

**MEMOIRE
POUR LE DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
DE BIOLOGIE MEDICALE**

**Soutenu publiquement le 30 juin 2016
Par M. Benoît Ducourneau**

**Conformément aux dispositions du Décret du 10 septembre 1990
tient lieu de**

THESE EN VUE DU DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Apport de la RT-MLPA dans la prise en charge des
leucémies aiguës myéloïdes**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle Dupont

Assesseurs : Monsieur le Professeur Vahid Asnafi
Monsieur le Docteur Philippe Ruminy
Monsieur le Docteur Olivier Nibourel

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille



3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE
CEDEX

☎ 03.20.96.40.40 - 📠 : 03.20.96.43.64

<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président :
Vice- présidents :

Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE
Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric KERCKHOVE
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Damien CUNY
Professeur Benoit DEPREZ
Professeur Murielle GARCIN
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Monsieur Antoine HENRY

Directeur Général des Services :

Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen :
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur :
Assesseur en charge de la pédagogie
Assesseur en charge de la recherche
Assesseur délégué à la scolarité
Assesseur délégué en charge des
relations internationales
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante

Professeur Damien CUNY
Professeur Bertrand DECAUDIN
Dr. Annie Standaert
Pr. Patricia Melnyk
Dr. Christophe Bochu

Pr. Philippe Chavatte
M. Thomas Morgenroth

Chef des services administratifs :

Monsieur Cyrille PORTA

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
Mme	CAPRON	Monique	Immunologie
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DINE	Thierry	Pharmacie Clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie
M.	DUTHILLEUL	Patrick	Hématologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie

M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie Clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	Chimie Organique (ICPAL)

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Chimie Thérapeutique 1
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie Clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Chimie Thérapeutique 2
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie Générale
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie Générale
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
Mme	GRAS	Hélène	Chimie Thérapeutique 3
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie Thérapeutique 2
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY – MAILLOLS	Anne Catherine	Droit et économie Pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Droit et économie Pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire
M	TARTAR	André	Chimie Organique
M.	VACCHER	Claude	Chimie Analytique
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie Organique
M.	MILLET	Régis	Chimie Thérapeutique (ICPAL)

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie
M.	LANNOY	Damien	Pharmacie Galénique
Mme	ODOU	Marie Françoise	Bactériologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	AGOURIDAS	Laurence	Chimie Thérapeutique 2
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie (90%)
M.	ANTHERIEU	Sébastien	Toxicologie
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
Mme	BANTUBUNGI	Kadiombo	Biologie Cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Pharmacie Galénique
Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie
M	BELARBI	Karim	Pharmacologie
M.	BERTHET	Jérôme	Physique
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie Industrielle
M.	BOCHU	Christophe	Physique
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie Cellulaire (80%)
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie (80%)
Mme	CHARTON	Julie	Chimie Organique (80%)
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie (80%)
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie Cellulaire
M.	FARCE	Amaury	Chimie Thérapeutique 2
Mme	FLIPO	Marion	Chimie Organique
Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacologie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
Mme	HAMOUDI	Chérifa Mounira	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA	Kpakpaga Nicolas	Pharmacologie
M.	KARROUT	Youness	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie Thérapeutique 1
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie Pharmaceutique
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie Industrielle

Mme	NEUT	Christel	Bactériologie
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	WILLEMAGNE	Baptiste	Chimie Organique
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie Thérapeutique 1
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

M.	FURMAN	Christophe	Pharmacobiochimie (ICPAL)
Mme	GOOSSENS	Laurence	Chimie Organique (ICPAL)
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie Pharmaceutique

Professeurs Certifiés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mlle	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie Pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	BERTOUX	Elisabeth	Pharmacie Clinique - Biomathématiques

M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
M.	CUCCHI	Malgorzata	Information Médicale
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et économie Pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	DEKYNDT	Bérengère	Pharmacie Galénique
M.	PEREZ	Maxime	Pharmacie Galénique

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE CEDEX
Tel. : 03.20.96.40.40 - Télécopie : 03.20.96.43.64
<http://pharmacie.univ-lille2.fr>

L'Université n'entend donner aucune approbation aux opinions émises dans les thèses ; celles-ci sont propres à leurs auteurs.

Remerciements

A mon président de thèse,

Madame le Professeur Annabelle Dupont

Professeur des universités

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie Hémostase

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Vous avez accepté de présider cette thèse et je vous en remercie chaleureusement. Merci pour votre professionnalisme et votre disponibilité.

A mes assesseurs,

Monsieur le Professeur Vahid Asnafi

Professeur des universités

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie

Centre Hospitalier Universitaire Pédiatrique de Paris – Hôpital Necker Enfants Malades

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et de l'intérêt porté à ce travail. Soyez assuré de ma sincère reconnaissance.

Monsieur le Docteur Philippe Ruminy

Chercheur au sein du Centre Henri-Becquerel de Rouen
Inserm U918

Je suis très heureux que tu aies accepté de juger ce travail. Je te remercie encore pour ta disponibilité, tes échanges toujours très constructifs, ton aide et tes précieuses explications. Tu es à l'origine du fondement de ma thèse et je te suis profondément reconnaissant. Sois assuré de mon profond respect.

Monsieur le Docteur Olivier Nibourel

Praticien Hospitalier

Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie moléculaire

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté de faire partie de mon jury et pour ton aide tout au long de mon travail et de mes semestres passés au laboratoire d'Hématologie. Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

Professeur des Universités

Praticien Hospitalier

Chef de service du Laboratoire d'Hématologie Cellulaire

Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je vous suis très reconnaissant de la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce travail de thèse et au cours de mes 2 semestres passés dans le laboratoire. Je vous remercie pour votre disponibilité, pour les opportunités que vous m'avez données à présenter dans des congrès ou des réunions nationales. Je suis très heureux vous soyez mon directeur de thèse et que vous ayez pu me transmettre votre passion pour l'Hématologie et la Biologie Moléculaire. Soyez assuré de mon plus grand respect.

Je tiens également à remercier :

Nathalie Helevaut pour son aide précieuse dans la réalisation de ce travail, pour ses conseils techniques et ses explications mais également son humour.

Aurélie Caillault, Maxime Bucci, Sandrine Geffroy pour leur sympathie et leur aide.

Les biologistes :

Nathalie Gardel pour son côté humain, son aide et son humour.

Aline Renneville pour ses relectures de ma thèse, sa disponibilité, ses conseils toujours très précieux et très pertinents.

Thomas Boyer pour ses enseignements, sa sympathie, sa disponibilité et ses conseils.

Nicolas Duployez pour son aide très précieuse dans la réalisation de ce travail, ses conseils, son savoir sur la biologie moléculaire et la cytogénétique mais également pour ses relectures sur mes différents travaux.

Et Lotfi, Christophe, Valérie, Martine et Florent pour les enseignements.

Les techniciens du laboratoire d'Hématologie pour leur aide et leur humour.

Je garde un excellent souvenir de mes 2 semestres passés avec vous.

En dernier lieu, je tiens à remercier les personnes qui m'ont permis de réaliser mes projets et ce travail :

Mes amis et cointernes, notamment Gauthier, Florian et Thomas.

A mes parents à qui je dois beaucoup de choses, qui m'ont permis de réaliser mes études et qui m'ont soutenu durant toutes ces années. Merci pour tout.

