosine kinase domain 1

Table S3: Paired samples comparisons between diagnosis and relapse

(Only patients with a positive *FLT3*-ITD status by HTS at both diagnosis and relapse are displayed)

Variable	ICT + MIDO n=25 pts			ICT n=61 pts			ICT + MIDO vs. ICT	
	Diagnosis	Relapse	P	Diagnosis	Relapse	P	P diagnosis	P relapse
Total number of ITDs (n)	46	31		137	79			
Samples with multiple ITD clones			0.12			0.26	0.48	0.40
n (%)	12 (48%)	4 (16%)		35 (57%)	16 (26%)			
∑ARs of ITDs								
Median [IQR] (range)	0.49 [0.0925–0.74] (0.0019–1.3)	0.27 [0.057–0.54] (0.0036–4.5)	0.40	0.57 [0.20–0.87] (0.010–68)	0.54 [0.18–1.5] (0.0011–21)	0.51	0.25	0.034
∑Norm-VAFs*								
Median [IQR] (range) Number of pts	0.87 [0.28–1.1] (0.0040–1.2) 15 pts	1.2 [0.81–1.5] (0.20–2) 15 pts	< 0.001	0.96 [0.30–1.55] (0.029–2) 40 pts	1.7 [1.09–2] (0.014–2) 40pts	< 0.001	0.19	0.021

* Only for samples harboring an *NPM1* mutation

HTS, high-throughput sequencing; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; pts, patients; AR, allelic ratio; IQR, interquartile range; Norm-VAF, normalized variant allele frequency

Table S4: Comparison of initial characteristics between *FLT3*-ITD clones that were retained or lost at the time of AML relapse

Variable at diagnosis	Total (n=105 pts)			ICT + MIDO (n=35 pts)			ICT (n=70 pts)		
	n=218 ITDs		P	n=61 ITDs		P	n=157 ITDs		P
	Lost ITDs n=119 ITDs (55%)	Retained ITDs n=99 ITDs (45%)		Lost ITDs n=34 ITDs (56%)	Retained ITDs n=27 ITDs (44%)		Lost ITDs n=85 ITDs (54%)	Retained ITDs n=72 ITDs (46%)	
<i>FLT3</i> -ITD AR	Median [IQR] (range) 0.006 [0.0014–0.052] (0.0003–1.53)	0.31 [0.039–0.75] (0.0014–68)	< 0.001	0.011 [0.0038–0.087] (0.0004–0.85)	0.38 [0.090–0.73] (0.0019–1.3)	< 0.001	0.0054 [0.0011–0.043] (0.0003–1.53)	0.31 [0.026–0.76] (0.0014–68)	< 0.001
Norm-VAF*	Median [IQR] (range) 0.018 [0.0035–0.11] (0.0011–1.5)	0.82 [0.18–1.14] (0.004–2)	< 0.001	0.029 [0.013–0.19] (0.0012–1.0)	0.34 [0.25–0.94] (0.0040–1.21)	< 0.001	0.012 [0.0030–0.079] (0.0011–1.5)	0.83 [0.16–1.32] (0.004–2)	< 0.001
Number of ITDs	67 ITDs	60 ITDs		19 ITDs	17 ITDs		48 ITDs	43 ITDs	
<i>FLT3</i> -ITD bp length	Median [IQR] (range) 42 [27–67.5] (6–246)	54 [36–79.5] (3–195)	0.037	42 [27–66] (6–165)	57 [39–94.5] (21–195)	0.078	42 [24–69] (6–246)	52.5 [30–75] (3–183)	0.17
<i>FLT3</i> -ITD insertion site	JMD: n (%) TKD1: n (%)	87 (73%) 62 (63%)	0.11	26 (76%) 8 (24%)	16 (59%) 11 (41%)	0.17	61 (72%) 24 (28%)	46 (64%) 26 (36%)	0.31
Clonal interference	Presence: n (%) Absence: n (%)	105 (88%) 14 (12%)	< 0.001	25 (74%) 9 (26%)	15 (56%) 12 (44%)	0.18	80 (94%) 5 (6%)	47 (65%) 25 (35%)	< 0.001

* Only for samples harboring an *NPM1* mutation

AML, acute myeloid leukemia; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; pts, patients; AR, allelic ratio; Norm-VAF, normalized variant allele frequency; bp, base pair; IQR, interquartile range; JMD, juxtamembrane domain; TKD1, tyrosine kinase domain 1

Table S5: Validation of 6 *FLT3*-ITD microclones by ddPCR

Patient identifier	Disease stage	ITD length (bp)	ITD insertion site (hg19)	FA AR	HTS AR	ddPCR AR
1	Diagnosis	21	28608255	Undetectable	0.0038	0.0012
2	Diagnosis	21	28608255	Undetectable	0.0033	0.00065
2	Refractory	21	28608255	Non available	0.0017	0.00023
3	Diagnosis	21	28608255	Undetectable	0.00070	0.00033
4	Diagnosis	27	28608263	0.010	0.0087	0.0055
4	Relapse	27	28608263	Non available	0.021	0.021

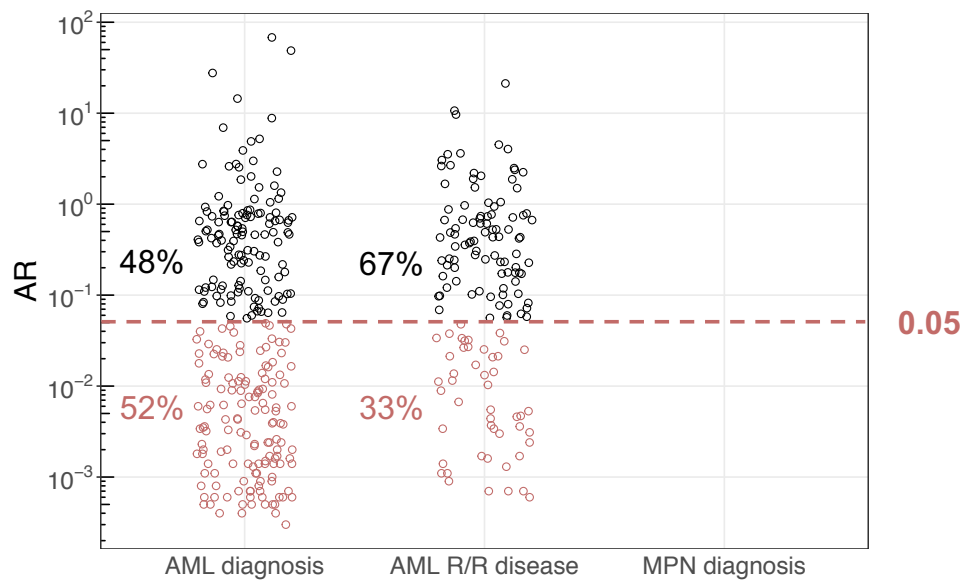
bp, base pair; FA, fragment analysis; AR, allelic ratio; HTS, high-throughput sequencing; ddPCR, droplet digital PCR

Supplemental Figures

Figure S1: Detection of *FLT3*-ITD clones by HTS at diagnosis and R/R disease

AR of *FLT3*-ITD clones detected at the time of AML diagnosis, AML R/R disease, and MPN diagnosis. Each circle represents 1 *FLT3*-ITD clone. The threshold is positioned at an AR of 0.05. Microclones (with an AR < 0.05) are color-coded in red and macroclones (with an AR ≥ 0.05) are color-coded in black.

AR, allelic ratio; AML, acute myeloid leukemia; R/R, relapsed/refractory; MPN, myeloproliferative neoplasms; HTS, high-throughput sequencing.



Total clones	n=270 ITDs	n=144 ITDs	○ <i>FLT3</i> -ITD
Macroclones	n=129 ITDs	n=96 ITDs	○ <i>FLT3</i> -ITD
Microclones	n=141 ITDs	n=48 ITDs	○ <i>FLT3</i> -ITD

Figure S2: Number of *FLT3*-ITD microclones and macroclones detected per patient at diagnosis and R/R disease using HTS

Only patients with a positive *FLT3*-ITD status at both time points are displayed. R/R, relapsed/refractory; HTS, high-throughput sequencing.

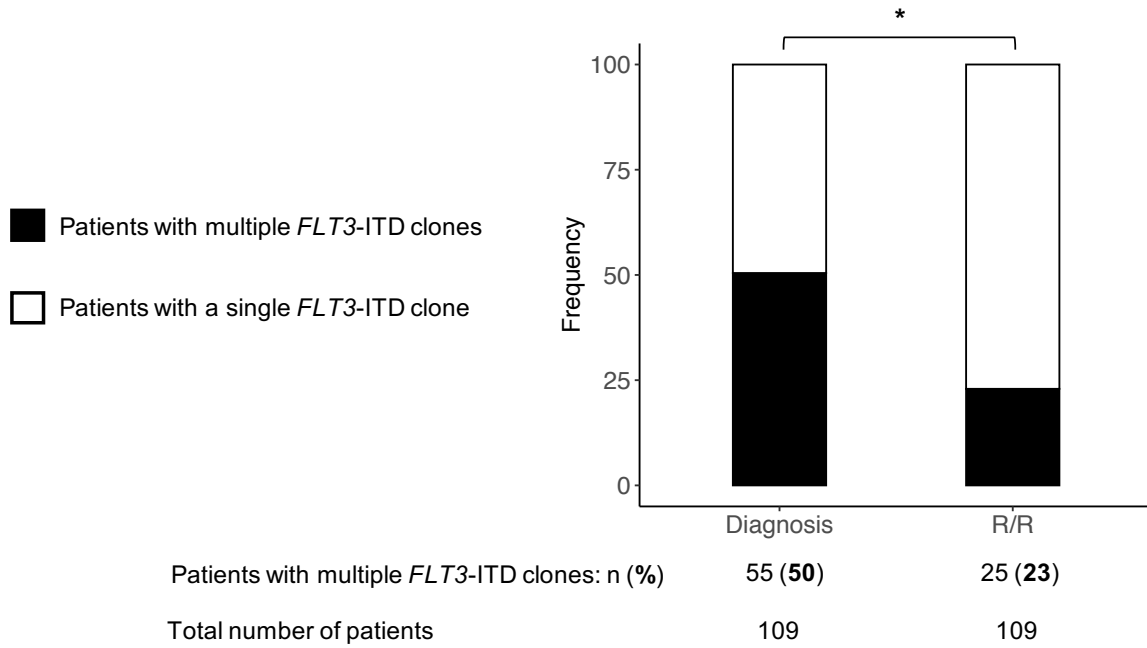
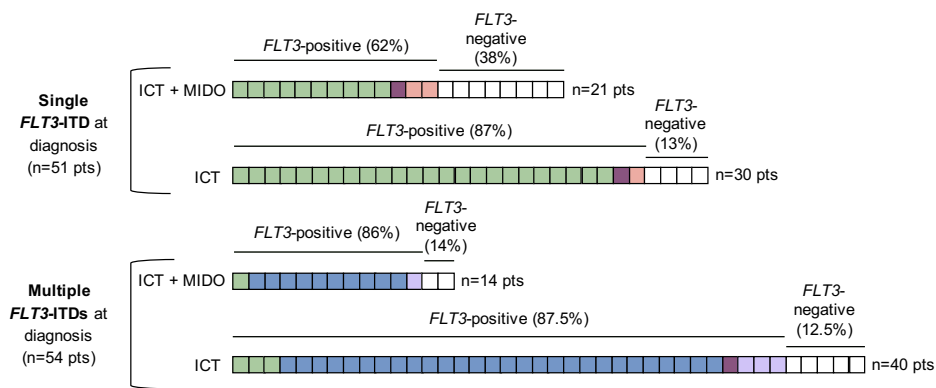


Figure S3: Patterns of evolution of *FLT3*-ITD clones between diagnosis and R/R disease

A-B: Patterns of evolution of *FLT3*-ITD microclones and macroclones between diagnosis and relapse (A) or refractory disease (B) according to the number of *FLT3*-ITD clones detected at diagnosis (either a single clone or multiple clones) and the treatment group. Each square represents one patient. Patterns of evolution (diagnosis -> R/R disease) were assessed by HTS and defined as follows. Identical: clone A -> clone A. Loss: clone A + clone B -> clone A. Gain: clone A -> clone A + clone B. Switch: clone A -> clone B. Complex changes: clone A + clone B -> clone B + clone C. Eradication: clone A -> ∅.

HTS, high-throughput sequencing; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; Pts, patients; R/R, relapsed/refractory.

A Relapsed patients with *FLT3*-ITD mutations at diagnosis detected by HTS (n=105)



B Refractory patients with *FLT3*-ITD mutations at diagnosis detected by HTS (n=30)

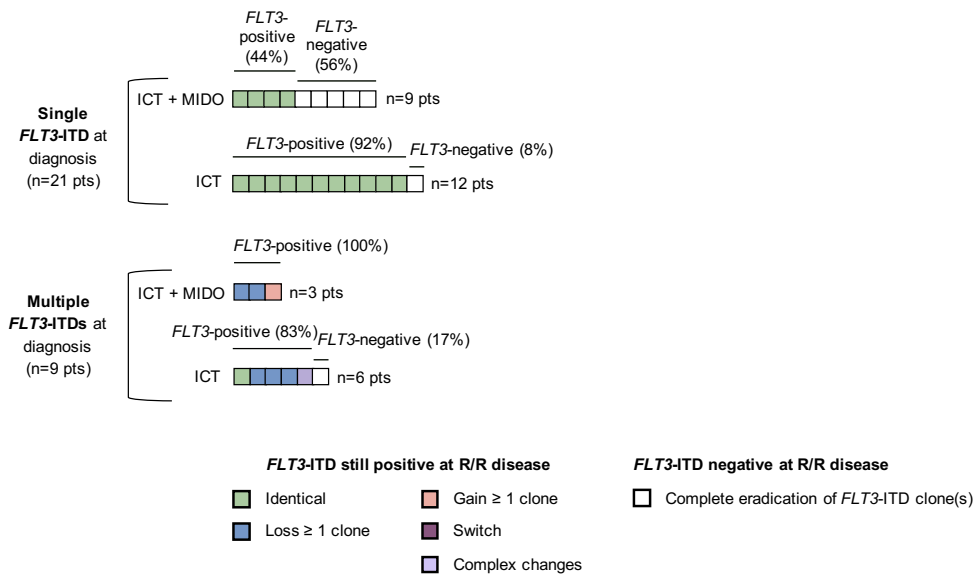
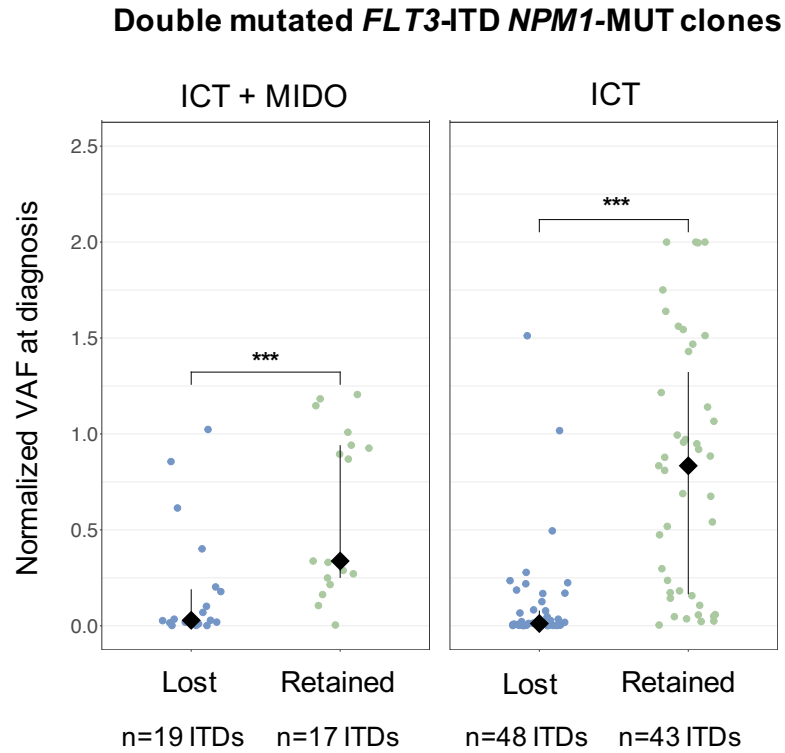


Figure S4: Normalized VAF at diagnosis for lost and retained *FLT3*-ITD clones

Normalized VAF at diagnosis for lost and retained *FLT3*-ITD microclones and macroclones upon AML relapse, according to the treatment group.

MUT, mutated; VAF, variant allele frequency; ICT, intensive chemotherapy; MIDO, midostaurine; AML, acute myeloid leukemia.



TRAVAUX NON PUBLIÉS

Étude des clones *FLT3*-ITD homozygotes par séquençage à haut débit

Dans les LAM mutées *NPM1*, les mutations survenant avant *NPM1* (e.g *DNMT3A*, *TET2*) étant considérées comme « pré-leucémiques » (Jaiswal et al. 2014; Metzeler et al. 2016), la population cellulaire mutée *NPM1* peut être envisagée comme la véritable population tumorale. Ainsi, dans le second article inclus dans ce manuscrit, intitulé « La midostaurine module l'évolution des macroclones et des microclones dans les leucémies aiguës myéloïdes mutées *FLT3* », nous avons calculé les VAFs normalisées (Norm-VAFs) des mutations *FLT3*-ITD ($VAF(FLT3\text{-ITD})/VAF(NPM1)$) par HTS pour nous affranchir de la dilution de la fraction tumorale et ainsi mieux quantifier les mutations *FLT3*-ITD. Chez les patients présentant plusieurs clones *FLT3*-ITD, les Norm-VAFs de chaque clone *FLT3*-ITD ont été additionnées pour obtenir une seule valeur par échantillon, nommée \sum Norm-VAFs. Toutefois, nous n'avons pas exploité dans cette publication un autre avantage de la normalisation : une Norm-VAF (ou \sum Norm-VAFs) supérieure à 1 révèle l'existence d'une mutation *FLT3*-ITD homozygote. En effet, étant donné que les mutations *FLT3*-ITD surviennent après les mutations *NPM1* dans le processus de leucémogénèse (Metzeler et al. 2016; Morita et al. 2020), et sachant que les mutations *NPM1* sont toujours présentes à l'état hétérozygote (Grisendi et al. 2005), une Norm-VAF (ou \sum Norm-VAFs) supérieure à 1 indique qu'il y a plus d'allèles *FLT3*-ITD que d'allèles mutés *NPM1*, et qu'il existe par conséquent au moins un clone *FLT3*-ITD homozygote (Figure 13).

Concernant les sujets traités par CTI uniquement inclus dans notre étude, la proportion de patients présentant au moins une mutation *FLT3*-ITD homozygote augmentait entre le diagnostic et la rechute (diagnostic : 45% [18/40] vs rechute 87.5% [35/40] ; $P = 0,0067$) (Figure 14). Ainsi, la sélection de clones *FLT3*-ITD homozygotes apparaît comme un mécanisme majeur de résistance à la CTI chez les patients mutés *NPM1*. En appliquant le même raisonnement à l'échelle du clone et non du patient, les clones avec une Norm-VAF supérieure à 1 ont été considérés comme homozygotes pour *FLT3*-ITD. De façon intéressante, la proportion de clones *FLT3*-ITD homozygotes était plus faible après traitement par CTI et MIDO qu'après traitement par CTI

uniquement, indiquant que la MIDO pourrait freiner la sélection des clones *FLT3*-ITD homozygotes (53% [9/17] vs 81% [35/43] ; $P < 0,001$) (Figure 14).

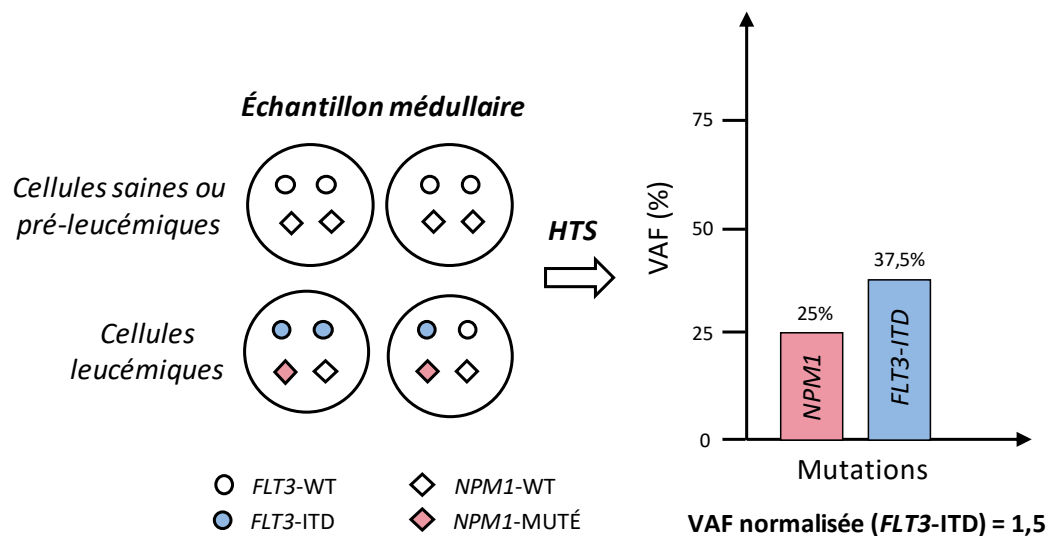


Figure 13 : Méthode de dépistage des clones *FLT3*-ITD homozygotes par séquençage à haut débit

Dans cet exemple, le calcul de la VAF normalisée indique qu'il existe un clone *FLT3*-ITD homozygote.

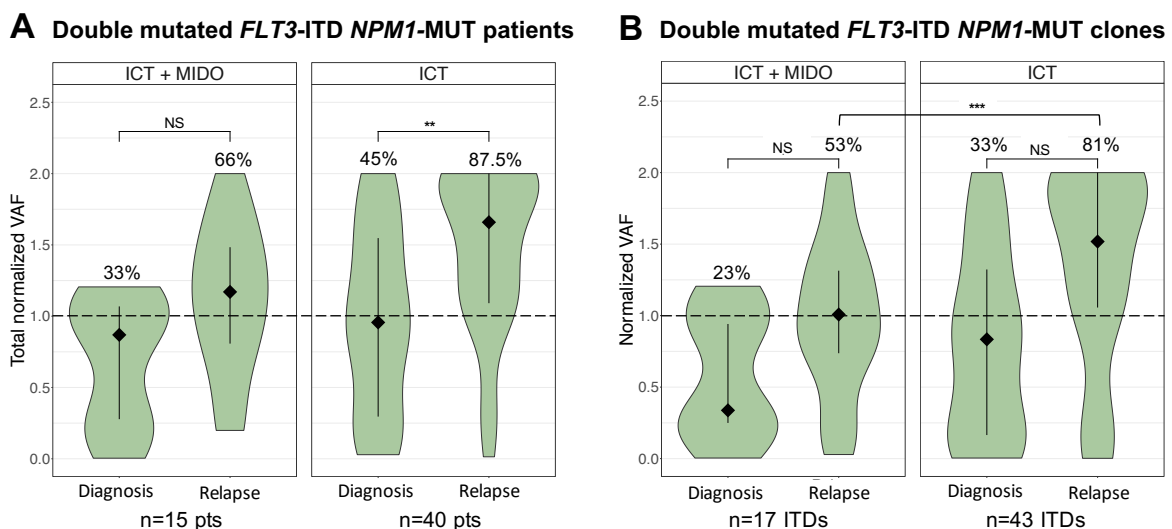


Figure 14 : Évolution des clones *FLT3*-ITD homozygotes entre le diagnostic et la rechute

A : Évolution du taux de patients présentant au moins un clone *FLT3*-ITD homozygote entre le diagnostic et la rechute, selon le groupe de traitement. Seuls les patients au statut *FLT3*-ITD positif au diagnostic et à la rechute sont représentés.

B : Évolution du pourcentage de clones *FLT3*-ITD homozygotes entre le diagnostic et la rechute, selon le groupe de traitement. Seuls les clones détectés à la fois au diagnostic et à la rechute sont représentés. Le *cut-off* permettant d'identifier les

patients (ou les clones) *FLT3*-ITD homozygotes est figuré par un trait pointillé. Le pourcentage de patients (ou de clones) *FLT3*-ITD homozygotes est indiqué. *MUT* : mutated, *ICT* : intensive chemotherapy, *MIDO* : midostaurin, *pts* : patients.

Bien que ces résultats soient très intéressants, nous ne les avons pas inclus dans la publication car la méthodologie présente quelques limites. En effet, la méthode de calcul ne permet pas de déterminer le statut allélique des mutations *FLT3*-ITD lorsque la Norm-*VAF* est inférieure à 1 : ce résultat peut indiquer aussi bien l'absence de clones homozygotes que la présence de clones homozygotes de petite taille. Par ailleurs, nous n'avons pas élargi la normalisation à d'autres mutations que *NPM1* car il aurait fallu s'assurer qu'elles soient hétérozygotes et qu'elles précèdent *FLT3*-ITD dans l'architecture clonale, ce qui n'était pas réalisable. Le séquençage unicellulaire pourrait améliorer la détection des clones *FLT3*-ITD homozygotes car il constitue une approche plus directe et plus sensible. En effet, il permet de détecter les clones représentant au moins 0,1% de la population leucémique totale (T. Kim et al. 2022; Morita et al. 2020). À l'avenir, cette technique pourrait permettre de préciser l'évolution et l'impact des clones *FLT3*-ITD homozygotes.

Modélisation des mutations de *FLT3* par approche CRISPR-Cas9

La sélection de clones *FLT3*-ITD homozygotes apparaît comme un mécanisme de résistance majeur à la CTI chez les patients mutés *NPM1* (cf : « Étude des clones *FLT3*-ITD homozygotes par séquençage à haut débit »). Ainsi, nous avons eu recours à la technologie d'édition génomique CRISPR-Cas9 afin d'explorer l'impact du statut allélique (hétérozygote ou homozygote) des mutations *FLT3*-ITD sur la différenciation cellulaire, le transcriptome et la réponse aux drogues.

Nous avons souhaité étudier dans un premier temps une lignée leucémique humaine mutée *NPM1* et notre choix s'est porté sur la lignée OCI-AML3, qui présente par ailleurs un caryotype complexe et des mutations des gènes *DNMT3A* et *NRAS*. Afin de modéliser une mutation *FLT3*-ITD représentative des lésions identifiées en pratique clinique, nous avons analysé 404 mutations *FLT3*-ITD détectées par HTS chez des patients pris en charge pour une LAM au Centre Hospitalier Universitaire de Lille. Dans notre série, le mode de la longueur des ITDs s'élevait à 24 pb et la médiane à 45 pb. Le mode de la position du site d'insertion était situé en 28608262 (E598) et la valeur médiane en 28608252 (K602). Nous avons choisi d'insérer une séquence de

24 pb à la position génomique hg19 28608256 (nommée *FLT3*-ITD_24/D600), ayant pour conséquence la duplication parfaite des acides aminés D593 à D600 (séquence DFREYEYD). Par ailleurs, la mutation *FLT3*-TKD est un contrôle intéressant car elle n'est pas associée à un mauvais pronostic, contrairement à la mutation *FLT3*-ITD. Le résidu D835 étant le plus fréquemment altéré, nous avons choisi de modéliser la mutation *FLT3*-TKD D835H. À ce jour, la technologie CRISPR-Cas9 a déjà permis de modéliser la mutation *FLT3*-ITD_24/D600 au stade hétérozygote, ainsi que la mutation *FLT3*-TKD D835H aux stades hétérozygotes et homozygotes. Nous allons prochainement utiliser la même technologie afin de générer des clones *FLT3*-ITD_24/D600 homozygotes.

La lignée OCI-AML3 a été acquise chez DSMZ. Toutes les lignées, sauvages ou éditées, ont été cultivées dans du milieu RPMI préchauffé supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, à 37°C et sous 5% de CO₂. Afin de modéliser les mutations de *FLT3*, nous avons transfecté par nucléofection (Amaxa Nucleofector 2b, kit T, programme T-020) des cellules OCI-AML3 sauvages avec des complexes ribonucléoprotéiques pré-formés (à partir de tracrRNA, de crRNA et de nucléase Cas9) et des séquences donneuses d'ADN homologue (contenant les mutations d'intérêt ainsi que des mutations silencieuses facilitant le processus d'édition génomique). Les séquences des crRNA et les séquences donneuses sont indiquées dans le Tableau 4. Pour modéliser la mutation *FLT3*-TKD D835H, nous avons également ajouté un agent permettant d'améliorer l'efficacité de l'édition génomique (Electroporation Enhancer). Après nucléofection, les cellules ont été cultivées dans 1,5 mL de milieu contenant un agent améliorant l'efficacité de la recombinaison homologue (Alt-R HDR Enhancer V2). Tous les réactifs provenaient de Integrated DNA Technologies® et les expériences ont été réalisées selon les recommandations du fabricant. Le lendemain de la nucléofection, le milieu a été rafraîchi. Une fois les cellules éditées suffisamment amplifiées en culture, leur ADN a été extrait et séquencé par HTS pour contrôler l'efficacité de l'édition génomique, à l'aide d'un panel précédemment publié (Duployez et al. 2023). Puis, nous avons réalisé un clonage unicellulaire par FACS en plaques 96 puits. Lorsque les puits sont arrivés à confluence, nous avons extrait leur ADN, amplifié la région d'intérêt par PCR (Phire Tissue Direct PCR Master Mix de Thermo Scientific®) à l'aide d'amorces précédemment publiées (Thiede et al. 2002), et recherché la mutation *FLT3*-ITD_24/D600 ou *FLT3*-TKD D835H par électrophorèse

capillaire. Enfin, les clones d'intérêt identifiés par électrophorèse capillaire ont été séquencés par HTS pour confirmer la présence des mutations de *FLT3* et leur statut allélique, à l'aide d'un panel précédemment publié (Duployez et al. 2023).

Tableau 4 : Séquences des crRNA et des oligonucléotides donneurs

Mutation	crRNA (5'-3')	Oligonucléotide donneur (5'-3')
<i>FLT3</i> -ITD_24/D600	AATATGAATATGATCTCAAA	TGAGTACTTCTACGTTGATTTTCAG AGAATATGAATATGATGATTTTCAG AGAATATGAATATGATCTGAAGTG GGAGTTTCCAAGAGAAAATTTAGA GTTTGGTAAGA
<i>FLT3</i> -TKD D835H	GAAGATATGTGACTTTGGAT	ACATTGCCCTGACAACATAGTT GGAATCACTCATGATATGTTCGAG CGAGTCCAAAGTCACATATCTTC ACCACTTCCCGTGGGTGACAAG

Nous avons réalisé des analyses intermédiaires afin de déterminer si l'acquisition de mutations de *FLT3* s'accompagnait de modifications phénotypiques. Nous avons comparé le phénotype des lignées OCI-AML3 mutées *FLT3* et de trois clones contrôles. Deux des clones contrôles ont été obtenus au terme du même processus d'édition génomique que la lignée *FLT3*-TKD D835H : le premier clone n'a pas acquis de mutation de *FLT3* (« *FLT3*-WT ») et le second a acquis uniquement des mutations silencieuses de *FLT3* (« *FLT3*-WT + silent mutations »). Ces mutations silencieuses facilitent le processus d'édition génomique mais n'impactent pas la séquence protéique. La dernière lignée contrôle correspond à la lignée OCI-AML3 sauvage n'ayant pas subi le processus de nucléofection (« OCI-AML3 WT »). Le phénotype de surface des différentes lignées a été étudié à l'aide du panel d'anticorps décrit dans le Tableau 5 et du cytomètre DXFlex (Beckman Coulter®). Tous les anticorps provenaient de BD® ou Beckman Coulter®.

Le processus d'édition génomique a induit une différenciation monocyttaire de l'ensemble des clones nucléofectés, y compris les clones contrôles, illustrée par la hausse de l'expression du CD36 et du CD4 (à l'exception du clone *FLT3*-TKD hétérozygote qui présente un profil d'expression bimodale du CD4) (Figure 15). Par ailleurs, le processus d'édition génomique a induit l'expression du CD34 chez les clones contrôles nucléofectés et le clone *FLT3*-ITD hétérozygote. En revanche, les lignées hétérozygotes et homozygotes pour *FLT3*-TKD n'exprimaient pas le CD34 (Figure 15). Ces résultats indiquent que les modifications phénotypiques observées à

l'issue de l'édition génomique sont en partie liées au processus même d'édition génomique et non aux mutations insérées.

Tableau 5 : Cibles des anticorps utilisés pour l'étude des lignées cellulaires par cytométrie en flux

	FITC	PE	ECD	PC5.5	PC7	APC	AA700	AA750	Pacific Blue	KO
Tube 1	CD7 (8H8.1)	CD13 (SJ1D1)	HLADR (Immu-357)	CD33 (D3HL6 0.251)	CD38 (HB7)	CD34 (581)	CD56 (N901)	CD19 (J3-119)	CD117 (104D2 D1)	CD45 (J33)
Tube 2	CD90 (5E10)	CLL1 (50C1) TIM3 (7D3) CD97 (VIM3b)	CD19 (J3-119)	CD123 (SSDCL Y107D2)	CD38 (HB7)	CD34 (581)	CD36 (FA6,15 2)	CD45RA (HI100)	CD117 (104D2 D1)	CD45 (J33)
Tube 3	CD65 (88H7)	CD4 (13B8.2)	HLADR (Immu-357)	CD33 (D3HL6 0.251)	CD11b (Bear1)	CD34 (581)	CD36 (FA6,15 2)	CD14 (RMO52)	CD117 (104D2 D1)	CD45 (J33)

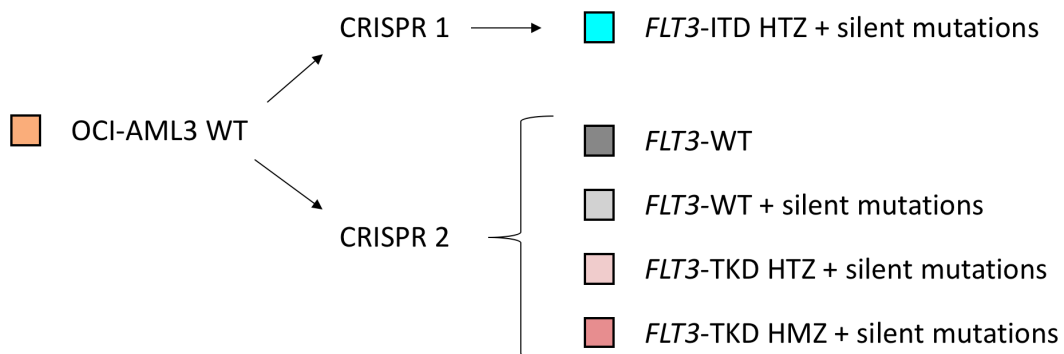
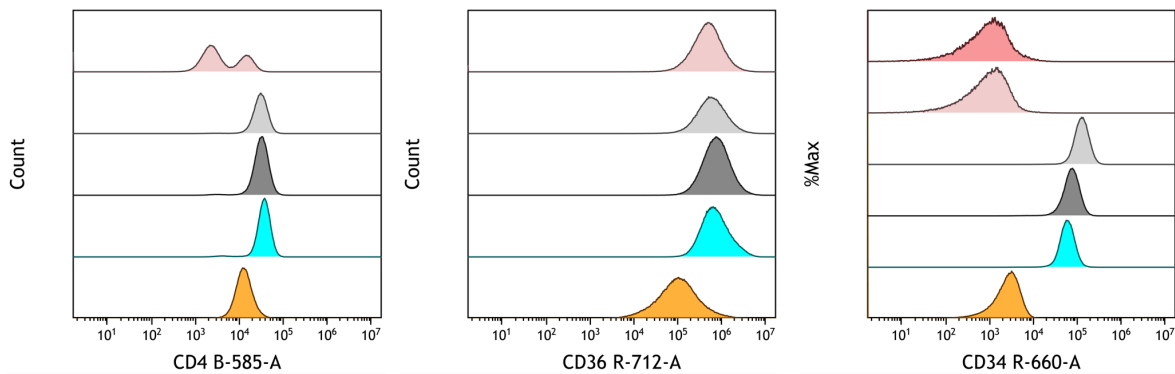


Figure 15 : Étude de l'impact des mutations de *FLT3* sur l'immunophénotype

HTZ : hétérozygote, HMZ : homozygote.

Les lignées leucémiques humaines présentant une mutation *FLT3*-ITD sont en règle sensibles à la MIDO (e.g MOLM13, MV4-11) tandis que la lignée OCI-AML3 sauvage, qui ne présente pas de mutation de *FLT3*, est résistante à la MIDO (Seipel et al. 2018). Nous avons tâché de déterminer si l'introduction de la mutation *FLT3*-ITD_24/D600 dans la lignée OCI-AML3 lui conférait une sensibilité à la MIDO. Pour cela, nous avons exposé la lignée OCI-AML3 sauvage et la lignée OCI-AML3 hétérozygote *FLT3*-ITD_24/D600, ainsi que la lignée MOLM13, à une gamme de concentration de MIDO. Les calculs de l'IC50 et de l'AUC ont révélé que l'introduction de la mutation *FLT3*-ITD_24/D600 n'a pas permis de sensibiliser la lignée OCI-AML3 à la MIDO (Figure 16).

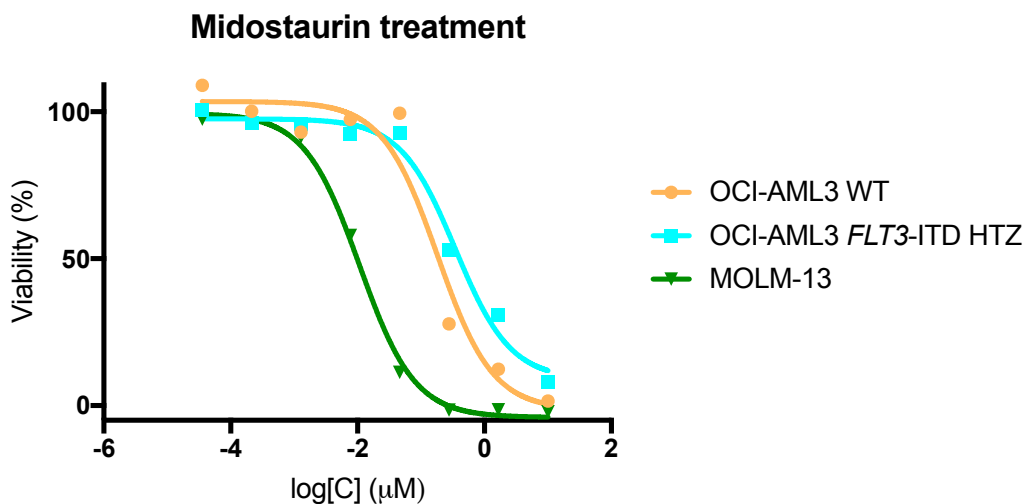


Figure 16 : Étude de la sensibilité à la midostaurine de différentes lignées leucémiques

HTZ : hétérozygote.