A ma sœur Laëtitia et mon beau-frère Rémi pour leurs encouragements.

Et surtout à Anaïs pour ses encouragements, son amour et son soutien tout au long de ces années passées à mes côtés surtout lors des moments les plus difficiles.

ABREVIATIONS

ALFA : *Acute Leukemia French Association*
ADN : *Acide désoxyribonucléique*
AML1 : *Acute myeloid leukemia 1 transcription factor*
ARN : *Acide ribonucléique*
BCR : *Breakpoint cluster regions*
CBF : *Core binding factor*
CBFB : *Core binding factor, beta subunit*
CEBPA : *CCAAT/enhancer binding protein alpha*
CMF : *Cytométrie en flux*
CSH : *Cellule souche hématopoïétique*
CSL : *Cellule souche leucémique*
ETO : *Eight-twenty one*
FAB : *French-American-British*
FISH : *Fluorescence in situ hybridization*
FLT3 : *Fms-related tyrosine kinase 3*
FLT3-ITD : *FLT3 internal tandem duplication*
FLT3-TKD : *FLT3 tyrosine kinase domain mutation*
FT : *Facteur de transcription*
GM-CSF : *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*
IL : *Interleukine*
ITK : *Inhibiteurs de tyrosine kinase*
JAK2 : *Janus kinase 2*
LA : *Leucémie aiguë*
LAL : *Leucémie aiguë lymphoblastique*
LAM : *Leucémie aiguë myéloblastique*
LAP : *Leucémie aiguë promyélocytaire*
LD-RTPCR : *Ligation dependant reverse transcription-polymerase chain reaction (ou RT-MLPA)*
LMC : *Leucémie myéloïde chronique*
MLL : *Mixed-lineage leukemia*
MRD : *Maladie résiduelle (minimal residual disease)*
NPM1 : *Nucleophosmin 1*
OMS : *Organisation mondiale de la santé*
OS : *Overall survival*
PAX5 : *Paired box 5*
Pb : *Paires de bases*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PDGFRA : *Platelet-derived growth factor receptor alpha*

PDGFRB : *Platelet-derived growth factor receptor beta*
PML : *Promyelocytic leukemia protein*
RARA : *Retinoic acid receptor, alpha*
RC : Rémission complète
RQ-PCR : *Real-time quantitative-polymerase chain reaction*
RT-MLPA : *Reverse transcription multiplex ligation-dependant probe amplification*
(ou LD-RTPCR)
RT-PCR : *Reverse transcription-polymerase chain reaction*
RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*
RUNX1T1 : *RUNX1 translocated to, 1*
SCF : *Stem Cell Factor*
SMD : *Syndrom myélodysplasique*
SMP : *Syndrom myéoprolifératif*
t-AML : *Therapy-related acute myeloid leukemia*
TEL : *ETV6 ets variant 6*
WT1 : *Wilms tumor 1*

SOMMAIRE

I) L'Hématopoïèse :	16
A. Définition	16
B. Ontogénie et localisation	16
C. Les quatre compartiments de l'hématopoïèse	17
D. Régulation	20
II) Ontogénèse leucémique : cellule souche cancéreuse	26
A. Définition	26
B. Caractéristiques des CSL	26
C. Oncogène et leucémie	27
III) Leucémies aiguës myéloïdes:	31
A. Généralités	31
B. Epidémiologie	31
C. Etiologies des LAM	31
D. Signes cliniques	32
E. Diagnostic biologique	34
F. Classification des LAM	38
G. Facteurs pronostiques des LAM	41
H. Stratégie thérapeutique dans les LAM :	53
OBJECTIFS	59
MATERIELS ET METHODES	60
I) Patients	60
II) Isolements cellulaires	60
III) Extraction de l'ARN	61
IV) Rétro-transcription	63
V) LD-RTPCR des transcrits de fusion	70
VI) Electrophorèse sur gel	71
VII) Pyroséquençage	72
VIII) Identification du transcrit de fusion	81
RESULTATS	84
I) Analyse du protocole ALFA0701 :	84
II) Analyse du protocole ELAM02 :	85
III) Application de la RT-MLPA au laboratoire du CHRU de Lille au diagnostic des LA : 87	
IV) Synthèse des résultats retrouvés en RT-MLPA et technique conventionnelle :	90
V) Importance et implications cliniques des anomalies moléculaires retrouvées uniquement en RT-MLPA	93

DISCUSSION	94
CONCLUSION	100
Bibliographie	104

TABLE DES ILLUSTRATIONS

Tableau 1 : Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les LA	28
Tableau 2 : Classification FAB (44)	38
Tableau 3 : Classification OMS 2016 des leucémies aiguës myéloblastiques et hémopathies apparentées(45).....	39
Tableau 4 : Réactifs et volumes utilisés pour la rétro-transcription.....	64
Tableau 5 : Liste des gènes et exons détectés en RT-MLPA.....	75
Tableau 6 : Identification des résultats retrouvés uniquement en techniques conventionnelles.....	91
Tableau 7 : Identification des résultats retrouvés uniquement par RT-MLPA.....	91
Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'hématopoïèse.....	20
Figure 2 : Rôle des facteurs de transcription dans l'hématopoïèse	21
Figure 3 : Rôle des facteurs de croissance.....	24
Figure 4 : Anomalies moléculaires des LAM de l'adulte	45
Figure 5 : Structure du gène NPM1	46
Figure 6 : Impact des mutations de NPM1 (avec et sans FLT3-ITD) sur la survie des patients de LAM à caryotype normal (60).....	47
Figure 7 : Structure de la protéine CEBPA	48
Figure 8 : Impact des mutations de CEBPA (double mutés et simple mutés) sur la survie des patients atteints de LAM-CN :	49
Figure 9 : La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës.....	51
Figure 10 : Suivi de la MRD dans les LA	53
Figure 11 : Schéma du protocole ALFA-0701.....	56
Figure 12 : Schéma du protocole ELAM02.....	58
Figure 13 : Principe de la rétro-transcription.....	63
Figure 14 : Profil typique en Q-PCR avec représentation du Ct	65
Figure 15 : Représentation de la droite standard en Q-PCR	66

Figure 16 : Principe de la Q-PCR utilisant le SYBR Green.....	67
Figure 17 : Principe de la Q-PCR utilisant la méthode Taqman	68
Figure 18 : Principe du pyroséquençage	72
Figure 19 : Station sous vide du pyroséquenceur.....	73
Figure 20 : Pyroséquenceur PyroMark MD Q96 Qiagen	74
Figure 21 : Exemple de pyrogramme obtenu par pyroséquençage	75
Figure 22 : Interprétation d'un pyrogramme.....	81
Figure 23 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour le protocole ALFA0701	84
Figure 24 : Résultats retrouvés en RT-MLPA pour le protocole ALFA0701 non.....	85
Figure 25 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour le protocole ELAM02	86
Figure 26 : Résultats retrouvés uniquement en RT-MLPA pour le protocole ELAM02	87
Figure 27 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour la routine au laboratoire du CHRU de Lille.....	88
Figure 28 : Transcrits de fusion BCR-ABL1 like retrouvés en routine.....	89
Figure 29 : Résultats retrouvés uniquement en RT-MLPA pour la routine au laboratoire du CHRU de Lille	90
Figure 30 : Synthèse des résultats retrouvés dans notre étude.....	90

INTRODUCTION

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène et complexe de maladies présentant une incidence de 3 cas pour 100 000 habitants en France.

Elles sont caractérisées par une prolifération clonale des précurseurs myéloïdes associée à une diminution de leur capacité de différenciation et de leur maturation.

Il s'agit de maladies génétiques très hétérogènes dues à l'accumulation de modifications génétiques acquises somatiques dans les cellules progénitrices hématopoïétiques normales à l'origine de l'altération des mécanismes d'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation.

Elles sont alors définies par une multiplication incontrôlée de blastes dans la moelle osseuse et dans le sang.

I) L'Hématopoïèse :

A. Définition

L'hématopoïèse est un processus physiologique complexe finement régulé qui assure la production et le renouvellement des cellules sanguines à partir d'un faible nombre de cellules appelées cellules souches hématopoïétiques.

Elle se déroule dans le micro-environnement de la moelle osseuse où le devenir des cellules souches hématopoïétiques dépend de facteurs intrinsèques et extrinsèques.

En effet, ces CSH sont mises en contact avec une série d'autres types de cellules.

La communication intercellulaire s'établit alors par liaison via les récepteurs de la surface cellulaire avec des molécules d'adhésion, des cytokines ainsi qu'avec des facteurs de croissance fixes ou sécrétés. Cette liaison déclenche la transduction du signal régulateur de la transcription génétique induisant la prolifération, la différenciation et l'apoptose.

B. Ontogénie et localisation

L'hématopoïèse primitive débute pendant la vie embryonnaire (J21) et dérive du mésoderme par l'apparition de CSH primitives dans le sac vitellin avec un potentiel érythromyéloïde unique.

Puis apparaissent des CSH à potentiel multilignage dans la région aortique. Celles-ci laissent place à l'hématopoïèse définitive (J28) où les cellules souches hématopoïétiques colonisent le foie jusque 20 semaines d'aménorrhée, la rate et enfin la moelle osseuse qui constitue le lieu exclusif de l'hématopoïèse à la naissance et chez l'adulte.

Ce tissu hématopoïétique se retrouve dans tous les os chez le nourrisson, dans le squelette axial et dans les extrémités proximales des os longs chez l'adulte.

C. Les quatre compartiments de l'hématopoïèse

Nous pouvons distinguer quatre compartiments cellulaires : les cellules souches pluripotentes, les progéniteurs multipotents et les précurseurs, tous situés dans la moelle osseuse (Figure 1). Les cellules matures se trouvent à proximité ou dans la circulation puisqu'il s'agit de cellules fonctionnelles.

- Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) multipotentes. Elles représentent 0.01 à 0.05% des cellules de la moelle osseuse et sont capables d'auto-renouvellement et de différenciation. Ces CSH sont une population hétérogène de par leurs multiples aspects incluant leur degré d'auto-renouvellement, leur mode de différenciation et leur durée de vie.

Nous citerons deux classifications possibles de ces CSH (1):

- Classification selon le ratio progéniteurs Lymphoïdes et Myéloïdes dans le sang (L/M) :

Population de CSHs	Ratio (L/M)
My-bi	<3
Ba-bi	Entre 3 et 10
Ly-bi	>10

- Classification selon le temps de reconstitution :
 - ✓ Les LT-HSC (CSH avec renouvellement à long terme) de phénotype CD 34+ CD38- HLA-DR- CD90+ CD45RA- CD 123+ CD33- c-KIT + Rho123+ chez l'Homme. Elles peuvent s'auto-renouveler pour maintenir un pool stable de cellules souches dans la moelle osseuse ou se différencier en ST-CSH (2) (3).
 - ✓ Les IT-HSC expriment integrin $\alpha 2$ (CD49b) CD34- c-KIT+ Rho123-. Elles permettent de reconstituer une hématopoïèse physiologique pendant une durée limitée de 6 à 12 mois (4).
 - ✓ Les ST-HSC (CSH avec renouvellement à court terme) de phénotype CD 34+ CD 38- CD90- CD45RA- CD 133+ à l'origine d'un progéniteur multipotent (MP) qui se différencie en progéniteur commun myéloïde ou progéniteur commun lymphoïde pour une courte période de 6 semaines (5).

Les CSH possèdent différentes propriétés :

- L'auto-renouvellement qui permet le maintien du pool de CSH et engendre au moins une cellule fille qui conserve le potentiel souche.
- La multipotence c'est-à-dire la capacité des CSH dites primitives de donner toutes les cellules du sang.
- La capacité de « homing » ou domiciliation qui permet aux CSH de retourner dans la moelle osseuse après un passage dans la circulation sanguine. Cette caractéristique est essentielle en transplantation. Il s'agit d'un processus en plusieurs étapes qui fait intervenir différents acteurs moléculaires :

- ❖ l'interaction transitoire et l'activation des CSH avec l'endothélium (P et E sélectine avec leurs ligands respectifs PSGL-1 et ESL-1)
 - ❖ l'extravasation des CSH grâce aux molécules d'adhésions VCAM-1 et ICAM-1,2,3
 - ❖ la migration trans-endothéliale et le passage dans la moelle osseuse suite à la dégradation de la matrice extra-cellulaire par la protéase MMP (Matrix-degrading enzymes) et enfin le signal donné par la chémokine CXCL12 (SDF-1) de ligand CXCR4 qui stimule la migration des CSH dans la moelle osseuse et plus précisément dans la niche hématopoïétique (6)
- o La forte expression de l'Aldéhyde Déshydrogénase 1 (ALDH1) qui peut être utilisée pour identifier les CSH et qui permet une résistance des CSH au stress. Cet enzyme impliqué dans le métabolisme des aldéhydes interviendrait également dans des mécanismes de résistance des cellules immatures (comme les blastes) aux anti-cancéreux tels que le cyclophosphamide inactivé et excrété par la cellule ou l'étoposide, la mitomycine C (7).
 - o La capacité de reconstitution *in vivo* de l'hématopoïèse mise en évidence après injection de CSH dans des souris NOD (défaut d'activité NK), SCID (absence totale de lymphocytes B et T) et plus récemment des souris NOD-SCID (immunodéficiência accrue en cellules NK et lymphocytes B et T), NOD-SCID- $\beta 2m^{null}$ (dépourvues des molécules d'histocompatibilité de classe I OU CMH I) (8), NOD-SCID- γc^{null} (totalement dépourvues de cellules NK) (9) qui ont amélioré la greffe des cellules humaines notamment grâce à l'augmentation des taux de reconstitution hématopoïétique.
 - o La quiescence mitotique au stade G0 de leur cycle cellulaire qui leur permet de ne pas être touchées par les traitements chimiothérapeutiques.
 - o L'expression de transporteurs ABC (ATP Binding Cassette) à la surface des CSH notamment la glycoprotéine P (PGP ou MDR1), ABCG 2 ou encore MRP4/ABCC4 qui disparaissent au cours de la différenciation et peuvent intervenir dans la résistance au traitement de leucémie(10).
 - o La présence d'une activité télomérase, ribonucléoprotéine codée par le gène *TERT* qui catalyse l'addition d'une séquence répétée spécifique (TTAGGG) à l'extrémité des chromosomes afin d'éviter le raccourcissement lié à l'âge (11).

Ces CSH aboutissent toujours à deux cellules filles par division asymétrique : une CSH identique à la cellule mère et un progéniteur capable de se différencier, de proliférer mais incapable de s'auto-renouveler (12).