La lignée OCI-AML3 hétérozygote pour *FLT3*-ITD_24/D600 porte une mutation homozygote du gène *NRAS* (Q61L), initialement présente sur la lignée OCI-AML3 sauvage. Cette mutation de *NRAS* conduit théoriquement à l'activation de la voie RAF-MEK-ERK en aval de *FLT3*, et pourrait conférer une résistance aux iFLT3. Au diagnostic de LAM, des mutations de *FLT3* et de *NRAS* peuvent être identifiées chez un même patient mais elles sont alors généralement portées par des clones distincts (Morita et al. 2020). Par ailleurs, l'acquisition de mutations touchant la voie RAS/MAPK a été observée chez 9% des patients R/R après traitement par MIDO et CTI (Schmalbrock et al. 2021). Dans ce contexte, les mutations touchant la voie RAS/MAPK pouvaient être présentes dans les mêmes cellules que les mutations

FLT3-ITD (Schmalbrock et al. 2021). Ainsi, la lignée OCI-AML3 hétérozygote pour *FLT3*-ITD_24/D600 pourrait être utilisée comme un modèle de résistance secondaire à la MIDO.

Les lignées OCI-AML3 et MOLM-13 ont été acquises chez ATCC ou DSMZ. Toutes les lignées, sauvages ou éditées, ont été cultivées dans du milieu RPMI préchauffé supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal, à 37°C et sous 5% de CO₂. Brièvement, les différentes lignées ont été déposées dans des plaques 96 puits (40 000 cellules par puits) et exposées en duplicat à une gamme de concentration de MIDO (M1323 Sigma-Aldrich®) présentant 8 points de dilution avec une dilution au 1/6^{ème} entre chaque point (0,035 à 10000 nanomolaires). Après 72 heures d'exposition, les puits ont été incubés avec du MTT (Sigma-Aldrich®) pour une durée de 4 heures. Puis, ils ont été dissous avec de l'isopropanol/HCl et leur absorbance a été mesurée au spectromètre à 570 nm. La viabilité a été calculée en appliquant la formule suivante : Viabilité = (Cellules exposées - Blanc) / (Cellules non exposées - Blanc). Les courbes dose-effets ont été modélisées à l'aide du logiciel Graphpad PRISM.

En perspective, une fois la mutation *FLT3*-ITD_24/D600 homozygote modélisée, nous explorerons l'impact des différentes mutations de *FLT3* et de leur statut allélique sur la différenciation cellulaire, le transcriptome et la réponse aux drogues. D'une part, nous analyserons le phénotype de la lignée *FLT3*-ITD_24/D600 homozygote afin de compléter les résultats préliminaires décrits en amont. D'autre part, nous étudierons l'impact des mutations de *FLT3* et de leur statut allélique sur le programme transcriptionnel cellulaire, et en particulier l'expression des gènes impliqués dans les propriétés souches. Enfin, les différentes lignées seront exposées *in vitro* à un panel de molécules d'intérêt dans le traitement de la LAM, afin de mettre en évidence des différences de sensibilité aux drogues.

DISCUSSION

Au diagnostic de LAM, les mutations de *NPM1* et les mutations *FLT3*-ITD sont les plus fréquemment mises en évidence et elles définissent des entités partageant des caractéristiques clinico-biologiques communes (Metzeler et al. 2016; Papaemmanuil et al. 2016). Historiquement, les mutations de *NPM1* et les mutations *FLT3*-ITD ont respectivement été associées à un pronostic favorable (Papaemmanuil et al. 2016) et défavorable (Patel et al. 2012). Toutefois, le pronostic des patients présentant ces lésions demeure hétérogène.

Les co-mutations et les phénotypes associés aux LAM mutées *NPM1* sont susceptibles d'influencer le pronostic ainsi que la réponse au traitement (Mason et al. 2019; Papaemmanuil et al. 2016). **Le premier objectif de ce travail fut d'explorer le lien entre les mutations somatiques et la différenciation phénotypique à l'échelle unicellulaire dans les LAM mutées *NPM1*.** Notre analyse couplée du génotype et du phénotype à l'échelle unicellulaire a mis en évidence des associations génotype-phénotype spécifiques. Toutefois, ces associations étaient propres à chaque patient et non partagées par l'ensemble de la cohorte. Nous avons pu valider certaines associations à l'aide de l'étude d'un cas illustratif. Après avoir identifié le phénotype d'un sous-clone muté *FLT3*-TKD par séquençage unicellulaire, nous avons pu l'isoler par tri cellulaire en sélectionnant uniquement les cellules présentant la combinaison de marqueurs identifiée. Ainsi, notre étude démontre que le séquençage unicellulaire multi-omique à l'aide de la plateforme Tapestry (Mission Bio®) établit des corrélations génotype-phénotype permettant l'enrichissement en sous-clones génétiques spécifiques par tri cellulaire.

Par conséquent, cette technologie ouvre la voie à la caractérisation fonctionnelle des sous-clones génétiques minoritaires. Des études ont démontré que le criblage de drogues *ex vivo* permettait de prédire l'efficacité clinique de certains traitements, de façon prospective (Malani et al. 2022) ou rétrospective (Dal Bello et al. 2022; Spinner et al. 2020). Toutefois, ces études ont été réalisées sur le *bulk* leucémique et révélaient ainsi la sensibilité moyenne des différents clones leucémiques. L'établissement de corrélations génotype-phénotype par séquençage unicellulaire pourrait permettre d'isoler les différents sous-clones génétiques afin de déterminer leur profil de sensibilité individuel. Par exemple, le séquençage unicellulaire

multi-omique pourrait permettre de déterminer le phénotype des sous-clones *FLT3*-ITD homozygotes (T. Kim et al. 2022), de les isoler, et d'établir leur profil de sensibilité aux drogues.

De nombreux travaux ont révélé que le pronostic associé aux mutations *FLT3*-ITD dépendait de certaines caractéristiques telles que leur RA (Pratcorona et al. 2013; S. Schnittger et al. 2011), leur site d'insertion (Kayser et al. 2009), leur longueur (Y. Kim et al. 2015; Meshinchi et al. 2008) ou encore le nombre de clones *FLT3*-ITD détectés (Kottaridis et al. 2001; Richard F. Schlenk et al. 2014). L'utilisation de la MIDO en première ligne depuis 2017 a permis d'améliorer la survie des patients mutés *FLT3* (Stone et al. 2017). Cependant, les taux de RC obtenus demeurent proches de 60-70% et les rechutes surviennent encore dans plus de 40% des cas (Stone et al. 2017). **Le deuxième objectif de ce travail fut d'identifier les mécanismes moléculaires sous-tendant l'échec d'induction et/ou la rechute chez les patients mutés *FLT3* traités par CTI, en association ou non à la MIDO.** Nous avons également cherché à déterminer si les caractéristiques initiales des mutations *FLT3*-ITD modulaient les mécanismes de résistance au traitement.

Pour la première fois, nous avons étudié l'évolution des clones *FLT3*-ITD entre le diagnostic et la progression par HTS avec une résolution permettant d'identifier les microclones *FLT3*-ITD (RA < 0,05). Les résultats de notre analyse sont schématisés sur la Figure 17. Au diagnostic, près de la moitié des patients présentaient plusieurs clones *FLT3*-ITD, conformément à une étude précédente réalisée par HTS (Rücker et al. 2022). Chez les patients traités par CTI et MIDO, la présence de plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic était associée à une probabilité plus importante de conserver un statut *FLT3*-ITD positif au stade R/R (clones multiples : 88% vs clone unique : 57%, $P = 0,049$). En d'autres termes, lorsque plusieurs clones *FLT3*-ITD sont présents au diagnostic, il est très probable que l'un d'entre eux présente des caractéristiques lui permettant de persister sous traitement. Chez plus de deux tiers des patients présentant plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic, nous avons mis en évidence une simplification du répertoire des ITDs au stade R/R, i.e la perte d'une partie des clones initiaux. Ce phénomène de sélection clonale avait déjà été mis en évidence sous traitement par CTI (Krönke et al. 2013; Shih et al. 2002). Le suivi de la MRD *FLT3*-ITD a démontré un intérêt pronostique chez les patients traités par CTI en association à la MIDO (Rücker et al. 2024). Nos résultats indiquent que ce suivi pourrait être moins

pertinent chez les patients présentant un seul clone *FLT3*-ITD au diagnostic, étant donné que le marqueur de suivi est perdu à la progression dans près de la moitié des cas. Chez les patients présentant plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic, le suivi est pertinent mais il est nécessaire de monitorer l'ensemble des clones *FLT3*-ITD en raison de la simplification du répertoire des ITDs observée à la progression.

Par ailleurs, nous avons déterminé que certains paramètres initiaux influençaient l'évolution des clones *FLT3*-ITD à la rechute, à l'aide d'un modèle de régression logistique multivarié. Dans ce modèle, un clone *FLT3*-ITD présentant un RA $\geq 0,5$ avait une forte probabilité de persister à la rechute tandis qu'un microclone ou un clone subissant la concurrence d'autres clones *FLT3*-ITD était plus enclin à disparaître. En conséquence, seulement 24% des microclones *FLT3*-ITD détectés au diagnostic étaient conservés à la rechute. D'autres études sont nécessaires pour déterminer les particularités des microclones capables de persister sous traitement.

Toutefois, près de la moitié des microclones conservés sont devenus des macroclones à la rechute. Ces résultats indiquent que les microclones *FLT3*-ITD peuvent jouer un rôle crucial dans la rechute, comme l'ont suggéré des études antérieures (Ottone et al. 2013; Yokoyama et al. 2023). Ainsi, la présence de microclones *FLT3*-ITD au diagnostic pourrait conférer un mauvais pronostic, y compris aux patients ne présentant pas de macroclones *FLT3*-ITD associés. Dans une étude publiée récemment, les patients au statut *FLT3*-ITD négatif par AF mais positif par HTS présentaient un taux de rechute à un an élevé par rapport aux patients au statut *FLT3*-ITD négatif par les deux méthodes (Yokoyama et al. 2023). En perspective, nous allons prochainement étudier l'impact pronostique de la présence de microclones *FLT3*-ITD au sein d'une large cohorte de patients dont le statut *FLT3*-ITD est négatif par AF au seuil de 0,05.

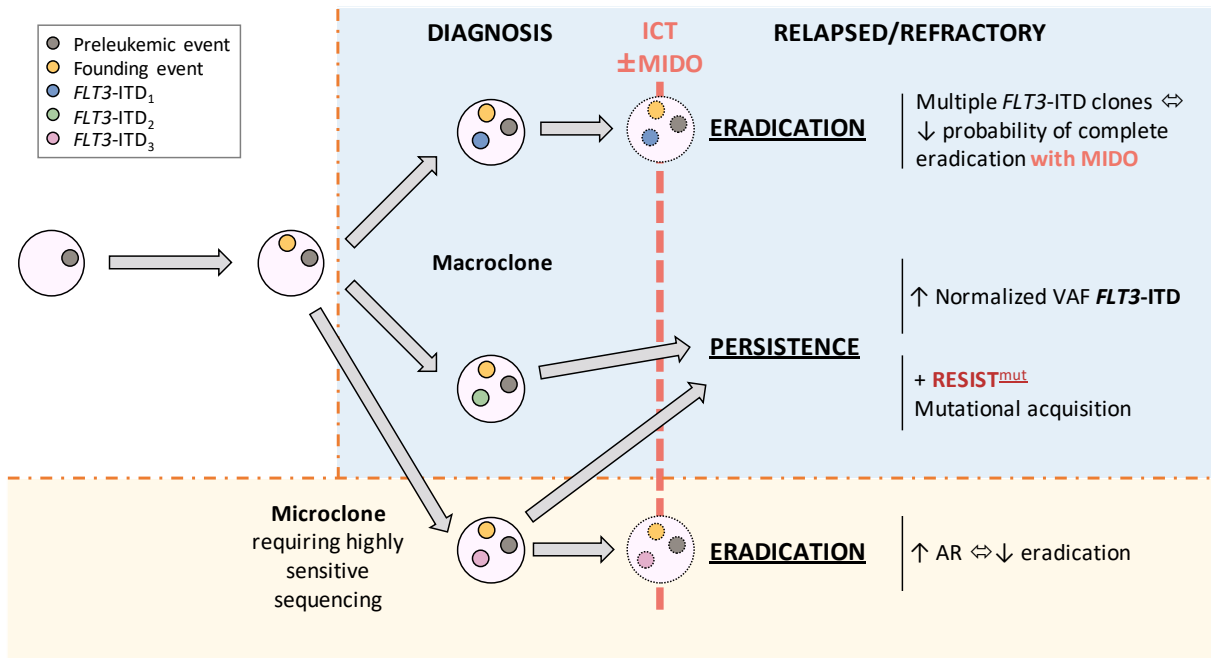


Figure 17 : Représentation graphique de l'évolution des clones FLT3-ITD

ICT : intensive chemotherapy, MIDO : midostaurin, RESIST^{mut} : resistance mutation.

BIBLIOGRAPHIE

- Agnès, F., B. Shamoan, C. Dina, O. Rosnet, D. Birnbaum, et F. Galibert. 1994. « Genomic Structure of the Downstream Part of the Human FLT3 Gene: Exon/Intron Structure Conservation among Genes Encoding Receptor Tyrosine Kinases (RTK) of Subclass III ». *Gene* 145(2): 283-88. doi:10.1016/0378-1119(94)90021-3.
- Alotaibi, Ahmad S., Musa Yilmaz, Rashmi Kanagal-Shamanna, Sanam Loghavi, Tapan M. Kadia, Courtney D. DiNardo, Gautam Borthakur, et al. 2021. « Patterns of Resistance Differ in Patients with Acute Myeloid Leukemia Treated with Type I versus Type II FLT3 Inhibitors ». *Blood Cancer Discovery* 2(2): 125-34. doi:10.1158/2643-3230.BCD-20-0143.
- Alshamleh, Islam, Nina Kurrle, Philipp Makowka, Raj Bhayadia, Rahul Kumar, Sebastian Süsser, Marcel Seibert, et al. 2023. « PDP1 Is a Key Metabolic Gatekeeper and Modulator of Drug Resistance in FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 37(12): 2367-82. doi:10.1038/s41375-023-02041-5.
- Anderson, Nicholas R., Vipul Sheth, Hui Li, Mason W. Harris, Shaowei Qiu, David K. Crossman, Harish Kumar, et al. 2023. « Microenvironmental CXCL12 Deletion Enhances Flt3-ITD Acute Myeloid Leukemia Stem Cell Response to Therapy by Reducing P38 MAPK Signaling ». *Leukemia* 37(3): 560-70. doi:10.1038/s41375-022-01798-5.
- Arber, Daniel A., Attilio Orazi, Robert P. Hasserjian, Michael J. Borowitz, Katherine R Calvo, Hans Michael Kvasnicka, Sa A. Wang, et al. 2022. « International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia: Integrating Morphological, Clinical, and Genomic Data ». *Blood*: blood.2022015850. doi:10.1182/blood.2022015850.
- Arriba-Tutusaus, P., T. S. Mack, L. Bullinger, T. M. Schnöder, A. Polanetzki, S. Weinert, A. Ballaschk, et al. 2016. « Impact of FLT3-ITD Location on Sensitivity to TKI-Therapy in Vitro and in Vivo ». *Leukemia* 30(5): 1220-25. doi:10.1038/leu.2015.292.
- Asada, Shuhei, Susumu Goyama, Daichi Inoue, Shiori Shikata, Reina Takeda, Tsuyoshi Fukushima, Taishi Yonezawa, et al. 2018. « Mutant ASXL1 Cooperates with BAP1 to Promote Myeloid Leukaemogenesis ». *Nature Communications* 9(1): 2733. doi:10.1038/s41467-018-05085-9.
- Assi, Salam A., Maria Rosaria Imperato, Daniel J. L. Coleman, Anna Pickin, Sandeep Potluri, Anetta Ptasinska, Paulynn Suyin Chin, et al. 2019. « Subtype-specific regulatory network rewiring in acute myeloid leukemia ». *Nature genetics* 51(1): 151-62. doi:10.1038/s41588-018-0270-1.
- Au, Chun Hang, Anna Wa, Dona N. Ho, Tsun Leung Chan, et Edmond S. K. Ma. 2016. « Clinical Evaluation of Panel Testing by Next-Generation Sequencing (NGS) for Gene Mutations in Myeloid Neoplasms ». *Diagnostic Pathology* 11: 11. doi:10.1186/s13000-016-0456-8.
- Audemard, Eric Olivier, Patrick Gendron, Albert Feghaly, Vincent-Philippe Lavallée, Josée Hébert, Guy Sauvageau, et Sébastien Lemieux. 2019. « Targeted Variant Detection Using Unaligned RNA-Seq Reads ». *Life Science Alliance* 2(4): e201900336. doi:10.26508/lsa.201900336.
- Bacher, Ulrike, Claudia Haferlach, Wolfgang Kern, Torsten Haferlach, et Susanne Schnittger. 2008. « Prognostic relevance of FLT3-TKD mutations in AML: the combination matters—an analysis of 3082 patients ». *Blood* 111(5): 2527-37. doi:10.1182/blood-2007-05-091215.
- Baker, Sharyn D., Eric I. Zimmerman, Yong-Dong Wang, Shelley Orwick, Douglas S. Zatechka, Jassada Buaboonnam, Geoffrey A. Neale, et al. 2013. « Emergence of Polyclonal FLT3 Tyrosine Kinase Domain Mutations during Sequential Therapy with Sorafenib and Sunitinib in FLT3-ITD-Positive Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical Cancer Research* 19(20): 5758-68. doi:10.1158/1078-0432.CCR-13-1323.
- Balasubramani, Anand, Antti Larjo, Jed A. Bassein, Xing Chang, Ryan B. Hastie, Susan M. Togher, Harri Lähdesmäki, et Anjana Rao. 2015. « Cancer-Associated ASXL1 Mutations May Act as Gain-of-Function Mutations of the ASXL1-BAP1 Complex ». *Nature Communications* 6(1): 7307. doi:10.1038/ncomms8307.