Ces progéniteurs se différencient en précurseurs qui se différencient eux-mêmes pour donner naissance aux cellules matures fonctionnelles, peu proliférantes, incapables d'auto-renouvellement mais majoritaires au sein de la moelle osseuse (plus de 99% des cellules médullaires).

- Les progéniteurs sont issus de la différenciation des CSH et perdent progressivement leur capacité d'autorenouvellement. Ils ne sont pas

identifiables morphologiquement mais acquièrent les marqueurs immunologiques CD 33 et HLA DR.

Concernant la nomenclature, le progéniteur de la lignée myéloïde est appelé CFU-GEMM « Colony Forming Unit » suivi des lettres qui désignent les lignées dont elle garde le potentiel de différenciation « Granuleuse, Erythrocytaire, Macrophage, Mégacaryocytaire ».

Ainsi au cours de l'évolution de l'hématopoïèse on distingue différents progéniteurs :

- o CFU-GM : lignée Granulo-macrophagique à l'origine des polynucléaires neutrophiles et monocytes
 - o CFU-G : lignée Granuleuse à l'origine des polynucléaires neutrophiles
 - o CFU-M : lignée Macrophagique à l'origine des monocytes
 - o CFU-MK : lignée Mégacaryocytaire à l'origine des plaquettes
 - o CFU-Eo : lignée Eosinophile à l'origine des polynucléaires éosinophiles
 - o CFU-B : lignée Basophile à l'origine des polynucléaires basophiles
 - o BFU-E (Burst Forming Unit) : lignée Erythroïde à l'origine des hématies
- Les précurseurs constituent le compartiment de multiplication et de maturation. Ils sont identifiables morphologiquement et spécifiques de chaque lignée.

La maturation hématocellulaire implique les modifications morphologiques suivantes : la diminution de la taille cellulaire, la diminution du rapport nucléocytoplasmique, la disparition des nucléoles, la condensation de la chromatine. Sont alors retrouvés les précurseurs les plus immatures à l'origine de chaque lignée cellulaire :

- o Les myéloblastes évoluant vers les polynucléaires
 - o Les proérythroblastos évoluant vers les hématies
 - o Les mégacaryoblastes évoluant vers les plaquettes
 - o Les lymphoblastes évoluant vers les lymphocytes
 - o Les monoblastes évoluant vers les monocytes
- Les cellules terminales matures et fonctionnelles qui rejoignent le compartiment sanguin : les polynucléaires neutrophiles, éosinophiles et basophiles, les hématies, les plaquettes, les lymphocytes et les monocytes. Le sang constitue le lieu de transport de ces cellules vers les tissus où elles exercent leurs fonctions.

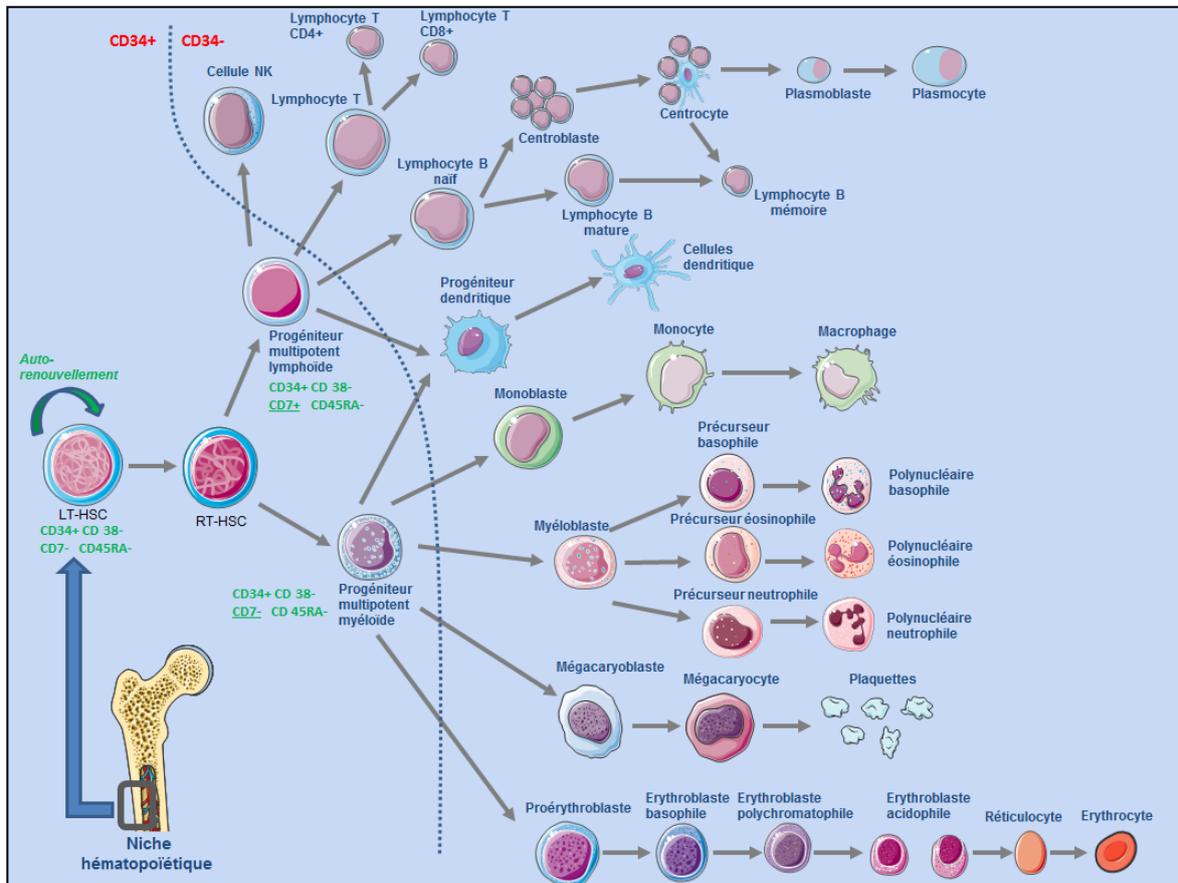


Figure 1 : Schéma récapitulatif de l'hématopoïèse

D. Régulation

L'hématopoïèse est un processus finement régulé et multifactoriel grâce au microenvironnement qui permet la sécrétion de facteurs de croissance stimulant les CSH et les progéniteurs (Figure 1). Ils vont ensuite entraîner la synthèse ou le recrutement de facteurs de transcription au sein de la cellule pour permettre la différenciation vers telle ou telle lignée. Ce processus de régulation fait donc intervenir des molécules extra-cellulaires (facteurs de croissance), intracytoplasmiques (récepteurs et voies de transduction du signal) et intranucléaires (facteurs de transcription et gènes spécifiques).

- Les facteurs de transcription exercent un rôle majeur dans la différenciation puisqu'ils contrôlent, au niveau génique, l'engagement des cellules dans un lignage grâce aux interactions avec les promoteurs des gènes spécifiques de lignée (Figure 2). On peut citer l'exemple des FT de la famille *IKAROS* qui ont principalement un rôle de répresseurs de la transcription par association avec des complexes de remodelage de la chromatine. *IKAROS* est une protéine à

doigt de zinc qui est exprimée dans toutes les cellules hématopoïétiques, ce facteur est crucial pour la différenciation et l'homéostasie des lymphocytes. Il faut noter que la perte d'*IKAROS* (*IKZF1*) a été détectée dans les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL B et T) chez l'Homme (13).

Il existe également PU-1 qui exerce un rôle indispensable dans le contrôle des fonctions des CSH puisqu'une diminution de PU-1 entraîne une altération de l'auto-renouvellement et de la différenciation vers les progéniteurs immatures myéloïdes et lymphoïdes. Par ailleurs le *CEBP alpha*, membre de la famille bZip des facteurs de transcription, est essentiel dans la différenciation granulocytaire (14). Ainsi une altération de PU-1 ou de *CEBP alpha* peut intervenir dans le processus de leucémogénèse.

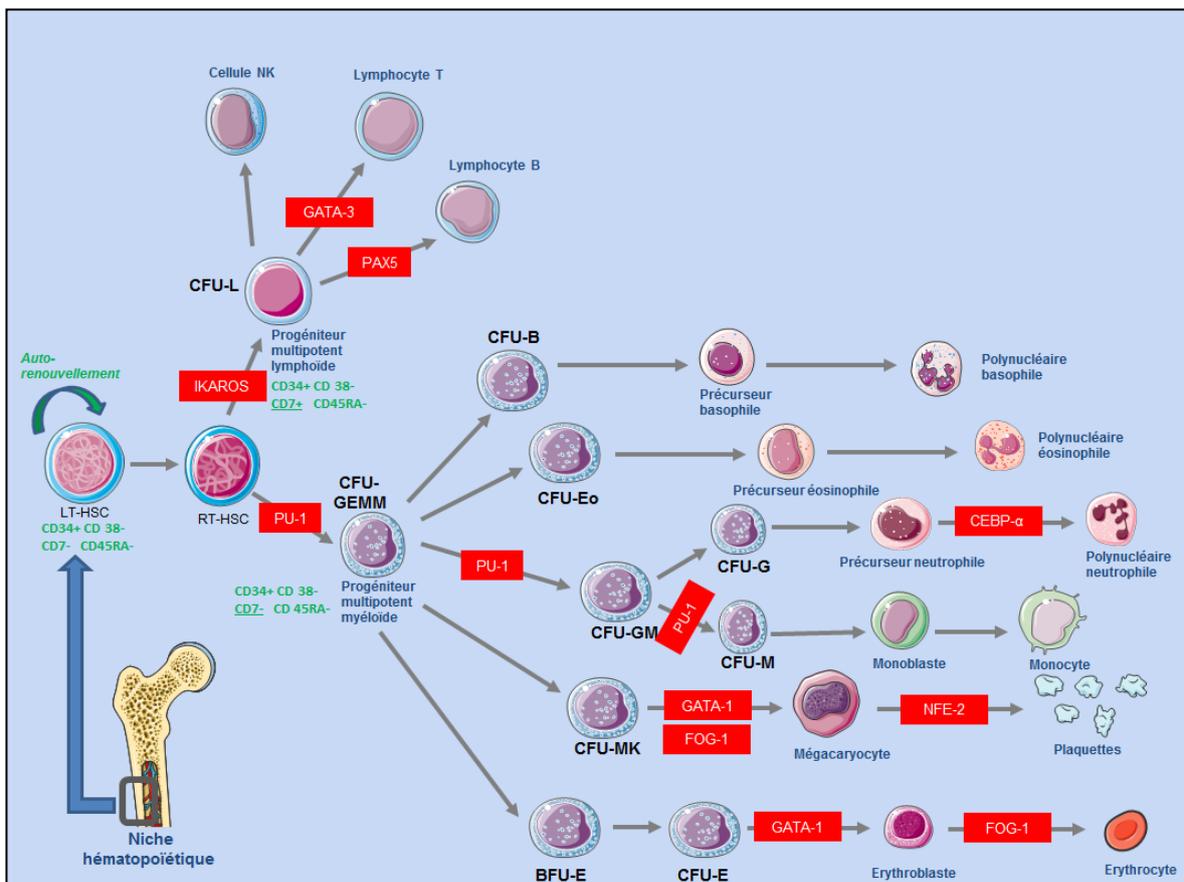


Figure 2 : Rôle des facteurs de transcription dans l'hématopoïèse

- Les facteurs solubles aussi appelés facteurs de croissance hématopoïétiques agissant comme des « hormones hématopoïétiques ». Il s'agit de glycoprotéines nécessitant la présence de récepteurs spécifiques transmembranaires.

Ils sont produits essentiellement par le stroma médullaire, les lymphocytes T ou les monocytes sauf l'EPO (érythropoïétine) synthétisée essentiellement par le rein et la TPO (thrombopoïétine) par le foie.

Ils agissent soit sur les différentes étapes de la différenciation, soit à des stades précis, en particulier précocement. Ces facteurs de croissance ont une action majeure sur la survie, la prolifération et la différenciation des progéniteurs hématopoïétiques et sur les cellules en cours de maturation.

Ainsi ils régulent l'hématopoïèse de manière positive ou négative grâce à leur effet sur la prolifération, différenciation ou survie des cellules hématopoïétiques (Figure 3).

- Régulation positive des FC :

Ils ont une action sur la survie, la prolifération, la différenciation des progéniteurs ainsi qu'une action pléiotrophique, redondante, séquentielle et synergique.

Ils permettent l'induction de cascades d'activation intra-cellulaire qui vont permettre le recrutement de FT et donc la stimulation de telle ou telle lignée.

Leur mode d'action est :

-*Direct* : IL3, GM-CSF sur les cellules peu différenciées, IL7 sur les progéniteurs lymphoïdes

-*Indirect* : IL1 qui stimule la production de GM-CSF, G-CSF, IL6

-*Paracrine* : action sur une cellule cible proche de la cellule productrice

-*Endocrine* : action sur une cellule éloignée : EPO, TPO (hormones)

-*Interaction* avec un récepteur spécifique.

Les FC peuvent être divisés en trois classes distinctes selon le pool cellulaire qu'ils régulent :

*Les facteurs synergiques comme les SCF, Flt3-L, IL-6, IL-11. Ces FC favorisent l'augmentation de l'entrée des CSH primitives dans le cycle et sensibilisent les cellules aux autres FC hématopoïétiques en induisant l'expression de récepteurs membranaires.

*Les facteurs multipotents comme l'IL-3, le GM-CSF pour les progéniteurs myéloïdes ou l'IL-7 pour les progéniteurs lymphoïdes, agissent sur les progéniteurs précoces et stimulent leur survie. Ils interviennent sur plusieurs lignées.

*Les facteurs restreints comme le G-CSF (granulocytes), M-CSF (monocytes et macrophages), EPO (érythrocytes), TPO (thrombocytes), IL-5 agissent sur la différenciation terminale des progéniteurs et interviennent surtout dans la maturation.

- Régulation négative des FC :
Ces FC bloquent la prolifération par inhibition de la transition G1/S au niveau du cycle cellulaire. Ils agissent sur :
 - les cellules primitives comme le TGF- β ou MIP-1 α qui provoquent la mise hors cycle et inhibent la prolifération.
 - les progéniteurs comme le TNF α qui diminue l'expression des Récepteurs du G-CSF et augmente celle des Récepteurs du GM-CSF et de l'IL-3, l'IFN $\alpha\beta\gamma$ qui augmente la cytotoxicité de manière directe ou indirecte.
 - la synthèse de cytokines telle que l'IL-10 qui diminue la production de FC hématopoïétiques par les monocytes et les lymphocytes T, la lactoferrine qui diminue la synthèse de G-CSF et de GM-CSF par les monocytes.