- Balsat, Marie, Aline Renneville, Xavier Thomas, Stéphane de Botton, Denis Caillot, Alice Marceau, Emilie Lemasle, et al. 2017. « Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 35(2): 185-93. doi:10.1200/JCO.2016.67.1875.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1976. « Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-Operative Group ». *British Journal of Haematology* 33(4): 451-58. doi:10.1111/j.1365-2141.1976.tb03563.x.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1985. « Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. A Report of the French-American-British Cooperative Group ». *Annals of Internal Medicine* 103(4): 620-25. doi:10.7326/0003-4819-103-4-620.
- Bernt, Kathrin M., Nan Zhu, Amit U. Sinha, Sridhar Vempati, Joerg Faber, Andrei V. Krivtsov, Zhaohui Feng, et al. 2011. « MLL-Rearranged Leukemia Is Dependent on Aberrant H3K79 Methylation by DOT1L ». *Cancer Cell* 20(1): 66-78. doi:10.1016/j.ccr.2011.06.010.
- Bezerra, Matheus F., Aleide S. Lima, Maria-Riera Piqué-Borràs, Douglas R. Silveira, Juan L. Coelho-Silva, Diego A. Pereira-Martins, Isabel Weinhäuser, et al. 2020. « Co-Occurrence of DNMT3A, NPM1, FLT3 Mutations Identifies a Subset of Acute Myeloid Leukemia with Adverse Prognosis ». *Blood* 135(11): 870-75. doi:10.1182/blood.2019003339.
- Blätte, Tamara J., Laura K. Schmalbrock, Sabrina Skambraks, Susanne Lux, Sibylle Cocciardi, Anna Dolnik, Hartmut Döhner, Konstanze Döhner, et Lars Bullinger. 2019. « getITD for FLT3-ITD-Based MRD Monitoring in AML ». *Leukemia* 33(10): 2535-39. doi:10.1038/s41375-019-0483-z.
- Boddu, Prajwal, Hagop Kantarjian, Gautam Borthakur, Tapan Kadia, Naval Daver, Sherry Pierce, Michael Andreeff, et al. 2017. « Co-Occurrence of FLT3-TKD and NPM1 Mutations Defines a Highly Favorable Prognostic AML Group ». *Blood Advances* 1(19): 1546-50. doi:10.1182/bloodadvances.2017009019.
- de Boer, Bauke, Janine Prick, Maurien G. Pruis, Peter Keane, Maria Rosaria Imperato, Jennifer Jaques, Annet Z. Brouwers-Vos, et al. 2018. « Prospective Isolation and Characterization of Genetically and Functionally Distinct AML Subclones ». *Cancer Cell* 34(4): 674-689.e8. doi:10.1016/j.ccell.2018.08.014.
- Bolouri, Hamid, Jason E Farrar, Timothy Triche, Rhonda E Ries, Emilia L Lim, Todd A Alonzo, Yussanne Ma, et al. 2018. « The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions ». *Nature medicine* 24(1): 103-12. doi:10.1038/nm.4439.
- Borrow, Julian, Sara A. Dyer, Susanna Akiki, et Michael J. Griffiths. 2019. « Terminal deoxynucleotidyl transferase promotes acute myeloid leukemia by priming FLT3-ITD replication slippage ». *Blood* 134(25): 2281-90. doi:10.1182/blood.2019001238.
- Borthakur, Gautam, Hagop Kantarjian, Farhad Ravandi, Weiguo Zhang, Marina Konopleva, John J. Wright, Stefan Faderl, et al. 2011. « Phase I Study of Sorafenib in Patients with Refractory or Relapsed Acute Leukemias ». *Haematologica* 96(1): 62-68. doi:10.3324/haematol.2010.030452.
- Borthakur, Gautam, Zhihong Zeng, Jorge E. Cortes, Hsiang-Chun Chen, Xuelin Huang, Marina Konopleva, Farhad Ravandi, et al. 2020. « Phase 1 Study of Combinatorial Sorafenib, G-CSF, and Plerixafor Treatment in Relapsed/Refractory, FLT3-ITD-Mutated Acute Myelogenous Leukemia Patients ». *American Journal of Hematology* 95(11): 1296-1303. doi:10.1002/ajh.25943.
- Boudry, Augustin, Sasha Darmon, Nicolas Duployez, Martin Figeac, Sandrine Geffroy, Maxime Bucci, Karine Celli-Lebras, et al. 2022. « Frugal alignment-free identification of FLT3-internal tandem duplications with FiLT3r ». *BMC Bioinformatics* 23(1): 448. doi:10.1186/s12859-022-04983-6.
- Breitenbuecher, Frank, Boyka Markova, Stefan Kasper, Birgit Carius, Torsten Stauder, Frank D. Böhmer, Kristina Masson, et al. 2009. « A Novel Molecular Mechanism of Primary Resistance to FLT3-Kinase Inhibitors in AML ». *Blood* 113(17): 4063-73. doi:10.1182/blood-2007-11-126664.

- Brose, Marcia S., Christopher M. Nutting, Barbara Jarzab, Rossella Elisei, Salvatore Siena, Lars Bastholt, Christelle de la Fouchardiere, et al. 2014. « Sorafenib in Radioactive Iodine-Refractory, Locally Advanced or Metastatic Differentiated Thyroid Cancer: A Randomised, Double-Blind, Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 384(9940): 319-28. doi:10.1016/S0140-6736(14)60421-9.
- Bruner, J. Kyle, Hayley S. Ma, Li Li, Alice Can Ran Qin, Michelle A. Rudek, Richard J. Jones, Mark J. Levis, et al. 2017. « Adaptation to TKI Treatment Reactivates ERK Signaling in Tyrosine Kinase-Driven Leukemias and Other Malignancies ». *Cancer Research* 77(20): 5554-63. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2593.
- Brunetti, Lorenzo, Michael C. Gundry, Daniele Sorcini, Anna G. Guzman, Yung-Hsin Huang, Raghav Ramabadran, Ilaria Gionfriddo, et al. 2018. « Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression ». *Cancer Cell* 34(3): 499-512.e9. doi:10.1016/j.ccell.2018.08.005.
- Bullinger, L., J. Krönke, C. Schön, I. Radtke, K. Urbauer, U. Botzenhardt, V. Gaidzik, et al. 2010. « Identification of Acquired Copy Number Alterations and Uniparental Disomies in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia Using High-Resolution Single-Nucleotide Polymorphism Analysis ». *Leukemia* 24(2): 438-49. doi:10.1038/leu.2009.263.
- Bullinger, Lars, Konstanze Döhner, et Hartmut Döhner. 2017. « Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways ». *Journal of Clinical Oncology* 35(9): 934-46. doi:10.1200/JCO.2016.71.2208.
- Burchert, Andreas, Gesine Bug, Lea V. Fritz, Jürgen Finke, Matthias Stelljes, Christoph Röllig, Ellen Wollmer, et al. 2020. « Sorafenib Maintenance After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Acute Myeloid Leukemia With FLT3-Internal Tandem Duplication Mutation (SORMAIN) ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 38(26): 2993-3002. doi:10.1200/JCO.19.03345.
- Cancer Genome Atlas Research Network, Timothy J. Ley, Christopher Miller, Li Ding, Benjamin J. Raphael, Andrew J. Mungall, A. Gordon Robertson, et al. 2013. « Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 368(22): 2059-74. doi:10.1056/NEJMoa1301689.
- Carow, C. E., E. Kim, A. L. Hawkins, H. D. Webb, C. A. Griffin, E. W. Jabs, C. I. Civin, et D. Small. 1995. « Localization of the Human Stem Cell Tyrosine Kinase-1 Gene (FLT3) to 13q12-->q13 ». *Cytogenetics and Cell Genetics* 70(3-4): 255-57. doi:10.1159/000134046.
- Castaigne, Sylvie, Cécile Pautas, Christine Terré, Emmanuel Raffoux, Dominique Bordessoule, Jean-Noel Bastie, Ollivier Legrand, et al. 2012. « Effect of Gemtuzumab Ozogamicin on Survival of Adult Patients with De-Novo Acute Myeloid Leukaemia (ALFA-0701): A Randomised, Open-Label, Phase 3 Study ». *Lancet (London, England)* 379(9825): 1508-16. doi:10.1016/S0140-6736(12)60485-1.
- Challen, Grant A., Deqiang Sun, Mira Jeong, Min Luo, Jaroslav Jelinek, Jonathan S. Berg, Christoph Bock, et al. 2012. « Dnmt3a Is Essential for Hematopoietic Stem Cell Differentiation ». *Nature Genetics* 44(1): 23-31. doi:10.1038/ng.1009.
- Chang, Yu-Ting, Daniela Hernandez, Salvador Alonso, Minling Gao, Meng Su, Gabriel Ghiaur, Mark J. Levis, et Richard J. Jones. 2019. « Role of CYP3A4 in Bone Marrow Microenvironment-Mediated Protection of FLT3/ITD AML from Tyrosine Kinase Inhibitors ». *Blood Advances* 3(6): 908-16. doi:10.1182/bloodadvances.2018022921.
- Chao, Alexander K., Julia A. Meyer, Alex G. Lee, Anna Hecht, Theodore Tarver, Jessica Van Ziffle, Ashley K. Koegel, et al. 2020. « Fusion driven JMML: a novel CCDC88C-FLT3 fusion responsive to sorafenib identified by RNA sequencing ». *Leukemia* 34(2): 662-66. doi:10.1038/s41375-019-0549-y.
- Chatain, N., R. C. Perera, G. Rossetti, J. Rossa, P. Carloni, M. Schemionek, T. Haferlach, et al. 2015. « Rare FLT3 Deletion Mutants May Provide Additional Treatment Options to Patients with AML: An Approach to Individualized Medicine ». *Leukemia* 29(12): 2434-38. doi:10.1038/leu.2015.131.
- Chiba, Kenichi, Yuichi Shiraishi, Yasunobu Nagata, Kenichi Yoshida, Seiya Imoto, Seishi Ogawa, et Satoru Miyano. 2015. « Genomon ITDetector: A Tool for Somatic Internal Tandem Duplication Detection from Cancer Genome Sequencing Data ». *Bioinformatics (Oxford, England)* 31(1): 116-18. doi:10.1093/bioinformatics/btu593.

- Cloos, J., B. F. Goemans, C. J. Hess, J. W. van Oostveen, Q. Waisfisz, S. Corthals, D. de Lange, et al. 2006. « Stability and Prognostic Influence of FLT3 Mutations in Paired Initial and Relapsed AML Samples ». *Leukemia* 20(7): 1217-20. doi:10.1038/sj.leu.2404246.
- Cornelissen, Jan J., et Didier Blaise. 2016. « Hematopoietic Stem Cell Transplantation for Patients with AML in First Complete Remission ». *Blood* 127(1): 62-70. doi:10.1182/blood-2015-07-604546.
- Cortes, Jorge E., Samer Khaled, Giovanni Martinelli, Alexander E. Perl, Siddhartha Ganguly, Nigel Russell, Alwin Krämer, et al. 2019. « Quizartinib versus Salvage Chemotherapy in Relapsed or Refractory FLT3-ITD Acute Myeloid Leukaemia (QuANTUM-R): A Multicentre, Randomised, Controlled, Open-Label, Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 20(7): 984-97. doi:10.1016/S1470-2045(19)30150-0.
- Cucchi, David G. J., Barbara Denys, Gertjan J. L. Kaspers, Jeroen J. W. M. Janssen, Gert J. Ossenkoppele, Valérie de Haas, C. Michel Zwaan, et al. 2018. « RNA-based FLT3-ITD allelic ratio is associated with outcome and ex vivo response to FLT3 inhibitors in pediatric AML ». *Blood* 131(22): 2485-89. doi:10.1182/blood-2017-12-819508.
- Cucchi, David G. J., Christian M. Vonk, Melissa Rijken, François G. Kavelaars, Pauline A. Merle, Elvira Verhoef, Bianca Venniker-Punt, et al. 2021. « DNA vs cDNA FLT3-ITD Allelic Ratio and Length Measurements in Adult Acute Myeloid Leukemia ». *Blood Advances* 5(21): 4476-79. doi:10.1182/bloodadvances.2021004980.
- Dal Bello, Reinaldo, Justine Pasanisi, Romane Joudinaud, Matthieu Duchmann, Bryann Pardieu, Paolo Ayaka, Giuseppe Di Feo, et al. 2022. « A Multiparametric Niche-like Drug Screening Platform in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood Cancer Journal* 12(6): 95. doi:10.1038/s41408-022-00689-3.
- Daver, Naval, Alexander E. Perl, Joseph Maly, Mark Levis, Ellen Ritchie, Mark R. Litzow, James McCloskey, et al. 2021. « Venetoclax in Combination with Gilteritinib Demonstrates Molecular Clearance of FLT3 mutation in Relapsed/Refractory FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 138: 691. doi:10.1182/blood-2021-150743.
- Daver, Naval, Richard F. Schlenk, Nigel H. Russell, et Mark J. Levis. 2019. « Targeting FLT3 Mutations in AML: Review of Current Knowledge and Evidence ». *Leukemia* 33(2): 299-312. doi:10.1038/s41375-018-0357-9.
- Daver, Naval, Paolo Strati, Elias Jabbour, Tapan Kadia, Raja Luthra, Sa Wang, Keyur Patel, et al. 2013. « FLT3 Mutations in Myelodysplastic Syndrome and Chronic Myelomonocytic Leukemia ». *American Journal of Hematology* 88(1): 56-59. doi:10.1002/ajh.23345.
- Dillon, Laura W., Gege Gui, Niveditha Ravindra, Georgia Andrew, Devdeep Mukherjee, Zoë C. Wong, Ying Huang, et al. 2024. « Measurable Residual FLT3 Internal Tandem Duplication Before Allogeneic Transplant for Acute Myeloid Leukemia ». *JAMA oncology*: e240985. doi:10.1001/jamaoncol.2024.0985.
- DiNardo, Courtney D., Brian A. Jonas, Vinod Pullarkat, Michael J. Thirman, Jacqueline S. Garcia, Andrew H. Wei, Marina Konopleva, et al. 2020. « Azacitidine and Venetoclax in Previously Untreated Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 383(7): 617-29. doi:10.1056/NEJMoa2012971.
- DiNardo, Courtney D., Eytan M. Stein, Stéphane De Botton, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Alice S. Mims, Ronan Swords, et al. 2018. « Durable Remissions with Ivosidenib in IDH1 -Mutated Relapsed or Refractory AML ». *New England Journal of Medicine* 378(25): 2386-98. doi:10.1056/NEJMoa1716984.
- Ding, Li, Timothy J. Ley, David E. Larson, Christopher A. Miller, Daniel C. Koboldt, John S. Welch, Julie K. Ritchey, et al. 2012. « Clonal Evolution in Relapsed Acute Myeloid Leukaemia Revealed by Whole-Genome Sequencing ». *Nature* 481(7382): 506-10. doi:10.1038/nature10738.
- Döhner, Hartmut, Elihu Estey, David Grimwade, Sergio Amadori, Frederick R. Appelbaum, Thomas Büchner, Hervé Dombret, et al. 2016. « Diagnosis and Management of AML in Adults: 2017 ELN Recommendations from an International Expert Panel ». *Blood*: blood-2016-08-733196. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.

- Döhner, Hartmut, Keith W. Pratz, Courtney D. DiNardo, Andrew H. Wei, Brian A. Jonas, Vinod Pullarkat, Michael J. Thirman, et al. 2024. « Genetic Risk Stratification and Outcomes Among Treatment-Naive Patients With AML Treated With Venetoclax and Azacitidine ». *Blood*: blood.2024024944. doi:10.1182/blood.2024024944.
- Döhner, Hartmut, Andrew H. Wei, Frederick R. Appelbaum, Charles Craddock, Courtney D. DiNardo, Hervé Dombret, Benjamin L. Ebert, et al. 2022. « Diagnosis and Management of AML in Adults: 2022 Recommendations from an International Expert Panel on Behalf of the ELN ». *Blood* 140(12): 1345-77. doi:10.1182/blood.2022016867.
- Döhner, Hartmut, Daniel J. Weisdorf, et Clara D. Bloomfield. 2015. « Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 373(12): 1136-52. doi:10.1056/NEJMra1406184.
- Döhner, Konstanze, Christian Thiede, Nikolaus Jahn, Ekaterina Panina, Agnes Gambietz, Richard A. Larson, Thomas W. Prior, et al. 2020. « Impact of NPM1/FLT3-ITD genotypes defined by the 2017 European LeukemiaNet in patients with acute myeloid leukemia ». *Blood* 135(5): 371-80. doi:10.1182/blood.2019002697.
- Duchmann, Matthieu, Lucie Laplane, et Raphael Itzykson. 2021. « Clonal Architecture and Evolutionary Dynamics in Acute Myeloid Leukemias ». *Cancers* 13(19): 4887. doi:10.3390/cancers13194887.
- Dumas, Pierre-Yves, Emmanuel Raffoux, Emilie Bérard, Sarah Bertoli, Marie-Anne Hospital, Maël Heiblig, Yohann Desbrosses, et al. 2023. « Gilteritinib Activity in Refractory or Relapsed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia Patients Previously Treated by Intensive Chemotherapy and Midostaurin: A Study from the French AML Intergroup ALFA/FILO ». *Leukemia* 37(1): 91-101. doi:10.1038/s41375-022-01742-7.
- Duployez, Nicolas, Alice Marceau-Renaut, Nicolas Boissel, Arnaud Petit, Maxime Bucci, Sandrine Geffroy, Hélène Lapillonne, et al. 2016. « Comprehensive Mutational Profiling of Core Binding Factor Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 127(20): 2451-59. doi:10.1182/blood-2015-12-688705.
- Duployez, Nicolas, Loïc Vasseur, Rathana Kim, Laëtitia Largeaud, Marie Passet, Anaïs L'Haridon, Pierre Lemaire, et al. 2023. « UBTF Tandem Duplications Define a Distinct Subtype of Adult de Novo Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 37(6): 1245-53. doi:10.1038/s41375-023-01906-z.
- Ebihara, Y., K. Tsuji, S. D. Lyman, X. Sui, M. Yoshida, K. Muraoka, K. Yamada, R. Tanaka, et T. Nakahata. 1997. « Synergistic Action of Flt3 and Gp130 Signalings in Human Hematopoiesis ». *Blood* 90(11): 4363-68.
- Erba, Harry P., Pau Montesinos, Hee-Je Kim, Elżbieta Patkowska, Radovan Vrhovac, Pavel Žák, Po-Nan Wang, et al. 2023. « Quizartinib plus Chemotherapy in Newly Diagnosed Patients with FLT3-Internal-Tandem-Duplication-Positive Acute Myeloid Leukaemia (QuANTUM-First): A Randomised, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 3 Trial ». *Lancet (London, England)* 401(10388): 1571-83. doi:10.1016/S0140-6736(23)00464-6.
- Escudier, Bernard, Tim Eisen, Walter M. Stadler, Cezary Szczylik, Stéphane Oudard, Michael Siebels, Sylvie Negrier, et al. 2007. « Sorafenib in Advanced Clear-Cell Renal-Cell Carcinoma ». *New England Journal of Medicine* 356(2): 125-34. doi:10.1056/NEJMoa060655.
- Fabbro, D., E. Buchdunger, J. Wood, J. Mestan, F. Hofmann, S. Ferrari, H. Mett, T. O'Reilly, et T. Meyer. 1999. « Inhibitors of Protein Kinases: CGP 41251, a Protein Kinase Inhibitor with Potential as an Anticancer Agent ». *Pharmacology & Therapeutics* 82(2-3): 293-301. doi:10.1016/s0163-7258(99)00005-4.
- Falini, Brunangelo, Lorenzo Brunetti, Paolo Sportoletti, et Maria Paola Martelli. 2020. « NPM1-mutated acute myeloid leukemia: from bench to bedside ». *Blood* 136(15): 1707-21. doi:10.1182/blood.2019004226.
- Falini, Brunangelo, Cristina Mecucci, Enrico Tiacci, Myriam Alcalay, Roberto Rosati, Laura Pasqualucci, Roberta La Starza, et al. 2005. « Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype ». *The New England Journal of Medicine* 352(3): 254-66. doi:10.1056/NEJMoa041974.

- Figuroa, Maria E., Omar Abdel-Wahab, Chao Lu, Patrick S. Ward, Jay Patel, Alan Shih, Yushan Li, et al. 2010. « Leukemic IDH1 and IDH2 Mutations Result in a Hypermethylation Phenotype, Disrupt TET2 Function, and Impair Hematopoietic Differentiation ». *Cancer Cell* 18(6): 553-67. doi:10.1016/j.ccr.2010.11.015.
- Fircanis, Sophia, Priscilla Merriam, Naushaba Khan, et Jorge J. Castillo. 2014. « The Relation between Cigarette Smoking and Risk of Acute Myeloid Leukemia: An Updated Meta-Analysis of Epidemiological Studies ». *American Journal of Hematology* 89(8): E125-132. doi:10.1002/ajh.23744.
- Fischer, Thomas, Richard M. Stone, Daniel J. Deangelo, Ilene Galinsky, Elihu Estey, Carlo Lanza, Edward Fox, et al. 2010. « Phase IIB Trial of Oral Midostaurin (PKC412), the FMS-like Tyrosine Kinase 3 Receptor (FLT3) and Multi-Targeted Kinase Inhibitor, in Patients with Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome with Either Wild-Type or Mutated FLT3 ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 28(28): 4339-45. doi:10.1200/JCO.2010.28.9678.
- Fröhling, Stefan, Claudia Scholl, Ross L. Levine, Marc Loriaux, Titus J. Boggon, Olivier A. Bernard, Roland Berger, et al. 2007. « Identification of Driver and Passenger Mutations of FLT3 by High-Throughput DNA Sequence Analysis and Functional Assessment of Candidate Alleles ». *Cancer Cell* 12(6): 501-13. doi:10.1016/j.ccr.2007.11.005.
- Gale, Rosemary E., Claire Green, Christopher Allen, Adam J. Mead, Alan K. Burnett, Robert K. Hills, David C. Linch, et Medical Research Council Adult Leukaemia Working Party. 2008. « The Impact of FLT3 Internal Tandem Duplication Mutant Level, Number, Size, and Interaction with NPM1 Mutations in a Large Cohort of Young Adult Patients with Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 111(5): 2776-84. doi:10.1182/blood-2007-08-109090.
- van Galen, Peter, Volker Hovestadt, Marc H. Wadsworth II, Travis K. Hughes, Gabriel K. Griffin, Sofia Battaglia, Julia A. Verga, et al. 2019. « Single-Cell RNA-Seq Reveals AML Hierarchies Relevant to Disease Progression and Immunity ». *Cell* 176(6): 1265-1281.e24. doi:10.1016/j.cell.2019.01.031.
- Garg, Manoj, Yasunobu Nagata, Deepika Kanojia, Anand Mayakonda, Kenichi Yoshida, Sreya Haridas Keloth, Zhi Jiang Zang, et al. 2015. « Profiling of somatic mutations in acute myeloid leukemia with FLT3-ITD at diagnosis and relapse ». *Blood* 126(22): 2491-2501. doi:10.1182/blood-2015-05-646240.
- Ge, Shuai-Shuai, Qiao-Cheng Qiu, Hai-Ping Dai, Xiang-Dong Shen, Tian-Mei Wu, Jia-Hui Du, Chao-Ling Wan, et al. 2023. « Mutation Spectrum of FLT3 and Significance of Non-Canonical FLT3 Mutations in Haematological Malignancy ». *British Journal of Haematology* 202(3): 539-49. doi:10.1111/bjh.18877.
- Gombart, Adrian F., Wolf-K. Hofmann, Seiji Kawano, Seisho Takeuchi, Utz Krug, Scott H. Kwok, Renee J. Larsen, et al. 2002. « Mutations in the Gene Encoding the Transcription Factor CCAAT/Enhancer Binding Protein α in Myelodysplastic Syndromes and Acute Myeloid Leukemias ». *Blood* 99(4): 1332-40. doi:10.1182/blood.V99.4.1332.
- Gotlib, Jason, Hanneke C. Kluin-Nelemans, Tracy I. George, Cem Akin, Karl Sotlar, Olivier Hermine, Farrukh T. Awan, et al. 2016. « Efficacy and Safety of Midostaurin in Advanced Systemic Mastocytosis ». *The New England Journal of Medicine* 374(26): 2530-41. doi:10.1056/NEJMoa1513098.
- Griffith, James, James Black, Carlos Faerman, Lora Swenson, Michael Wynn, Fan Lu, Judith Lippke, et Kumkum Saxena. 2004. « The Structural Basis for Autoinhibition of FLT3 by the Juxtamembrane Domain ». *Molecular Cell* 13(2): 169-78. doi:10.1016/s1097-2765(03)00505-7.
- Grisendi, Silvia, Rosa Bernardi, Marco Rossi, Ke Cheng, Luipa Khandker, Katia Manova, et Pier Paolo Pandolfi. 2005. « Role of Nucleophosmin in Embryonic Development and Tumorigenesis ». *Nature* 437(7055): 147-53. doi:10.1038/nature03915.
- Grob, Tim, Adil S. A. Al Hinai, Mathijs A. Sanders, François G. Kavelaars, Melissa Rijken, Patrycja L. Gradowska, Bart J. Biemond, et al. 2022. « Molecular Characterization of Mutant *TP53* Acute Myeloid Leukemia and High-Risk Myelodysplastic Syndrome ». *Blood* 139(15): 2347-54. doi:10.1182/blood.2021014472.

- Grob, Tim, Mathijs A. Sanders, Christian M. Vonk, François G. Kavelaars, Melissa Rijken, Diana W. Hanekamp, Patrycja L. Gradowska, et al. 2022. « Prognostic Value of FLT3-Internal Tandem Duplication Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*: JCO2200715. doi:10.1200/JCO.22.00715.
- Gronseth, Christine M., Scott E. McElhone, Barry E. Storer, Kathleen A. Kroeger, Vicky Sandhu, Matthew L. Fero, Frederick R. Appelbaum, Elihu H. Estey, et Min Fang. 2015. « Prognostic Significance of Acquired Copy-Neutral Loss of Heterozygosity in Acute Myeloid Leukemia: Prognostic Significance of cnLOH in AML ». *Cancer* 121(17): 2900-2908. doi:10.1002/cncr.29475.
- Hayakawa, F., M. Towatari, H. Kiyoi, M. Tanimoto, T. Kitamura, H. Saito, et T. Naoe. 2000. « Tandem-Duplicated Flt3 Constitutively Activates STAT5 and MAP Kinase and Introduces Autonomous Cell Growth in IL-3-Dependent Cell Lines ». *Oncogene* 19(5): 624-31. doi:10.1038/sj.onc.1203354.
- He, Rong, Daniel J. Devine, Zheng Jin Tu, Ming Mai, Dong Chen, Phuong L. Nguyen, Jennifer L. Oliveira, et al. 2020. « Hybridization Capture-Based next Generation Sequencing Reliably Detects FLT3 Mutations and Classifies FLT3-Internal Tandem Duplication Allelic Ratio in Acute Myeloid Leukemia: A Comparative Study to Standard Fragment Analysis ». *Modern Pathology* 33(3): 334-43. doi:10.1038/s41379-019-0359-9.
- Heidel, Florian, Fian K. Solem, Frank Breitenbuecher, Daniel B. Lipka, Stefan Kasper, M. H. Thiede, Christian Brandts, et al. 2006. « Clinical resistance to the kinase inhibitor PKC412 in acute myeloid leukemia by mutation of Asn-676 in the FLT3 tyrosine kinase domain ». *Blood* 107(1): 293-300. doi:10.1182/blood-2005-06-2469.
- Heuser, Michael, Sylvie D. Freeman, Gert J. Ossenkoppele, Francesco Buccisano, Christopher S. Hourigan, Lok Lam Ngai, Jesse M. Tetters, et al. 2021. « 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party ». *Blood* 138(26): 2753-67. doi:10.1182/blood.2021013626.
- Hollink, Iris H. I. M., Marry M. van den Heuvel-Eibrink, Susan T. C. J. M. Arentsen-Peters, Marta Pratcorona, Saman Abbas, Jenny E. Kuipers, Janneke F. van Galen, et al. 2011. « NUP98/NSD1 Characterizes a Novel Poor Prognostic Group in Acute Myeloid Leukemia with a Distinct HOX Gene Expression Pattern ». *Blood* 118(13): 3645-56. doi:10.1182/blood-2011-04-346643.
- Jahn, Nikolaus, Ekaterina Jahn, Maral Saadati, Lars Bullinger, Richard A. Larson, Tiziana Ottone, Sergio Amadori, et al. 2022. « Genomic Landscape of Patients with FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML) Treated within the CALGB 10603/RATIFY Trial ». *Leukemia* 36(9): 2218-27. doi:10.1038/s41375-022-01650-w.
- Jaiswal, Siddhartha, Pierre Fontanillas, Jason Flannick, Alisa Manning, Peter V. Grauman, Brenton G. Mar, R. Coleman Lindsley, et al. 2014. « Age-Related Clonal Hematopoiesis Associated with Adverse Outcomes ». *The New England Journal of Medicine* 371(26): 2488-98. doi:10.1056/NEJMoa1408617.
- Janssen, Maike, Christina Schmidt, Peter-Martin Bruch, Maximilian F. Blank, Christian Rohde, Alexander Waclawiczek, Daniel Heid, et al. 2022. « Venetoclax Synergizes with Gilteritinib in FLT3 Wild-Type High-Risk Acute Myeloid Leukemia by Suppressing MCL-1 ». *Blood* 140(24): 2594-2610. doi:10.1182/blood.2021014241.
- Jia, Yannan, Weiguo Zhang, Mahesh Basyal, Kyung Hee Chang, Lauren Ostermann, Jared K. Burks, Charlie Ly, et al. 2023. « FLT3 Inhibitors Upregulate CXCR4 and E-Selectin Ligands via ERK Suppression in AML Cells and CXCR4/E-Selectin Inhibition Enhances Anti-Leukemia Efficacy of FLT3-Targeted Therapy in AML ». *Leukemia* 37(6): 1379-83. doi:10.1038/s41375-023-01897-x.
- Jiang, Jingrui, J. Guillermo Paez, Jeffrey C. Lee, Ronghai Bo, Richard M. Stone, Daniel J. DeAngelo, Ilene Galinsky, et al. 2004. « Identifying and characterizing a novel activating mutation of the FLT3 tyrosine kinase in AML ». *Blood* 104(6): 1855-58. doi:10.1182/blood-2004-02-0712.
- Joshi, Sunil K., Tamilla Nechiporuk, Daniel Bottomly, Paul D. Piehowski, Julie A. Reisz, Janét Pittsenbarger, Andy Kaempf, et al. 2021. « The AML Microenvironment Catalyzes a Stepwise Evolution to Gilteritinib Resistance ». *Cancer Cell* 39(7): 999-1014.e8. doi:10.1016/j.ccell.2021.06.003.

- Juliusson, Gunnar, Petar Antunovic, Åsa Derolf, Sören Lehmann, Lars Möllgård, Dick Stockelberg, Ulf Tidefelt, Anders Wahlin, et Martin Höglund. 2009. « Age and acute myeloid leukemia: real world data on decision to treat and outcomes from the Swedish Acute Leukemia Registry ». *Blood* 113(18): 4179-87. doi:10.1182/blood-2008-07-172007.
- Kawashima, Naomi, Yuichi Ishikawa, Jeong Hui Kim, Yoko Ushijima, Akimi Akashi, Yohei Yamaguchi, Hikaru Hattori, et al. 2022. « Comparison of Clonal Architecture between Primary and Immunodeficient Mouse-Engrafted Acute Myeloid Leukemia Cells ». *Nature Communications* 13(1): 1624. doi:10.1038/s41467-022-29304-6.
- Kayser, Sabine, Richard F. Schlenk, Martina Correa Londono, Frank Breitenbuecher, Kerstin Wittke, Juan Du, Silja Groner, et al. 2009. « Insertion of FLT3 Internal Tandem Duplication in the Tyrosine Kinase Domain-1 Is Associated with Resistance to Chemotherapy and Inferior Outcome ». *Blood* 114(12): 2386-92. doi:10.1182/blood-2009-03-209999.
- Ke, Yi-Yu, Vivek Kumar Singh, Mohane Selvaraj Coumar, Yung Chang Hsu, Wen-Chieh Wang, Jen-Shin Song, Chun-Hwa Chen, et al. 2015. « Homology Modeling of DFG-in FMS-like Tyrosine Kinase 3 (FLT3) and Structure-Based Virtual Screening for Inhibitor Identification ». *Scientific Reports* 5(1). doi:10.1038/srep11702.
- Khoury, Joseph D., Eric Solary, Oussama Abla, Yasmine Akkari, Rita Alaggio, Jane F. Apperley, Rafael Bejar, et al. 2022. « The 5th Edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms ». *Leukemia* 36(7): 1703-19. doi:10.1038/s41375-022-01613-1.
- Kihara, R., Y. Nagata, H. Kiyoi, T. Kato, E. Yamamoto, K. Suzuki, F. Chen, et al. 2014. « Comprehensive Analysis of Genetic Alterations and Their Prognostic Impacts in Adult Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Leukemia* 28(8): 1586-95. doi:10.1038/leu.2014.55.
- Kim, TaeHyung, Hyewon Lee, Jose-Mario Capo-Chichi, Myung Hee Chang, Young Seok Yoo, Gurbaksh Basi, Troy Ketela, et al. 2022. « Single Cell Proteogenomic Sequencing Identifies a Relapse-Fated AML Subclone Carrying FLT3-ITD with CN-LOH at Chr13q ». *EJHaem* 3(2): 426-33. doi:10.1002/jha2.390.
- Kim, Y, G D Lee, J Park, J-H Yoon, H-J Kim, W-S Min, et M Kim. 2015. « Quantitative fragment analysis of FLT3-ITD efficiently identifying poor prognostic group with high mutant allele burden or long ITD length ». *Blood Cancer Journal* 5(8): e336. doi:10.1038/bcj.2015.61.
- Kindler, Thomas, Frank Breitenbuecher, Stefan Kasper, Eli Estey, Francis Giles, Eric Feldman, Gerhard Ehninger, et al. 2005. « Identification of a Novel Activating Mutation (Y842C) within the Activation Loop of FLT3 in Patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) ». *Blood* 105(1): 335-40. doi:10.1182/blood-2004-02-0660.
- Kiyoi, H., M. Towatari, S. Yokota, M. Hamaguchi, R. Ohno, H. Saito, et T. Naoe. 1998. « Internal Tandem Duplication of the FLT3 Gene Is a Novel Modality of Elongation Mutation Which Causes Constitutive Activation of the Product ». *Leukemia* 12(9): 1333-37. doi:10.1038/sj.leu.2401130.
- Kohl, T. M., C. Hellinger, F. Ahmed, C. Buske, W. Hiddemann, S. K. Bohlander, et K. Spiekermann. 2007. « BH3 Mimetic ABT-737 Neutralizes Resistance to FLT3 Inhibitor Treatment Mediated by FLT3-Independent Expression of BCL2 in Primary AML Blasts ». *Leukemia* 21(8): 1763-72. doi:10.1038/sj.leu.2404776.
- Kok, Chung H., Anna L. Brown, Michelle Perugini, Diana G. Larossi, Ian D. Lewis, et Richard J. D'Andrea. 2013. « The Preferential Occurrence of FLT3-TKD Mutations in Inv(16) AML and Impact on Survival Outcome: A Combined Analysis of 1053 Core-Binding Factor AML Patients ». *British Journal of Haematology* 160(4): 557-59. doi:10.1111/bjh.12131.
- Koschade, Sebastian E., Kevin Klann, Shabnam Shaid, Binje Vick, Jan A. Stratmann, Marlyn Thölken, Laura M. Meyer, et al. 2022. « Translatome Proteomics Identifies Autophagy as a Resistance Mechanism to On-Target FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 36(10): 2396-2407. doi:10.1038/s41375-022-01678-y.

- Kottaridis, Panagiotis D., Rosemary E. Gale, Marion E. Frew, Georgina Harrison, Stephen E. Langabeer, Andrea A. Belton, Helen Walker, et al. 2001. « 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* 98(6): 1752-59. doi:10.1182/blood.V98.6.1752.
- Kozarewa, Iwanka, Javier Armisen, Andrew F. Gardner, Barton E. Slatko, et C.I. Hendrickson. 2015. « Overview of Target Enrichment Strategies ». *Current Protocols in Molecular Biology* 112(1): 7.21.1-7.21.23. doi:10.1002/0471142727.mb0721s112.
- Krönke, Jan, Lars Bullinger, Veronica Teleanu, Florian Tschürtz, Verena I. Gaidzik, Michael W. M. Kühn, Frank G. Rücker, et al. 2013. « Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia ». *Blood* 122(1): 100-108. doi:10.1182/blood-2013-01-479188.
- Kühn, Michael W. M., Michael J. Hadler, Scott R. Daigle, Richard P. Koche, Andrei V. Krivtsov, Edward J. Olhava, Michael A. Caligiuri, et al. 2015. « MLL Partial Tandem Duplication Leukemia Cells Are Sensitive to Small Molecule DOT1L Inhibition ». *Haematologica* 100(5): e190-93. doi:10.3324/haematol.2014.115337.
- Kuo, Ya-Huei, Sean F. Landrette, Susan A. Heilman, Paola N. Perrat, Lisa Garrett, Pu P. Liu, Michelle M. Le Beau, Scott C. Kogan, et Lucio H. Castilla. 2006. « Cbfβ-SMMHC Induces Distinct Abnormal Myeloid Progenitors Able to Develop Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Cell* 9(1): 57-68. doi:10.1016/j.ccr.2005.12.014.
- Lachowiez, Curtis A., Nicola Long, Jennifer Saultz, Arpita Gandhi, Laura F. Newell, Brandon Hayes-Lattin, Richard T. Maziarz, et al. 2023. « Comparison and Validation of the 2022 European LeukemiaNet Guidelines in Acute Myeloid Leukemia ». *Blood Advances* 7(9): 1899-1909. doi:10.1182/bloodadvances.2022009010.
- Lancet, Jeffrey E., Geoffrey L. Uy, Jorge E. Cortes, Laura F. Newell, Tara L. Lin, Ellen K. Ritchie, Robert K. Stuart, et al. 2018. « CPX-351 (Cytarabine and Daunorubicin) Liposome for Injection Versus Conventional Cytarabine Plus Daunorubicin in Older Patients With Newly Diagnosed Secondary Acute Myeloid Leukemia ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 36(26): 2684-92. doi:10.1200/JCO.2017.77.6112.
- Lavagna-Sévenier, C., S. Marchetto, D. Birnbaum, et O. Rosnet. 1998. « FLT3 Signaling in Hematopoietic Cells Involves CBL, SHC and an Unknown P115 as Prominent Tyrosine-Phosphorylated Substrates ». *Leukemia* 12(3): 301-10. doi:10.1038/sj.leu.2400921.
- Lee, Benjamin H., Zuzana Tothova, Ross L. Levine, Kristina Anderson, Natalija Buza-Vidas, Dana E. Cullen, Elizabeth P. McDowell, et al. 2007. « FLT3 mutations confer enhanced proliferation and survival properties to multipotent progenitors in a murine model of chronic myelomonocytic leukemia ». *Cancer cell* 12(4): 367-80. doi:10.1016/j.ccr.2007.08.031.
- Lee, Lauren Y., Daniela Hernandez, Trivikram Rajkhowa, Samuel C. Smith, Jayant Ranganathan Raman, Bao Nguyen, Donald Small, et Mark Levis. 2017. « Preclinical studies of gilteritinib, a next-generation FLT3 inhibitor ». *Blood* 129(2): 257-60. doi:10.1182/blood-2016-10-745133.
- Levis, Mark J., Mehdi Hamadani, Brent Logan, Richard J. Jones, Anurag K. Singh, Mark Litzow, John R. Wingard, et al. 2024. « Gilteritinib as Post-Transplant Maintenance for Acute Myeloid Leukemia With Internal Tandem Duplication Mutation of FLT3 ». *Journal of Clinical Oncology: JCO*.23.02474. doi:10.1200/JCO.23.02474.
- Levis, Mark J., Alexander E. Perl, Jessica K. Altman, Christopher D. Gocke, Erkut Bahceci, Jason Hill, Chaofeng Liu, et al. 2018. « A next-generation sequencing-based assay for minimal residual disease assessment in AML patients with FLT3-ITD mutations ». *Blood Advances* 2(8): 825-31. doi:10.1182/bloodadvances.2018015925.
- Levis, Mark, Alexander Perl, Gary Schiller, Amir T. Fathi, Gail Roboz, Eunice S. Wang, Jessica Altman, et al. 2024. « A phase 1 study of the irreversible FLT3 inhibitor FF-10101 in relapsed or refractory acute myeloid leukemia ». *Blood Advances* 8(10): 2527-35. doi:10.1182/bloodadvances.2023010619.