- Les récepteurs des FC :
L'action des FC nécessitent obligatoirement la fixation sur leur récepteur spécifique. Ils sont répartis en deux familles distinctes :
 - * Les récepteurs à activité Tyrosine Kinase (TK) constitués de deux sous-unités identiques qui s'homodimérisent après phosphorylation de tyrosines situées sur la partie intracellulaire des récepteurs. On peut citer : C-Kit (R-SCF), C-fms (R M-CSF), FLT3
 - * Les récepteurs des cytokines hématopoïétiques (ou superfamilles des Hématopoïétines) qui sont des glycoprotéines transmembranaires formées de plusieurs chaînes qui assurent la liaison du ligand et la transduction du signal. Cette famille de récepteurs se divise en trois groupes :
 - les récepteurs de l'IL-3, GM-CSF et IL-5 formés de deux chaînes (α spécifique du récepteur et β pour la transduction du signal qui active une protéine Jak).
 - les récepteurs de la famille de l'IL-6 (IL6, LIF, OSM, IL11) constitués de trois chaînes conduisant au même type d'activation intracellulaire
 - les récepteurs de l'EPO et du G-CSF avec une seule chaîne qui s'homodimérise et active des protéines Jak.

L'activation des récepteurs de FC entraîne la transduction du signal grâce à diverses voies de signalisation intra-cellulaires Jak (Janus kinase), STAT (Signal transducer and activators of transcription), PI3K (Phosphoinositides-3 Kinases) qui vont activer différents FT et agir sur le cycle cellulaire, la différenciation, la survie voir l'apoptose.

- Les voies de l'auto-renouvellement :
Il existe quatre voies de signalisation cellulaire majeures impliquées dans le développement embryonnaire et dans l'auto-renouvellement de l'ensemble des CSH. Ces voies sont :
 - la voie *Bmi-1* : le gène *Bmi-1* est un gène de la famille des gènes polycomb possédant un rôle important dans l'auto-renouvellement et le maintien des CSH. Il exerce un effet critique et dose-dépendant dans la régulation des progéniteurs primitifs de la moelle osseuse (15).

Par ailleurs, une étude a montré l'augmentation de l'expression de *Bmi-1* lors la double mutation de *CEBP alpha*. Le gène *Bmi-1* permet de compenser la perte de *CEBP alpha* et d'assurer l'auto-renouvellement des CSH ainsi que le maintien de l'hématopoïèse (16).

-la voie *Notch* : le gène *Notch* intervient dans le contrôle du devenir cellulaire. Il représente un élément essentiel dans le développement embryonnaire et dans l'homéostasie du système hématopoïétique notamment dans l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules hématopoïétiques primitives (17).

-la voie *Wnt/β-caténine* : elle dépend essentiellement d'une molécule : la β-caténine qui intervient, après phosphorylation par GSK-3 β, comme un coactivateur transcriptionnel et qui permet la régulation de la survie cellulaire, la réponse aux facteurs de croissance et l'inhibition de la différenciation. Ceci permet un contrôle strict de l'auto-renouvellement des CSH (18) (19).

-la voie *Sonic Hedgehog* : les gènes de la famille *Hedgehog* interviennent surtout lors du développement embryonnaire mais il persiste à l'état adulte et participe à la régulation des CSH en utilisant la voie de signalisation BMP (Bone Morphogenetic Protein) (20).

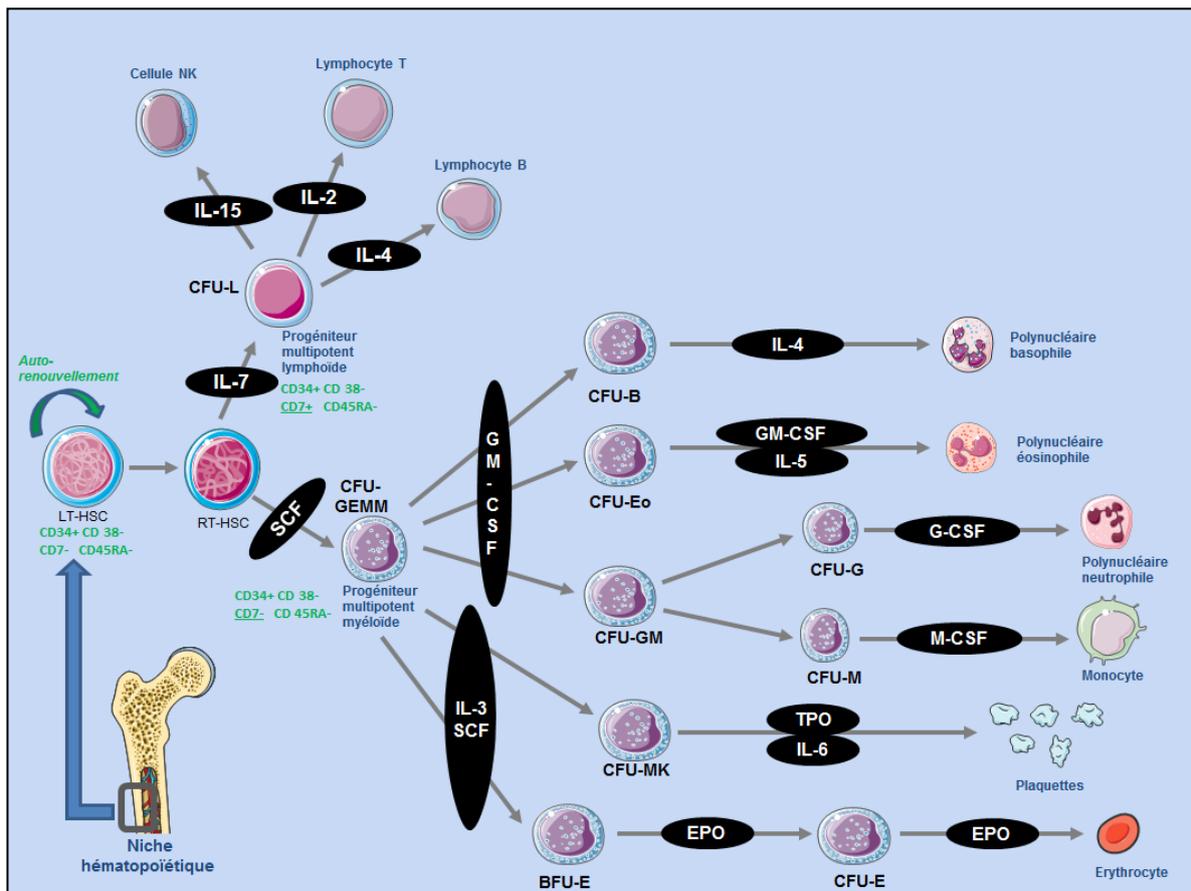


Figure 3 : Rôle des facteurs de croissance

- Les facteurs cellulaires et microenvironnement :

Le microenvironnement médullaire désigne l'ensemble formé par la matrice extracellulaire (collagène, fibronectine, laminine, protéoglycane), les cellules non hématopoïétiques de la moelle appelées cellules stromales issues des cellules souches mésenchymateuses (cellules fibroblastiques et myofibroblastiques, cellules endothéliales, ostéoclastes, ostéoblastes, adipocytes) et par les molécules qu'elles produisent (cytokines, molécules d'adhésion). Ce microenvironnement médullaire exerce le rôle de niche hématopoïétique et permet l'interaction de l'ensemble des cellules avec la CSH afin de réguler ses différentes propriétés. Il permet un équilibre complexe entre les phénomènes de survie et d'apoptose, de quiescence et de prolifération, d'auto-renouvellement et de différenciation.