- Ley, Timothy J., Li Ding, Matthew J. Walter, Michael D. McLellan, Tamara Lamprecht, David E. Larson, Cyriac Kandoth, et al. 2010. « DNMT3A Mutations in Acute Myeloid Leukemia ». *New England Journal of Medicine* 363(25): 2424-33. doi:10.1056/NEJMoa1005143.
- Li, Li, Emily Bailey, Sarah Greenblatt, David Huso, et Donald Small. 2011. « Loss of the Wild-Type Allele Contributes to Myeloid Expansion and Disease Aggressiveness in FLT3/ITD Knockin Mice ». *Blood* 118(18): 4935. doi:10.1182/blood-2011-01-328096.
- Li, Zhe, Xiaoqiang Cai, Chen-Leng Cai, Jiapeng Wang, Wenyong Zhang, Bruce E. Petersen, Feng-Chun Yang, et Mingjiang Xu. 2011. « Deletion of Tet2 in mice leads to dysregulated hematopoietic stem cells and subsequent development of myeloid malignancies ». *Blood* 118(17): 4509-18. doi:10.1182/blood-2010-12-325241.
- Linnet, Martha S., Rochelle E. Curtis, Sara J. Schonfeld, Jacqueline B. Vo, Lindsay M. Morton, et Graça M. Dores. 2024. « Survival of Adult AML Patients Treated with Chemotherapy in the U.S. Population by Age, Race and Ethnicity, Sex, Calendar-Year Period, and AML Subgroup, 2001–2019 ». *eClinicalMedicine* 71. doi:10.1016/j.eclinm.2024.102549.
- Linnet, Martha S., Ethel S. Gilbert, Roel Vermeulen, Graça M. Dores, Song-Nian Yin, Lutzen Portengen, Richard B. Hayes, et al. 2019. « Benzene Exposure Response and Risk of Myeloid Neoplasms in Chinese Workers: A Multicenter Case-Cohort Study ». *Journal of the National Cancer Institute* 111(5): 465-74. doi:10.1093/jnci/djy143.
- Lisovsky, M., S. E. Braun, Y. Ge, H. Takahira, L. Lu, V. G. Savchenko, S. D. Lyman, et H. E. Broxmeyer. 1996. « Flt3-Ligand Production by Human Bone Marrow Stromal Cells ». *Leukemia* 10(6): 1012-18.
- Lisovsky, M., Z. Estrov, X. Zhang, U. Consoli, G. Sanchez-Williams, V. Snell, R. Munker, et al. 1996. « Flt3 Ligand Stimulates Proliferation and Inhibits Apoptosis of Acute Myeloid Leukemia Cells: Regulation of Bcl-2 and Bax ». *Blood* 88(10): 3987-97.
- Llovet, Josep M., Sergio Ricci, Vincenzo Mazzaferro, Philip Hilgard, Edward Gane, Jean-Frédéric Blanc, Andre Cosme de Oliveira, et al. 2008. « Sorafenib in Advanced Hepatocellular Carcinoma ». *New England Journal of Medicine* 359(4): 378-90. doi:10.1056/NEJMoa0708857.
- Long, Jun, Ming-Yuan Jia, Wei-Yue Fang, Xin-Jie Chen, Li-Li Mu, Zhong-Yu Wang, Yan Shen, et al. 2020. « FLT3 inhibition upregulates HDAC8 via FOXO to inactivate p53 and promote maintenance of FLT3-ITD+ acute myeloid leukemia ». *Blood* 135(17): 1472-83. doi:10.1182/blood.2019003538.
- Loo, Sun, Richard Dillon, Adam Ivey, Natasha S. Anstee, Jad Othman, Ing Soo Tiong, Nicola Potter, et al. 2022. « Pretransplant FLT3-ITD MRD Assessed by High-Sensitivity PCR-NGS Determines Posttransplant Clinical Outcome ». *Blood* 140(22): 2407-11. doi:10.1182/blood.2022016567.
- Loo, Sun, Andrew W. Roberts, Natasha S. Anstee, Glen A. Kennedy, Simon He, Anthony P. Schwarzer, Anoop K. Enjeti, et al. 2023. « Sorafenib plus Intensive Chemotherapy in Newly Diagnosed FLT3-ITD AML: A Randomized, Placebo-Controlled Study by the ALLG ». *Blood* 142(23): 1960-71. doi:10.1182/blood.2023020301.
- Löwenberg, Bob. 2013. « Sense and nonsense of high-dose cytarabine for acute myeloid leukemia ». *Blood* 121(1): 26-28. doi:10.1182/blood-2012-07-444851.
- Lund, K., P. D. Adams, et M. Copland. 2014. « EZH2 in Normal and Malignant Hematopoiesis ». *Leukemia* 28(1): 44-49. doi:10.1038/leu.2013.288.
- Lv, Kaosheng, Jian-Gang Ren, Xu Han, Jun Gui, Chujie Gong, et Wei Tong. 2021. « Depalmitoylation Rewires FLT3-ITD Signaling and Exacerbates Leukemia Progression ». *Blood* 138(22): 2244-55. doi:10.1182/blood.2021011582.
- Lyman, Stewart D., Laura James, Lisabeth Johnson, Ken Brasel, Peter de Vries, Sabine S. Escobar, Heidi Downey, et al. 1994. « Cloning of the Human Homologue of the Murine flt3 Ligand: A Growth Factor for Early Hematopoietic Progenitor Cells ». *Blood* 83(10): 2795-2801. doi:10.1182/blood.V83.10.2795.2795.

- Ma, Jun, Shoujing Zhao, Xinan Qiao, Tristan Knight, Holly Edwards, Lisa Polin, Juiwanna Kushner, et al. 2019. « Inhibition of Bcl-2 Synergistically Enhances the Antileukemic Activity of Midostaurin and Gilteritinib in Preclinical Models of FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(22): 6815-26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0832.
- Ma, Xiaojun Max, et John Blenis. 2009. « Molecular Mechanisms of mTOR-Mediated Translational Control ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10(5): 307-18. doi:10.1038/nrm2672.
- Mackarehtschian, K., J. D. Hardin, K. A. Moore, S. Boast, S. P. Goff, et I. R. Lemischka. 1995. « Targeted Disruption of the Flk2/Flt3 Gene Leads to Deficiencies in Primitive Hematopoietic Progenitors ». *Immunity* 3(1): 147-61. doi:10.1016/1074-7613(95)90167-1.
- Maiti, Abhishek, Courtney D. DiNardo, Naval G. Daver, Caitlin R. Rausch, Farhad Ravandi, Tapan M. Kadia, Naveen Pemmaraju, et al. 2021. « Triplet Therapy with Venetoclax, FLT3 Inhibitor and Decitabine for FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia ». *Blood Cancer Journal* 11(2): 25. doi:10.1038/s41408-021-00410-w.
- Malani, Disha, Ashwini Kumar, Oscar Brück, Mika Kontro, Bhagwan Yadav, Monica Hellesøy, Heikki Kuusanmäki, et al. 2022. « Implementing a Functional Precision Medicine Tumor Board for Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Discovery* 12(2): 388. doi:10.1158/2159-8290.CD-21-0410.
- Man, Cheuk Him, Tsz Kan Fung, Christa Ho, Heron H. C. Han, Howard C. H. Chow, Alvin C. H. Ma, William W. L. Choi, et al. 2012. « Sorafenib Treatment of FLT3-ITD(+) Acute Myeloid Leukemia: Favorable Initial Outcome and Mechanisms of Subsequent Nonresponsiveness Associated with the Emergence of a D835 Mutation ». *Blood* 119(22): 5133-43. doi:10.1182/blood-2011-06-363960.
- Man, Cheuk Him, Stephen S. Y. Lam, Murphy K. H. Sun, Howard C. H. Chow, Harinder Gill, Yok Lam Kwong, et Anskar Y. H. Leung. 2014. « A Novel Tescalcin-Sodium/Hydrogen Exchange Axis Underlying Sorafenib Resistance in FLT3-ITD+ AML ». *Blood* 123(16): 2530-39. doi:10.1182/blood-2013-07-512194.
- Marchetto, S., E. Fournier, N. Beslu, T. Aurran-Schleinitz, P. Dubreuil, J. P. Borg, D. Birnbaum, et O. Rosnet. 1999. « SHC and SHIP Phosphorylation and Interaction in Response to Activation of the FLT3 Receptor ». *Leukemia* 13(9): 1374-82. doi:10.1038/sj.leu.2401527.
- Mason, Emily F., Robert P. Hasserjian, Nidhi Aggarwal, Adam C. Seegmiller, et Olga Pozdnyakova. 2019. « Blast Phenotype and Comutations in Acute Myeloid Leukemia with Mutated NPM1 Influence Disease Biology and Outcome ». *Blood Advances* 3(21): 3322-32. doi:10.1182/bloodadvances.2019000328.
- Massacci, Giorgia, Veronica Venafra, Sara Latini, Valeria Bica, Giusj Monia Pugliese, Simone Graziosi, Felix Klingelhuber, et al. 2023. « A Key Role of the WEE1-CDK1 Axis in Mediating TKI-Therapy Resistance in FLT3-ITD Positive Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Leukemia* 37(2): 288-97. doi:10.1038/s41375-022-01785-w.
- Mathew, Nimitha R., Francis Baumgartner, Lukas Braun, David O'Sullivan, Simone Thomas, Miguel Waterhouse, Tony A. Müller, et al. 2018. « Sorafenib Promotes Graft-versus-Leukemia Activity in Mice and Humans through IL-15 Production in FLT3-ITD-Mutant Leukemia Cells ». *Nature Medicine* 24(3): 282-91. doi:10.1038/nm.4484.
- Mazumdar, Claire, Ying Shen, Seethu Xavy, Feifei Zhao, Andreas Reinisch, Rui Li, M. Ryan Corces, et al. 2015. « Leukemia-Associated Cohesin Mutants Dominantly Enforce Stem Cell Programs and Impair Human Hematopoietic Progenitor Differentiation ». *Cell Stem Cell* 17(6): 675-88. doi:10.1016/j.stem.2015.09.017.
- McClanahan, T., J. Culpepper, D. Campbell, J. Wagner, K. Franz-Bacon, J. Mattson, S. Tsai, et al. 1996. « Biochemical and Genetic Characterization of Multiple Splice Variants of the Flt3 Ligand ». *Blood* 88(9): 3371-82.
- McKenna, H. J., K. L. Stocking, R. E. Miller, K. Brasel, T. De Smedt, E. Maraskovsky, C. R. Maliszewski, et al. 2000. « Mice Lacking Flt3 Ligand Have Deficient Hematopoiesis Affecting Hematopoietic Progenitor Cells, Dendritic Cells, and Natural Killer Cells ». *Blood* 95(11): 3489-97.

- McMahon, Christine M., Jonathan Canaani, Bryan Rea, Rachel L. Sargent, Julianne N. Qualtieri, Christopher D. Watt, Jennifer J. D. Morrisette, Martin Carroll, et Alexander E. Perl. 2019. « Gilteritinib induces differentiation in relapsed and refractory FLT3-mutated acute myeloid leukemia ». *Blood Advances* 3(10): 1581-85. doi:10.1182/bloodadvances.2018029496.
- McMahon, Christine M., Timothy Ferng, Jonathan Canaani, Eunice S. Wang, Jennifer J. D. Morrisette, Dennis J. Eastburn, Maurizio Pellegrino, et al. 2019. « Clonal Selection with RAS Pathway Activation Mediates Secondary Clinical Resistance to Selective FLT3 Inhibition in Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Discovery* 9(8): 1050-63. doi:10.1158/2159-8290.CD-18-1453.
- Meshinchi, Soheil, Todd A. Alonzo, Derek L. Stirewalt, Michel Zwaan, Martin Zimmerman, Dirk Reinhardt, Gertjan J. L. Kaspers, et al. 2006. « Clinical implications of FLT3 mutations in pediatric AML ». *Blood* 108(12): 3654-61. doi:10.1182/blood-2006-03-009233.
- Meshinchi, Soheil, Derek L. Stirewalt, Todd A. Alonzo, Titus J. Boggon, Robert B. Gerbing, Jennifer L. Rocnik, Beverly J. Lange, D. Gary Gilliland, et Jerald P. Radich. 2008. « Structural and Numerical Variation of FLT3/ITD in Pediatric AML ». *Blood* 111(10): 4930-33. doi:10.1182/blood-2008-01-117770.
- Metzeler, Klaus H., Tobias Herold, Maja Rothenberg-Thurley, Susanne Amler, Maria C. Sauerland, Dennis Görlich, Stephanie Schneider, et al. 2016. « Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia ». *Blood* 128(5): 686-98. doi:10.1182/blood-2016-01-693879.
- Mitchell, Emily, Michael Spencer Chapman, Nicholas Williams, Kevin J. Dawson, Nicole Mende, Emily F. Calderbank, Hyunchul Jung, et al. 2022. « Clonal Dynamics of Haematopoiesis across the Human Lifespan ». *Nature* 606(7913): 343-50. doi:10.1038/s41586-022-04786-y.
- Mizuki, M., R. Fenski, H. Halfter, I. Matsumura, R. Schmidt, C. Müller, W. Grüning, et al. 2000. « Flt3 Mutations from Patients with Acute Myeloid Leukemia Induce Transformation of 32D Cells Mediated by the Ras and STAT5 Pathways ». *Blood* 96(12): 3907-14.
- Montesinos, Pau, Christian Recher, Susana Vives, Ewa Zarzycka, Jianxiang Wang, Giambattista Bertani, Michael Heuser, et al. 2022. « Ivosidenib and Azacitidine in IDH1-Mutated Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 386(16): 1519-31. doi:10.1056/NEJMoa2117344.
- Mori, Masamichi, Naoki Kaneko, Yoko Ueno, Masaki Yamada, Ruriko Tanaka, Rika Saito, Itsuro Shimada, Kenichi Mori, et Sadao Kuromitsu. 2017. « Gilteritinib, a FLT3/AXL inhibitor, shows antileukemic activity in mouse models of FLT3 mutated acute myeloid leukemia ». *Investigational New Drugs* 35(5): 556-65. doi:10.1007/s10637-017-0470-z.
- Morita, Kiyomi, Feng Wang, Katharina Jahn, Tianyuan Hu, Tomoyuki Tanaka, Yuya Sasaki, Jack Kuipers, et al. 2020. « Clonal Evolution of Acute Myeloid Leukemia Revealed by High-Throughput Single-Cell Genomics ». *Nature Communications* 11(1): 5327. doi:10.1038/s41467-020-19119-8.
- Morton, Lindsay M., Graça M. Dores, Sara J. Schonfeld, Martha S. Linet, Byron S. Sigel, Clara J. K. Lam, Margaret A. Tucker, et Rochelle E. Curtis. 2019. « Association of Chemotherapy for Solid Tumors With Development of Therapy-Related Myelodysplastic Syndrome or Acute Myeloid Leukemia in the Modern Era ». *JAMA oncology* 5(3): 318-25. doi:10.1001/jamaoncol.2018.5625.
- Mulloy, James C., Jörg Cammenga, Karen L. MacKenzie, Francisco J. Berguido, Malcolm A. S. Moore, et Stephen D. Nimer. 2002. « The AML1-ETO Fusion Protein Promotes the Expansion of Human Hematopoietic Stem Cells ». *Blood* 99(1): 15-23. doi:10.1182/blood.V99.1.15.
- Murphy, Kathleen M., Mark Levis, Michael J. Hafez, Tanya Geiger, Lisa C. Cooper, B. Douglas Smith, Donald Small, et Karin D. Berg. 2003. « Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication and D835 Mutations by a Multiplex Polymerase Chain Reaction and Capillary Electrophoresis Assay ». *The Journal of molecular diagnostics : JMD* 5(2): 96-102.
- Nakao, M., S. Yokota, T. Iwai, H. Kaneko, S. Horiike, K. Kashima, Y. Sonoda, T. Fujimoto, et S. Misawa. 1996. « Internal Tandem Duplication of the Flt3 Gene Found in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 10(12): 1911-18.

- Numan, Yazan, Zaid Abdel Rahman, Justin Grenet, Stephanie Boisclair, Jan Philipp Bewersdorf, Cailin Collins, Dylan Barth, et al. 2022. « Gilteritinib Clinical Activity in Relapsed/Refractory FLT3 Mutated Acute Myeloid Leukemia Previously Treated with FLT3 Inhibitors ». *American Journal of Hematology* 97(3): 322-28. doi:10.1002/ajh.26447.
- Oosterwijk, Jolieke G. van, Daelynn R. Buelow, Christina D. Drenberg, Aksana Vasilyeva, Lie Li, Lei Shi, Yong-Dong Wang, et al. 2018. « Hypoxia-Induced Upregulation of BMX Kinase Mediates Therapeutic Resistance in Acute Myeloid Leukemia ». *The Journal of Clinical Investigation* 128(1): 369-80. doi:10.1172/JCI91893.
- Ottone, Tiziana, Serena Zaza, Mariadomenica Divona, Syed Khizer Hasan, Serena Lavorgna, Serena Laterza, Laura Cicconi, et al. 2013. « Identification of Emerging FLT3 ITD-Positive Clones during Clinical Remission and Kinetics of Disease Relapse in Acute Myeloid Leukaemia with Mutated Nucleophosmin ». *British Journal of Haematology* 161(4): 533-40. doi:10.1111/bjh.12288.
- Papaemmanuil, Elli, Moritz Gerstung, Lars Bullinger, Verena I. Gaidzik, Peter Paschka, Nicola D. Roberts, Nicola E. Potter, et al. 2016. « Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 374(23): 2209-21. doi:10.1056/NEJMoa1516192.
- Park, I.-K., B. Mundy-Bosse, S. P. Whitman, X. Zhang, S. L. Warner, D. J. Bearss, W. Blum, G. Marcucci, et M. A. Caligiuri. 2015. « Receptor Tyrosine Kinase Axl Is Required for Resistance of Leukemic Cells to FLT3-Targeted Therapy in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 29(12): 2382-89. doi:10.1038/leu.2015.147.
- Patel, Jay P., Mithat Gönen, Maria E. Figueroa, Hugo Fernandez, Zhuoxin Sun, Janis Racevskis, Pieter Van Vlierberghe, et al. 2012. « Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia ». *The New England Journal of Medicine* 366(12): 1079-89. doi:10.1056/NEJMoa1112304.
- Perl, Alexander E., Naoko Hosono, Pau Montesinos, Nikolai Podoltsev, Giovanni Martinelli, Nicki Panoskaltis, Christian Recher, et al. 2022. « Clinical outcomes in patients with relapsed/refractory FLT3-mutated acute myeloid leukemia treated with gilteritinib who received prior midostaurin or sorafenib ». *Blood Cancer Journal* 12(5): 84. doi:10.1038/s41408-022-00677-7.
- Perl, Alexander E., Giovanni Martinelli, Jorge E. Cortes, Andreas Neubauer, Ellin Berman, Stefania Paolini, Pau Montesinos, et al. 2019. « Gilteritinib or Chemotherapy for Relapsed or Refractory FLT3 - Mutated AML ». *New England Journal of Medicine* 381(18): 1728-40. doi:10.1056/NEJMoa1902688.
- Pikman, Yana, Sarah K. Tasian, Maria Luisa Sulis, Kristen Stevenson, Traci M. Blonquist, Beth Apse Winger, Todd M. Cooper, et al. 2021. « Matched Targeted Therapy for Pediatric Patients with Relapsed, Refractory or High-risk Leukemias: A Report from the LEAP Consortium ». *Cancer discovery* 11(6): 1424-39. doi:10.1158/2159-8290.CD-20-0564.
- Ponziani, V., G. Gianfaldoni, F. Mannelli, F. Leoni, S. Ciolli, P. Guglielmelli, E. Antonioli, et al. 2006. « The Size of Duplication Does Not Add to the Prognostic Significance of FLT3 Internal Tandem Duplication in Acute Myeloid Leukemia Patients ». *Leukemia* 20(11): 2074-76. doi:10.1038/sj.leu.2404368.
- Pratcorona, Marta, Salut Brunet, Josep Nomdedéu, Josep Maria Ribera, Mar Tormo, Rafael Duarte, Lourdes Escoda, et al. 2013. « Favorable Outcome of Patients with Acute Myeloid Leukemia Harboring a Low-Allelic Burden FLT3-ITD Mutation and Concomitant NPM1 Mutation: Relevance to Post-Remission Therapy ». *Blood* 121(14): 2734-38. doi:10.1182/blood-2012-06-431122.
- Pugliese, Giusj Monia, Veronica Venafrà, Valeria Bica, Giorgia Massacci, Sara Latini, Simone Graziosi, Thomas Fischer, et al. 2023. « Impact of FLT3-ITD Location on Cytarabine Sensitivity in AML: A Network-Based Approach ». *Leukemia* 37(5): 1151-55. doi:10.1038/s41375-023-01881-5.
- Puissant, Alexandre, Nina Fenouille, Gabriela Alexe, Yana Pikman, Christopher F. Bassil, Swapnil Mehta, Jinyan Du, et al. 2014. « SYK Is a Critical Regulator of FLT3 in Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Cell* 25(2): 226-42. doi:10.1016/j.ccr.2014.01.022.
- Raghavan, Manoj, Lan-Lan Smith, Debra M. Lillington, Tracy Chaplin, Ioannis Kakkas, Gael Molloy, Claude Chelala, et al. 2008. « Segmental uniparental disomy is a commonly acquired genetic event in relapsed acute myeloid leukemia ». *Blood* 112(3): 814-21. doi:10.1182/blood-2008-01-132431.