Cette niche hématopoïétique exerce donc un rôle primordial dans la régulation de l'hématopoïèse afin que chaque cellule sanguine soit produite en quantité et en temps voulu.

Il existe deux types de niches hématopoïétiques :

- La niche ostéoblastique localisée à la surface des os à proximité de la moelle osseuse. Elle fait intervenir les ostéoblastes qui travaillent en tandem avec les ostéoclastes dans le processus d'ostéogenèse. Ces ostéoblastes ont été identifiés comme la principale source de sécrétion de CXCL12 qui permet le maintien des CSH dans la moelle osseuse. Ces CSH en présence des ostéoblastes sont quiescentes et contribuent au maintien de l'hématopoïèse sur une longue période.
- La niche vasculaire ou niche endothéliale située à côté de la zone vascularisée de l'os est formée par les cellules endothéliales des nombreux vaisseaux qui irriguent la moelle osseuse. A l'intérieur de cette niche endothéliale, de nombreuses cellules (réticulaires, périvasculaires stromales, cellules souches mésenchymateuses) s'associent aux sinusoides pour permettre la régulation des CSH. Cette niche représente plutôt un site de prolifération/auto-renouvellement et de différenciation des CSH.

- Mécanismes d'action de la niche hématopoïétique :

Cette niche hématopoïétique permet le maintien et la régulation de CSH et de ce fait, de l'hématopoïèse. Il existe différents types de régulation :

- Par les facteurs solubles ou membranaires synthétisés par les cellules stromales. Il s'agit de facteurs de croissance et de cytokines tels que le SCF (Stem Cell Factor) qui permet la prolifération et la différenciation des

cellules souches ou l'IL-6 qui assure le passage des CSH d'une phase de quiescence (G0) à une phase G1 du cycle cellulaire.

- Par les molécules d'adhésion (fibronectine, intégrine) pouvant être membranaires, extracellulaires ou incluses dans la matrice extracellulaire. Les CSH sont maintenues dans la moelle osseuse grâce aux interactions établies avec ces molécules d'adhésion. Cependant ces molécules servent également à la transmission de signaux modulant la survie, la prolifération et la différenciation cellulaire.

II) Ontogenèse leucémique : cellule souche cancéreuse

A. Définition

Les leucémies sont des maladies clonales et acquises de la CSH ou d'un précurseur déjà commis vers les lignées lymphoïdes ou myéloïdes. On parle alors de cellules souches leucémiques (CSL). Ces CSL présentent de nombreuses similitudes avec les CSH, notamment les propriétés d'auto-renouvellement, la quiescence, la capacité de différenciation, la résistance à l'apoptose induite par les agents de chimiothérapie et une interaction particulière avec le microenvironnement.

Ces CSL sont donc une population intrinsèquement résistante aux chimiothérapies dont le but est de tuer les cellules en cycle et par ailleurs elles sont situées dans des niches ce qui les rend difficilement accessibles aux traitements.

B. Caractéristiques des CSL

Phénotypiquement, les CSL sont, comme les CSH normales : CD34+CD38-HLA-DR-CD71- (21). Cependant, nous retrouvons une expression différente concernant certains marqueurs tels que le CD123 (22), le CLL-1 (23), le CD96 (24), le CD32 et CD25 (25), TIM-3 (26), le CD44 (27), le CD227 (28), le CD325 et CD202B (29), le CD184 (30), le CD91 (31), le CD47 (32) qui sont préférentiellement retrouvés sur les CSL.

Les CSL sont majoritairement quiescentes, contrairement aux blastes leucémiques, résistent aux agents de chimiothérapies grâce à l'expression de gènes de multi-résistances aux drogues tels que la glycoprotéine-P (33) et sont dotés d'une capacité d'auto-renouvellement.

C. Oncogène et leucémie

L'étude des mécanismes moléculaires aboutissant au phénotype leucémique a permis de mettre en évidence un processus de plusieurs étapes nécessitant la collaboration d'au moins deux évènements oncogéniques.

C'est au début des années 1970, grâce aux techniques de bandes chromosomiques en cytogénétique, que l'on a pu identifier chaque chromosome et ainsi caractériser la présence de remaniements chromosomiques dans les cellules leucémiques. Des études ont permis de montrer que 35% des cellules leucémiques ont un caryotype normal alors que 65% présentent un remaniement chromosomique le plus souvent unique (34). En effet, ces cellules leucémiques retrouvent en général des inversions intra chromosomiques ou des translocations résultant d'un échange réciproque de matériel génétique entre deux chromosomes. Ces anomalies sont présentes dans toutes les cellules leucémiques d'un même individu ce qui témoigne de l'origine clonale de la maladie. Leur caractère récurrent, voir systématique avec certains types d'hémopathies, évoquait une origine causale du processus de transformation. Une avancée a été franchie dans les années 1980 avec le gène *MYC* identifié comme la cible des translocations du lymphome de Burkitt, et localisé chez l'homme en 8q24 (35), mais également avec l'oncogène *ABL* lié à la translocation t(9;22) caractéristique de la leucémie myéloïde chronique et à l'origine de la formation du chromosome Philadelphie (36).

Une recherche systématique des altérations chromosomiques est donc réalisée dans les hémopathies malignes et un grand nombre d'inversion et translocation récurrentes ont été caractérisées au niveau moléculaire permettant de découvrir les oncogènes correspondants (37).

Deux types de gènes sont très souvent impliqués :

- Des facteurs de transcription qui jouent un rôle majeur dans l'hématopoïèse normale
- Des gènes à homéodomaine ou des gènes qui règlent l'expression de gènes homéotiques

Ces oncogènes peuvent bloquer la différenciation par plusieurs mécanismes : mutation de type perte de fonction, effet dominant négatif sur la copie résiduelle ou sur des facteurs transcriptionnels hétérologues, recrutement de complexes co-activateurs ou co-répresseurs de la transcription.

Les réarrangements chromosomiques peuvent conduire soit à la surexpression de protéines oncogéniques surtout retrouvée dans les LAL T soit à la production de protéine de fusion qui est l'anomalie la plus fréquente dans les LAL B et les leucémies myéloïdes (Tableau 1).