- Rampal, R., et M. E. Figueroa. 2016. « Wilms Tumor 1 Mutations in the Pathogenesis of Acute Myeloid Leukemia ». *Haematologica* 101(6): 672-79. doi:10.3324/haematol.2015.141796.
- Ravandi, Farhad, Mona Lisa Alattar, Michael R. Grunwald, Michelle A. Rudek, Trivikram Rajkhowa, Mary Ann Richie, Sherry Pierce, et al. 2013. « Phase 2 Study of Azacytidine plus Sorafenib in Patients with Acute Myeloid Leukemia and FLT-3 Internal Tandem Duplication Mutation ». *Blood* 121(23): 4655-62. doi:10.1182/blood-2013-01-480228.
- Reindl, Carola, Ksenia Bagrintseva, Sridhar Vempati, Susanne Schnittger, Joachim W. Ellwart, Katja Wenig, Karl-Peter Hopfner, Wolfgang Hiddemann, et Karsten Spiekermann. 2006. « Point mutations in the juxtamembrane domain of FLT3 define a new class of activating mutations in AML ». *Blood* 107(9): 3700-3707. doi:10.1182/blood-2005-06-2596.
- Roloff, Gregory W., Frank Wen, Aubrianna Ramsland, Andrew S. Artz, Satyajit Kosuri, Wendy Stock, Olatoyosi Odenike, et al. 2023. « Clinical and molecular response of acute myeloid leukemia harboring non-canonical FLT3 N676K driver mutations to contemporary FLT3 inhibitors ». *Haematologica* 108(8): 2234-39. doi:10.3324/haematol.2022.282148.
- Rosnet, O., H. J. Bühring, S. Marchetto, I. Rappold, C. Lavagna, D. Sainty, C. Arnoulet, et al. 1996. « Human FLT3/FLK2 Receptor Tyrosine Kinase Is Expressed at the Surface of Normal and Malignant Hematopoietic Cells ». *Leukemia* 10(2): 238-48.
- Rücker, Frank G., Lars Bullinger, Sibylle Cocciardi, Sabrina Skambraks, Tamara J. Luck, Daniela Weber, Julia Krzykalla, et al. 2024. « Measurable Residual Disease Monitoring in AML With FLT3-ITD Treated With Intensive Chemotherapy Plus Midostaurin ». *Blood Advances*: bloodadvances.2024013758. doi:10.1182/bloodadvances.2024013758.
- Rücker, Frank G., Ling Du, Tamara J. Luck, Axel Benner, Julia Krzykalla, Insa Gathmann, Maria Teresa Voso, et al. 2022. « Molecular Landscape and Prognostic Impact of FLT3-ITD Insertion Site in Acute Myeloid Leukemia: RATIFY Study Results ». *Leukemia* 36(1): 90-99. doi:10.1038/s41375-021-01323-0.
- Rustagi, Navin, Oliver A. Hampton, Jie Li, Liu Xi, Richard A. Gibbs, Sharon E. Plon, Marek Kimmel, et David A. Wheeler. 2016. « ITD Assembler: An Algorithm for Internal Tandem Duplication Discovery from Short-Read Sequencing Data ». *BMC bioinformatics* 17: 188. doi:10.1186/s12859-016-1031-8.
- Rusten, L. S., S. D. Lyman, O. P. Veiby, et S. E. Jacobsen. 1996. « The FLT3 Ligand Is a Direct and Potent Stimulator of the Growth of Primitive and Committed Human CD34+ Bone Marrow Progenitor Cells in Vitro ». *Blood* 87(4): 1317-25.
- Sahtoe, Danny D., Willem J. van Dijk, Reggy Ekkebus, Huib Ovaa, et Titia K. Sixma. 2016. « BAP1/ASXL1 Recruitment and Activation for H2A Deubiquitination ». *Nature Communications* 7: 10292. doi:10.1038/ncomms10292.
- Sakaguchi, Masahiro, Nana Nakajima, Hiroki Yamaguchi, Yuho Najima, Katsuhiko Shono, Atsushi Marumo, Ikuko Omori, et al. 2020. « The sensitivity of the FLT3-ITD detection method is an important consideration when diagnosing acute myeloid leukemia ». *Leukemia Research Reports* 13: 100198. doi:10.1016/j.lrr.2020.100198.
- Sanz, Miguel A., Pierre Fenaux, Martin S. Tallman, Elihu H. Estey, Bob Löwenberg, Tomoki Naoe, Eva Lengfelder, et al. 2019. « Management of acute promyelocytic leukemia: updated recommendations from an expert panel of the European LeukemiaNet ». *Blood* 133(15): 1630-43. doi:10.1182/blood-2019-01-894980.
- Sargas, Claudia, Rosa Ayala, María J. Larráyoz, María C. Chillón, Eduardo Rodríguez-Arboli, Cristina Bilbao, Esther Prados de la Torre, et al. 2023. « Comparison of the 2022 and 2017 European LeukemiaNet Risk Classifications in a Real-Life Cohort of the PETHEMA Group ». *Blood Cancer Journal* 13(1): 1-7. doi:10.1038/s41408-023-00835-5.
- Sato, Takashi, Xiaochuan Yang, Steven Knapper, Paul White, B. Douglas Smith, Steven Galkin, Donald Small, Alan Burnett, et Mark Levis. 2011. « FLT3 Ligand Impedes the Efficacy of FLT3 Inhibitors in Vitro and in Vivo ». *Blood* 117(12): 3286-93. doi:10.1182/blood-2010-01-266742.

- Schlenk, R. F., P. Frech, D. Weber, P. Brossart, H.-A. Horst, D. Kraemer, G. Held, et al. 2017. « Impact of Pretreatment Characteristics and Salvage Strategy on Outcome in Patients with Relapsed Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 31(5): 1217-20. doi:10.1038/leu.2017.22.
- Schlenk, Richard F., Sabine Kayser, Lars Bullinger, Guido Kobbe, Jochen Casper, Mark Ringhoffer, Gerhard Held, et al. 2014. « Differential Impact of Allelic Ratio and Insertion Site in FLT3-ITD-Positive AML with Respect to Allogeneic Transplantation ». *Blood* 124(23): 3441-49. doi:10.1182/blood-2014-05-578070.
- Schmalbrock, Laura K., Anna Dolnik, Sibylle Cocciardi, Eric Sträng, Frauke Theis, Nikolaus Jahn, Ekaterina Panina, et al. 2021. « Clonal evolution of acute myeloid leukemia with FLT3-ITD mutation under treatment with midostaurin ». *Blood* 137(22): 3093-3104. doi:10.1182/blood.2020007626.
- Schmidt-Arras, Dirk, Sylvia-Annette Böhmer, Sina Koch, Jörg P. Müller, Lutz Blei, Hauke Cornils, Reinhard Bauer, et al. 2009. « Anchoring of FLT3 in the Endoplasmic Reticulum Alters Signaling Quality ». *Blood* 113(15): 3568-76. doi:10.1182/blood-2007-10-121426.
- Schnittger, S., U. Bacher, W. Kern, T. Alpermann, C. Haferlach, et T. Haferlach. 2011. « Prognostic Impact of FLT3-ITD Load in NPM1 Mutated Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 25(8): 1297-1304. doi:10.1038/leu.2011.97.
- Schnittger, Susanne, Claudia Schoch, Martin Dugas, Wolfgang Kern, Peter Staib, Christian Wuchter, Helmut Löffler, et al. 2002. « Analysis of FLT3 length mutations in 1003 patients with acute myeloid leukemia: correlation to cytogenetics, FAB subtype, and prognosis in the AMLCG study and usefulness as a marker for the detection of minimal residual disease: Presented in part at the 42nd annual meeting of the American Society of Hematology, December 1-5, 2000, San Francisco, CA (abstract 3569). » *Blood* 100(1): 59-66. doi:10.1182/blood.V100.1.59.
- Schranz, Katrin, Max Hubmann, Egor Harin, Sebastian Vosberg, Tobias Herold, Klaus H. Metzeler, Maja Rothenberg-Thurley, et al. 2018. « Clonal Heterogeneity of FLT3-ITD Detected by High-Throughput Amplicon Sequencing Correlates with Adverse Prognosis in Acute Myeloid Leukemia ». *Oncotarget* 9(53): 30128-45. doi:10.18632/oncotarget.25729.
- Schwartz, Jason R., Jing Ma, Jennifer Kamens, Tamara Westover, Michael P. Walsh, Samuel W. Brady, J. Robert Michael, et al. 2021. « The Acquisition of Molecular Drivers in Pediatric Therapy-Related Myeloid Neoplasms ». *Nature Communications* 12(1): 985. doi:10.1038/s41467-021-21255-8.
- Seipel, Katja, Miguel A.T. Marques, Corinne Sidler, Beatrice U. Mueller, et Thomas Pabst. 2018. « MDM2- and FLT3-inhibitors in the treatment of FLT3-ITD acute myeloid leukemia, specificity and efficacy of NVP-HDM201 and midostaurin ». *Haematologica* 103(11): 1862-72. doi:10.3324/haematol.2018.191650.
- Sexauer, Amy, Alexander Perl, Xiaochuan Yang, Michael Borowitz, Christopher Gocke, Trivikram Rajkhowa, Christian Thiede, et al. 2012. « Terminal Myeloid Differentiation in Vivo Is Induced by FLT3 Inhibition in FLT3/ITD AML ». *Blood* 120(20): 4205-14. doi:10.1182/blood-2012-01-402545.
- Shallis, Rory M., Julian J. Weiss, Nicole C. Deziel, et Steven D. Gore. 2021. « Challenging the concept of *de novo* acute myeloid leukemia: Environmental and occupational leukemogens hiding in our midst ». *Blood Reviews* 47: 100760. doi:10.1016/j.blre.2020.100760.
- Shih, Lee-Yung, Chein-Fuang Huang, Jin-Hou Wu, Tung-Liang Lin, Po Dunn, Po-Nan Wang, Ming-Chung Kuo, Chang-Liang Lai, et Hui-Chin Hsu. 2002. « Internal tandem duplication of FLT3 in relapsed acute myeloid leukemia: a comparative analysis of bone marrow samples from 108 adult patients at diagnosis and relapse ». *Blood* 100(7): 2387-92. doi:10.1182/blood-2002-01-0195.
- Short, Nicholas J., Naval Daver, Courtney D. Dinardo, Tapan Kadia, Lewis F. Nasr, Walid Macaron, Musa Yilmaz, et al. 2024. « Azacitidine, Venetoclax, and Gilteritinib in Newly Diagnosed and Relapsed or Refractory FLT3-Mutated AML ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 42(13): 1499-1508. doi:10.1200/JCO.23.01911.
- Singh Mali, Raghuv eer, Qi Zhang, Rosa Anna DeFilippis, Antonio Cavazos, Vinitha Mary Kuruvilla, Jayant Raman, Vidhi Mody, et al. 2021. « Venetoclax Combines Synergistically with FLT3 Inhibition to Effectively Target Leukemic Cells in FLT3-ITD+ Acute Myeloid Leukemia Models ». *Haematologica* 106(4): 1034-46. doi:10.3324/haematol.2019.244020.

- Sipkins, Dorothy A., Xunbin Wei, Juwelle W. Wu, Judith M. Runnels, Daniel Côté, Terry K. Means, Andrew D. Luster, David T. Scadden, et Charles P. Lin. 2005. « In Vivo Imaging of Specialized Bone Marrow Endothelial Microdomains for Tumour Engraftment ». *Nature* 435(7044): 969-73. doi:10.1038/nature03703.
- Smith, C. C., K. Lin, A. Stecula, A. Sali, et N. P. Shah. 2015. « FLT3 D835 Mutations Confer Differential Resistance to Type II FLT3 Inhibitors ». *Leukemia* 29(12): 2390-92. doi:10.1038/leu.2015.165.
- Smith, Catherine C., Mark J. Levis, Alexander E. Perl, Jason E. Hill, Matt Rosales, et Erkut Bahceci. 2022. « Molecular Profile of FLT3-Mutated Relapsed/Refractory Patients with AML in the Phase 3 ADMIRAL Study of Gilteritinib ». *Blood Advances* 6(7): 2144-55. doi:10.1182/bloodadvances.2021006489.
- Smith, Catherine C., Amy Paguirigan, Grace R. Jeschke, Kimberly C. Lin, Evan Massi, Theodore Tarver, Chen-Shan Chin, et al. 2017. « Heterogeneous Resistance to Quizartinib in Acute Myeloid Leukemia Revealed by Single-Cell Analysis ». *Blood* 130(1): 48-58. doi:10.1182/blood-2016-04-711820.
- Smith, Catherine C., Qi Wang, Chen-Shan Chin, Sara Salerno, Lauren E. Damon, Mark J. Levis, Alexander E. Perl, et al. 2012. « Validation of ITD Mutations in FLT3 as a Therapeutic Target in Human Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature* 485(7397): 260-63. doi:10.1038/nature11016.
- Smith, Catherine C., Chao Zhang, Kimberly C. Lin, Elisabeth A. Lasater, Ying Zhang, Evan Massi, Lauren E. Damon, et al. 2015. « Characterizing and Overriding the Structural Mechanism of the Quizartinib-Resistant FLT3 "Gatekeeper" F691L Mutation with PLX3397 ». *Cancer Discovery* 5(6): 668-79. doi:10.1158/2159-8290.CD-15-0060.
- Smith, Matthew L., Rachael Arch, Lan-Lan Smith, Nigel Bainton, Michael Neat, Claire Taylor, Dominique Bonnet, et al. 2005. « Development of a Human Acute Myeloid Leukaemia Screening Panel and Consequent Identification of Novel Gene Mutation in FLT3 and CCND3 ». *British Journal of Haematology* 128(3): 318-23. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.05324.x.
- Sood, Raman, Yasuhiko Kamikubo, et Paul Liu. 2017. « Role of RUNX1 in hematological malignancies ». *Blood* 129(15): 2070-82. doi:10.1182/blood-2016-10-687830.
- Spencer, David H., Haley J. Abel, Christina M. Lockwood, Jacqueline E. Payton, Philippe Szankasi, Todd W. Kelley, Shashikant Kulkarni, John D. Pfeifer, et Eric J. Duncavage. 2013. « Detection of FLT3 Internal Tandem Duplication in Targeted, Short-Read-Length, next-Generation Sequencing Data ». *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 15(1): 81-93. doi:10.1016/j.jmoldx.2012.08.001.
- Spiekermann, Karsten, Ksenia Bagrintseva, Claudia Schoch, Torsten Haferlach, Wolfgang Hiddemann, et Susanne Schnittger. 2002. « A new and recurrent activating length mutation in exon 20 of the FLT3 gene in acute myeloid leukemia ». *Blood* 100(9): 3423-25. doi:10.1182/blood-2002-03-0953.
- Spinner, Michael A., Alexey Aleshin, Marianne T. Santaguida, Steven A. Schaffert, James L. Zehnder, A. Scott Patterson, Christos Gekas, Diane Heiser, et Peter L. Greenberg. 2020. « Ex Vivo Drug Screening Defines Novel Drug Sensitivity Patterns for Informing Personalized Therapy in Myeloid Neoplasms ». *Blood Advances* 4(12): 2768-78. doi:10.1182/bloodadvances.2020001934.
- Stein, Eytan M., Courtney D. DiNardo, Daniel A. Pollyea, Amir T. Fathi, Gail J. Roboz, Jessica K. Altman, Richard M. Stone, et al. 2017. « Enasidenib in Mutant IDH2 Relapsed or Refractory Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 130(6): 722-31. doi:10.1182/blood-2017-04-779405.
- Stirewalt, D L, E L Pogossova-Agadjanian, K Tsuchiya, J Joaquin, et S Meshinchi. 2014. « Copy-Neutral Loss of Heterozygosity Is Prevalent and a Late Event in the Pathogenesis of FLT3/ITD AML ». *Blood Cancer Journal* 4(5): e208-e208. doi:10.1038/bcj.2014.27.
- Stirewalt, Derek L., Kenneth J. Kopecky, Soheil Meshinchi, Julia H. Engel, Era L. Pogossova-Agadjanian, Jeremy Linsley, Marilyn L. Slovak, Cheryl L. Willman, et Jerald P. Radich. 2006. « Size of FLT3 Internal Tandem Duplication Has Prognostic Significance in Patients with Acute Myeloid Leukemia ». *Blood* 107(9): 3724-26. doi:10.1182/blood-2005-08-3453.

- Stirewalt, Derek L., Soheil Meshinchi, Steven J. Kussick, Kayla M. Sheets, Era Pogossova-Agadjanyan, Cheryl L. Willman, et Jerald P. Radich. 2004. « Novel FLT3 Point Mutations within Exon 14 Found in Patients with Acute Myeloid Leukaemia ». *British Journal of Haematology* 124(4): 481-84. doi:10.1111/j.1365-2141.2004.04808.x.
- Stirewalt, Derek L., et Jerald P. Radich. 2003. « The Role of FLT3 in Haematopoietic Malignancies ». *Nature Reviews. Cancer* 3(9): 650-65. doi:10.1038/nrc1169.
- Stone, Richard M., Daniel J. DeAngelo, Virginia Klimek, Ilene Galinsky, Eli Estey, Stephen D. Nimer, Wilson Grandin, et al. 2005. « Patients with Acute Myeloid Leukemia and an Activating Mutation in FLT3 Respond to a Small-Molecule FLT3 Tyrosine Kinase Inhibitor, PKC412 ». *Blood* 105(1): 54-60. doi:10.1182/blood-2004-03-0891.
- Stone, Richard M., Sumithra J. Mandrekar, Ben L. Sanford, Kristina Laumann, Susan Geyer, Clara D. Bloomfield, Christian Thiede, et al. 2017. « Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation ». *New England Journal of Medicine* 377(5): 454-64. doi:10.1056/NEJMoa1614359.
- Sung, Pamela J., Murugan Selvam, Simone S. Riedel, Hongbo M. Xie, Katie Bryant, Bryan Manning, Gerald B. Wertheim, et al. 2024. « FLT3 Tyrosine Kinase Inhibition Modulates PRC2 and Promotes Differentiation in Acute Myeloid Leukemia ». *Leukemia* 38(2): 291-301. doi:10.1038/s41375-023-02131-4.
- Surveillance, Epidemiology, and End Results Program. 2024. « Acute Myeloid Leukemia - Cancer Stat Facts ». *SEER*. <https://seer.cancer.gov/statfacts/html/amyl.html> (12 septembre 2024).
- Tang, Guilin, Wayne Tam, Nicholas J. Short, Prithviraj Bose, David Wu, Stephanie N. Hurwitz, Adam Bagg, et al. 2021. « Myeloid/Lymphoid Neoplasms with FLT3 Rearrangement ». *Modern Pathology* 34(9): 1673-85. doi:10.1038/s41379-021-00817-7.
- Thavasu, P., D. Propper, A. McDonald, N. Dobbs, T. Ganesan, D. Talbot, J. Braybrook, et al. 1999. « The Protein Kinase C Inhibitor CGP41251 Suppresses Cytokine Release and Extracellular Signal-Regulated Kinase 2 Expression in Cancer Patients ». *Cancer Research* 59(16): 3980-84.
- Thiede, Christian, Thomas Prior, Serena Lavorgna, Jürgen Krauter, Eva Barragán, Josep Nomdedeu, Joop Jansen, et al. 2018. « FLT3mutation Assay Laboratory Cross Validation: Results from the CALGB 10603/Ratify Trial in Patients with Newly Diagnosed FLT3-Mutated Acute Myeloid Leukemia (AML) ». *Blood* 132: 2800-2800. doi:10.1182/blood-2018-99-112127.
- Thiede, Christian, Christine Steudel, Brigitte Mohr, Markus Schaich, Ulrike Schäkel, Uwe Platzbecker, Martin Wermke, et al. 2002. « Analysis of FLT3-Activating Mutations in 979 Patients with Acute Myelogenous Leukemia: Association with FAB Subtypes and Identification of Subgroups with Poor Prognosis ». *Blood* 99(12): 4326-35. doi:10.1182/blood.v99.12.4326.
- Traer, Elie, Jacqueline Martinez, Nathalie Javidi-Sharifi, Anupriya Agarwal, Jennifer Dunlap, Isabel English, Tibor Kovacsovics, et al. 2016. « FGF2 from Marrow Microenvironment Promotes Resistance to FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Research* 76(22): 6471-82. doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-3569.
- Tsai, Harrison K., Diane G. Brackett, David Szeto, Ryan Frazier, Allison MacLeay, Phani Davineni, Danielle K. Manning, et al. 2020. « Targeted Informatics for Optimal Detection, Characterization, and Quantification of FLT3 Internal Tandem Duplications Across Multiple Next-Generation Sequencing Platforms ». *The Journal of molecular diagnostics: JMD* 22(9): 1162-78. doi:10.1016/j.jmoldx.2020.06.006.
- Turner, A. M., N. L. Lin, S. Issarachai, S. D. Lyman, et V. C. Broudy. 1996. « FLT3 Receptor Expression on the Surface of Normal and Malignant Human Hematopoietic Cells ». *Blood* 88(9): 3383-90.
- Tyner, Jeffrey W., Cristina E. Tognon, Daniel Bottomly, Beth Wilmot, Stephen E. Kurtz, Samantha L. Savage, Nicola Long, et al. 2018. « Functional Genomic Landscape of Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature* 562(7728): 526-31. doi:10.1038/s41586-018-0623-z.

- Vempati, Sridhar, Carola Reindl, Seshu Kumar Kaza, Ruth Kern, Theodora Malamoussi, Martin Dugas, Gudrun Mellert, et al. 2007. « Arginine 595 is duplicated in patients with acute leukemias carrying internal tandem duplications of FLT3 and modulates its transforming potential ». *Blood* 110(2): 686-94. doi:10.1182/blood-2006-10-053181.
- Voso, Maria Teresa, Giulia Falconi, et Emiliano Fabiani. 2021. « What's new in the pathogenesis and treatment of therapy-related myeloid neoplasms ». *Blood* 138(9): 749-57. doi:10.1182/blood.2021010764.
- Walker, Christopher J., Jessica Kohlschmidt, Ann-Kathrin Eisfeld, Krzysztof Mrózek, Sandya Liyanarachchi, Chi Song, Deedra Nicolet, et al. 2019. « Genetic Characterization and Prognostic Relevance of Acquired Uniparental Disomies in Cytogenetically Normal Acute Myeloid Leukemia ». *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 25(21): 6524-31. doi:10.1158/1078-0432.CCR-19-0725.
- Wang, Eunice S., Aaron D. Goldberg, Martin Tallman, Roland B. Walter, Chatchada Karanes, Karamjeet Sandhu, Carlos E. Vigil, et al. 2024. « Crenolanib and Intensive Chemotherapy in Adults With Newly Diagnosed FLT3-Mutated AML ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 42(15): 1776-87. doi:10.1200/JCO.23.01061.
- Wang, Hanlin, Guanghao Luo, Xiaobei Hu, Gaoya Xu, Tao Wang, Minmin Liu, Xiaohui Qiu, et al. 2023. « Targeting C/EBP α Overcomes Primary Resistance and Improves the Efficacy of FLT3 Inhibitors in Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature Communications* 14(1): 1882. doi:10.1038/s41467-023-37381-4.
- Wang, Ting-You, et Rendong Yang. 2020. « ScanITD: Detecting Internal Tandem Duplication with Robust Variant Allele Frequency Estimation ». *GigaScience* 9(8): g1aa089. doi:10.1093/gigascience/g1aa089.
- Wattad, M., D. Weber, K. Döhner, J. Krauter, V. I. Gaidzik, P. Paschka, M. Heuser, et al. 2017. « Impact of Salvage Regimens on Response and Overall Survival in Acute Myeloid Leukemia with Induction Failure ». *Leukemia* 31(6): 1306-13. doi:10.1038/leu.2017.23.
- Welch, John S., Timothy J. Ley, Daniel C. Link, Christopher A. Miller, David E. Larson, Daniel C. Koboldt, Lukas D. Wartman, et al. 2012. « The Origin and Evolution of Mutations in Acute Myeloid Leukemia ». *Cell* 150(2): 264-78. doi:10.1016/j.cell.2012.06.023.
- Wilhelm, Scott M., Christopher Carter, Liya Tang, Dean Wilkie, Angela McNabola, Hong Rong, Charles Chen, et al. 2004. « BAY 43-9006 Exhibits Broad Spectrum Oral Antitumor Activity and Targets the RAF/MEK/ERK Pathway and Receptor Tyrosine Kinases Involved in Tumor Progression and Angiogenesis ». *Cancer Research* 64(19): 7099-7109. doi:10.1158/0008-5472.CAN-04-1443.
- Wong, Piu, Masayuki Iwasaki, Tim C. P. Somervaille, Chi Wai Eric So, et Michael L. Cleary. 2007. « Meis1 Is an Essential and Rate-Limiting Regulator of MLL Leukemia Stem Cell Potential ». *Genes & Development* 21(21): 2762-74. doi:10.1101/gad.1602107.
- Wong, Terrence N., Giridharan Ramsingh, Andrew L. Young, Christopher A. Miller, Waseem Touma, John S. Welch, Tamara L. Lamprecht, et al. 2015. « Role of TP53 Mutations in the Origin and Evolution of Therapy-Related Acute Myeloid Leukaemia ». *Nature* 518(7540): 552-55. doi:10.1038/nature13968.
- Xuan, Li, Yu Wang, Fen Huang, Zhiping Fan, Yajing Xu, Jing Sun, Na Xu, et al. 2020. « Sorafenib Maintenance in Patients with FLT3-ITD Acute Myeloid Leukaemia Undergoing Allogeneic Haematopoietic Stem-Cell Transplantation: An Open-Label, Multicentre, Randomised Phase 3 Trial ». *The Lancet. Oncology* 21(9): 1201-12. doi:10.1016/S1470-2045(20)30455-1.
- Yamamoto, Y., H. Kiyoi, Y. Nakano, R. Suzuki, Y. Kodera, S. Miyawaki, N. Asou, et al. 2001. « Activating Mutation of D835 within the Activation Loop of FLT3 in Human Hematologic Malignancies ». *Blood* 97(8): 2434-39. doi:10.1182/blood.v97.8.2434.
- Yang, Fei, Nicola Long, Tauangtham Anekpuranang, Daniel Bottomly, Jonathan C. Savage, Tiffany Lee, Jose Solis-Ruiz, et al. 2022. « Identification and Prioritization of Myeloid Malignancy Germline Variants in a Large Cohort of Adult Patients with AML ». *Blood* 139(8): 1208-21. doi:10.1182/blood.2021011354.

- Yi, Jun Ho, Jungwon Huh, Hee-Jin Kim, Sun-Hee Kim, Hyeoung-Joon Kim, Yeo-Kyeong Kim, Sang Kyun Sohn, et al. 2011. « Adverse Prognostic Impact of Abnormal Lesions Detected by Genome-Wide Single Nucleotide Polymorphism Array-Based Karyotyping Analysis in Acute Myeloid Leukemia with Normal Karyotype ». *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* 29(35): 4702-8. doi:10.1200/JCO.2011.35.5719.
- Yilmaz, Musa, Muharrem Muftuoglu, Courtney D. DiNardo, Tapan M. Kadia, Marina Y. Konopleva, Gautam Borthakur, Naveen Pemmaraju, et al. 2023. « Phase I/II Study of Quizartinib, Venetoclax, and Decitabine Triple Combination in FLT3-ITD Mutated AML ». *Blood* 142(Supplement 1): 158. doi:10.1182/blood-2023-186699.
- Yokoyama, Shota, Masahiro Onozawa, Shota Yoshida, Naoki Miyashita, Hiroyuki Kimura, Shogo Takahashi, Toshihiro Matsukawa, et al. 2023. « Subclinical Minute FLT3-ITD Clone Can Be Detected in Clinically FLT3-ITD-Negative Acute Myeloid Leukaemia at Diagnosis ». *British Journal of Haematology* 201(6): 1144-52. doi:10.1111/bjh.18800.
- Young, David J., Bao Nguyen, Ruiqi Zhu, Jaesung Seo, Li Li, Mark J. Levis, Keith W. Pratz, Amy S. Duffield, et Donald Small. 2021. « Deletions in FLT-3 juxtamembrane domain define a new class of pathogenic mutations: case report and systematic analysis ». *Blood Advances* 5(9): 2285-93. doi:10.1182/bloodadvances.2020002876.
- Yuan, Danyang, Xiaoyu He, Xinyin Han, Chunyan Yang, Fei Liu, Shuying Zhang, Haijing Luan, et al. 2021. « Comprehensive review and evaluation of computational methods for identifying FLT3-internal tandem duplication in acute myeloid leukaemia ». *Briefings in Bioinformatics* 22(5): bbab099. doi:10.1093/bib/bbab099.
- Zarrinkar, Patrick P., Ruwanthi N. Gunawardane, Merryl D. Cramer, Michael F. Gardner, Daniel Brigham, Barbara Belli, Mazen W. Karaman, et al. 2009. « AC220 is a uniquely potent and selective inhibitor of FLT3 for the treatment of acute myeloid leukemia (AML) ». *Blood* 114(14): 2984-92. doi:10.1182/blood-2009-05-222034.
- Zeng, Andy G. X., Suraj Bansal, Liqing Jin, Amanda Mitchell, Weihsu Claire Chen, Hussein A. Abbas, Michelle Chan-Seng-Yue, et al. 2022. « A Cellular Hierarchy Framework for Understanding Heterogeneity and Predicting Drug Response in Acute Myeloid Leukemia ». *Nature Medicine* 28(6): 1212-23. doi:10.1038/s41591-022-01819-x.
- Zhang, S., et H. E. Broxmeyer. 2000. « Flt3 Ligand Induces Tyrosine Phosphorylation of Gab1 and Gab2 and Their Association with Shp-2, Grb2, and PI3 Kinase ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 277(1): 195-99. doi:10.1006/bbrc.2000.3662.
- Zhang, S., S. Fukuda, Y. Lee, G. Hangoc, S. Cooper, R. Spolski, W. J. Leonard, et H. E. Broxmeyer. 2000. « Essential Role of Signal Transducer and Activator of Transcription (Stat)5a but Not Stat5b for Flt3-Dependent Signaling ». *The Journal of Experimental Medicine* 192(5): 719-28. doi:10.1084/jem.192.5.719.
- Zhang, S., C. Mantel, et H. E. Broxmeyer. 1999. « Flt3 Signaling Involves Tyrosyl-Phosphorylation of SHP-2 and SHIP and Their Association with Grb2 and Shc in Baf3/Flt3 Cells ». *Journal of Leukocyte Biology* 65(3): 372-80. doi:10.1002/jlb.65.3.372.
- Zhang, Yu, Yang Zhang, Fang Wang, Mingyu Wang, Hong Liu, Xue Chen, Panxiang Cao, et al. 2020. « The Mutational Spectrum of FLT3 Gene in Acute Lymphoblastic Leukemia Is Different from Acute Myeloid Leukemia ». *Cancer Gene Therapy* 27(1-2): 81-88. doi:10.1038/s41417-019-0120-z.
- Zheng, Rui, Alan D. Friedman, et Donald Small. 2002. « Targeted Inhibition of FLT3 Overcomes the Block to Myeloid Differentiation in 32Dcl3 Cells Caused by Expression of FLT3/ITD Mutations ». *Blood* 100(12): 4154-61. doi:10.1182/blood-2002-03-0936.
- Zuffa, Elisa, Eugenia Franchini, Cristina Papayannidis, Carmen Baldazzi, Giorgia Simonetti, Nicoletta Testoni, Maria Chiara Abbenante, et al. 2015. « Revealing Very Small FLT3 ITD Mutated Clones by Ultra-Deep Sequencing Analysis Has Important Clinical Implications in AML Patients ». *Oncotarget* 6(31): 31284-94. doi:10.18632/oncotarget.5161.
- Zuo, Zhuang, L. Jeffrey Medeiros, et C. Cameron Yin. 2023. « Acute myeloid leukemia with concurrent NPM1 and RUNX1 mutations ». *Leukemia Research Reports* 20: 100385. doi:10.1016/j.lrr.2023.100385.

RÉSUMÉ

Les mutations de *NPM1* et les mutations *FLT3*-ITD sont les plus fréquemment mises en évidence au diagnostic de leucémie aiguë myéloïde (LAM).

Les LAM mutées *NPM1* ont un pronostic globalement favorable. Toutefois, elles présentent des co-mutations et des phénotypes très hétérogènes, susceptibles d'influencer le pronostic ainsi que la réponse au traitement. Afin d'explorer le lien entre les mutations somatiques et la différenciation phénotypique, nous avons utilisé une plateforme de séquençage unicellulaire multi-omique chez 11 échantillons diagnostiques de LAM mutées *NPM1*. Notre analyse a mis en évidence des associations spécifiques entre les co-mutations et l'expression de protéines de surface. Même si ces associations étaient propres à chaque patient, elles ont permis l'enrichissement en sous-clones génétiques spécifiques par tri cellulaire et ouvrent ainsi la voie à la caractérisation fonctionnelle des clones génétiques minoritaires.

Depuis 2017, les patients mutés *FLT3* sont traités en première ligne par une association de chimiothérapie intensive (CTI) et de midostaurine (MIDO), un inhibiteur de *FLT3*. Bien que l'ajout de la MIDO ait permis d'améliorer la survie des patients, les taux de rémission complète obtenus demeurent proches de 60-70% et les rechutes surviennent encore dans plus de 40% des cas. Afin d'identifier les mécanismes de résistance à l'œuvre, nous avons réalisé une étude rétrospective et multicentrique incluant 150 patients en rechute ou réfractaires (R/R) présentant une mutation *FLT3*-ITD (n = 130) et/ou *FLT3*-TKD (n = 26) au diagnostic en analyse de fragments. Les patients ont été traités en première ligne soit par l'association CTI et MIDO (n = 54) soit uniquement par CTI (n = 96). Pour la première fois, nous avons étudié l'évolution des clones *FLT3*-ITD entre le diagnostic et le stade R/R à l'aide d'une approche de séquençage à haut débit permettant d'identifier les microclones *FLT3*-ITD (ratio allélique < 0,05). Nous avons démontré que l'ajout de MIDO à la CTI diminue le taux de persistance de la mutation *FLT3*-ITD au stade R/R. Chez les patients traités par CTI et MIDO, la présence de plusieurs clones *FLT3*-ITD au diagnostic était associée à une probabilité plus importante de conserver un statut *FLT3*-ITD positif au stade R/R. Au sein des deux groupes de traitement combinés, bien que seulement 24% des microclones *FLT3*-ITD aient été conservés à la rechute, 43% d'entre eux sont devenus des macroclones. Au total, ces résultats identifient des paramètres influençant l'évolution des clones *FLT3*-ITD et soulignent l'importance d'utiliser des techniques sensibles pour rechercher les mutations *FLT3*-ITD en pratique clinique.

ABSTRACT

NPM1 and *FLT3*-ITD mutations are the most commonly detected at acute myeloid leukemia (AML) diagnosis.

NPM1-mutated AMLs have a favorable outcome. However, they display highly heterogeneous co-mutations and phenotypes, which can influence both prognosis and response to treatment. To explore the link between somatic mutations and phenotypic differentiation, we used a multi-omics single-cell sequencing platform on 11 *NPM1*-mutated AML diagnostic samples. Our analysis revealed unique associations between co-mutations and surface protein expression. Although these associations were patient-specific, they allowed the enrichment of genetic subclones by cell sorting, paving the way for the functional characterization of minority genetic clones.

Since 2017, *FLT3*-mutated patients have been treated in the first-line setting with a combination of intensive chemotherapy (ICT) and the *FLT3*-inhibitor midostaurin (MIDO). Although the addition of MIDO has improved overall survival, complete remission rates remain close to 60-70%, and relapses still occur in over 40% of cases. To identify the underlying mechanisms of resistance, we conducted a retrospective, multicenter study including 150 relapsed or refractory (R/R) patients harboring *FLT3*-ITD (n = 130) and/or *FLT3*-TKD (n = 26) at diagnosis as assessed by fragment analysis. Patients were treated in front-line with either ICT and MIDO (n = 54) or ICT alone (n = 96). For the first time, we examined the evolution of *FLT3*-ITD clones between diagnosis and R/R disease with a high-throughput sequencing approach allowing the detection of *FLT3*-ITD microclones (allelic ratio < 0.05). We demonstrated that the addition of MIDO to ICT reduced the *FLT3*-ITD persistence rate at R/R disease. In patients receiving ICT and MIDO, the presence of several *FLT3*-ITD clones at diagnosis was associated with a higher probability of retaining a positive *FLT3*-ITD status at R/R disease. Considering both treatment groups, if only 24% of *FLT3*-ITD microclones were retained at relapse, 43% of these became macroclones. Together, these results identify some parameters influencing the fitness of *FLT3*-ITD clones and highlight the importance of using sensitive techniques for *FLT3*-ITD screening in clinical practice.