Tableau 1 : Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les LA

Type de gène	Translocation	Gènes affectés	Fonction	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	t(12;21)(p13;q22)	<i>ETV6</i> (12p13) <i>RUNX1</i>(21q22)	Facteur ETS Sous-unité du CBF ou CBF α fixant l'ADN (domaine runt)	LAL pro-B
	t(8;21)(q22;q22)	<i>RUNX1</i> (21q22) <i>RUNX1T1</i> (8q22)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM
	t(3;21)(q26;q22)	<i>AML1</i> (21q22) <i>EVI1</i> (3q26)	Sous-unité CBF α du CBF Protéine nucléaire à doigts de zinc	LAM secondaires
	Inv(16)(p13;q22)	<i>CBFβ</i> (16q22) <i>MYH11</i> (16p13)	Sous-unité CBF β du CBF Chaîne lourde des chaînes de myosine du muscle lisse	LAM à éosinophiles
	t(1;19)(q23;p13)	<i>TCF3</i> (19p13) <i>PBX1</i> (1q23)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à homéodomaine	LAL pré-B
	t(17;19)(q22;p13)	<i>TCF3</i> (19p13) <i>HLF</i> (17q22)	Facteur de transcription de type bHLH Facteur de transcription à <i>leucine zipper</i>	LAL pro-B

Tableau 1 (suite) : Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les LA

Type de gène	Translocation	Gènes affectés	Fonction	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	t(15;17)(q21;q12)	PML (15q21) RARα (17q12)	Protéine à doigts de zinc de type <i>ring</i> Récepteur α de l'acide rétinoïque	Leucémies aiguës promyélocytaires (LAP)
	t(11;17)(q23;q12)	ZBTB16 (11q23) RARα (17q12)	Protéine nucléaire à doigts de zinc Récepteur α de l'acide rétinoïque	Apparenté aux LAP
	t(5;17)(q35;q12)	NPM1 (5q35) RARα (17q12)	Nucléophosmine (protéine nucléolaire) Récepteur α de l'acide rétinoïque	Apparenté aux LAP
	t(17;17)(q11;q12)	STAT5B (17q11) RARα (17q12)	Facteur de transcription de la famille STAT Récepteur α de l'acide rétinoïque	Apparenté aux LAP
	t(4;11)(q21;q23)	MLL(11q23) AF4(4q21)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	Leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(6;11)(q27;q23)	MLL(11q23) AF6(6q27)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Fonction mal connue	LAM myélo-monocytaires et monoblastiques

Tableau 1 (suite) : Principaux réarrangements chromosomiques décrits dans les LA

Type de gène	Translocation	Gènes affectés	Fonction	Type de leucémie
Facteurs de transcription et régulateurs transcriptionnels	t(9;11)(p22;q23)	MLL(11q23) AF9 (9p22)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	LAM myélo-monocytaires et monoblastiques
	t(11;19)(q23;p13)	MLL(11q23) ENL(19p13)	Orthologue du gène <i>Trithorax</i> Activateur transcriptionnel	LAM, LAL B et leucémies bi-phénotypiques de l'enfant
	t(5;11)(q35;p15.5)	NUP98(11p15.5) NSD1(5q35)	Nucléoporine Récepteur nucléaire	LAM
	t(6;9)(p23;q34)	DEK (6p23) NUP214(9q34)	Facteur de transcription Protéine associée au pore nucléaire	LAM à basophiles
	t(1;22)(p13;q13)	RBM15 (1p13) MKL1 (22q13)	Protéine nucléaire de la famille Spen Co-activateur du facteur SRF	LA mégacaryocytiques de l'enfant
	t(10;11)(p13;q14)	PICALM(10p13) MLLT10(11q14)	Rôle dans l'intégration de signaux Facteur de transcription	LAM

III) Leucémies aiguës myéloïdes:

A. Généralités

Les leucémies aiguës sont caractérisées par une expansion clonale dans la moelle osseuse de précurseurs des cellules sanguines bloqués à un stade précoce de la différenciation, les blastes, avec un déficit en cellules matures (insuffisance médullaire) dû au pouvoir proliférant très important de cette population qui va inhiber l'hématopoïèse normale.

Le caractère aigu est défini par l'apparition rapide des signes cliniques ou biologiques, en principe moins de quelques semaines et le caractère rapidement létal des troubles viscéraux engendrés, ceci en l'absence d'un traitement efficace.

On distingue deux grands types : les leucémies aiguës myéloïde (LAM) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).

B. Epidémiologie

Il s'agit d'une affection rare représentant entre 10 et 15% des hémopathies malignes avec un taux d'incidence annuelle standardisé à la population mondiale inférieur à 6 cas pour 100 000 habitants.

Selon le type de leucémie, les populations les plus touchées sont différentes.

- Les LAM représentent 80% des leucémies aiguës de l'adulte et 20% des LA de l'enfant. Leur incidence est estimée par le réseau FRANCIM à 4,7 par an pour 100 000 habitants. On estime qu'en 2012 en France, il y a eu environ 2000 nouveaux cas (1470 cas chez les hommes et 1514 chez les femmes). L'âge médian de survenue est de 65 ans. Il existe un pic de fréquence chez les enfants de moins de 5 ans (8 cas pour 100 000 habitants).
- Les LAL représentent quant à elles 80% des leucémies de l'enfant. Leur incidence est estimée à 1,5 par an pour 100 000 habitants. Le pic d'incidence se situe entre 2 et 5 ans (75% avant 6 ans). Environ 85% des LAL sont de phénotypes B (38).

C. Etiologies des LAM

La plupart du temps, les étiologies sont inconnues mais de nombreuses études ont permis de mettre en évidence des facteurs favorisant la survenue des LA. Nous pouvons distinguer les facteurs de risques pour les LAM :

- L'âge avec un pic moyen à 66 ans et une fréquence rare en dessous de 45 ans

- Une exposition à de fortes doses de radiations (39)
- L'exposition à des agents chimiques : benzène et solvants organiques dont le rôle dans l'apparition des hémopathies malignes a été très étudié (40) (41).
En France, les leucémies survenant dans le cadre d'une exposition professionnelle au benzène peuvent être prises en charge comme maladie professionnelle.
- Le tabagisme actif et passif
- Les chimiothérapies anticancéreuses responsables de 10% des LAM avec les agents alkylants, dans un délai de 5 à 7 ans après l'administration et survenant le plus souvent après une phase de myélodysplasie ; les inhibiteurs de topo-isomérase II pouvant induire des LAM avec anomalies équilibrées comme inv(16)/t(16;16), t(15;17) ou des réarrangements du gène *MLL*.
- Les syndromes génétiques : ils peuvent augmenter, en particulier dans l'enfance, le risque de LAM :
 - ❖ le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome de Shwachman-Diamond dus à des anomalies génétiques constitutionnelles
 - ❖ l'anémie de Fanconi
 - ❖ la neurofibromatose de type 1 (maladie de von Recklinghausen)
 - ❖ le syndrome de Noonan
 - ❖ Familial Platelet Disorder (mutations de *RUNX1*) (42)

D. Signes cliniques

La symptomatologie clinique des LAM résulte de deux conséquences de la maladie : l'insuffisance médullaire et la prolifération des blastes à l'origine du syndrome tumoral.

Il n'existe pas de signe caractéristique et la présentation est variable allant de la forme peu symptomatique à la forme d'emblée grave nécessitant l'hospitalisation urgente en milieu spécialisé.

1) Signes liés à l'insuffisance médullaire :

Nous retrouvons :

- Les signes en rapport avec une anémie, d'installation rapide et souvent mal tolérée (fatigue, essoufflement, pâleur, vertiges)

- Les signes infectieux en rapport avec la neutropénie, classiquement de la sphère ORL (allant jusqu'à l'angine ulcéro-nécrotique) mais souvent sans spécificité clinique (fièvre résistante aux antibiotiques, sepsis grave)
- Le syndrome hémorragique, cutané ou muqueux, en rapport avec la thrombopénie aggravé parfois par une Coagulation Intra-Vasculaire Disséminée (CIVD).

Les trois signes biologiques associés : anémie, neutropénie, thrombopénie retrouvés sur l'héogramme permettent donc d'expliquer ces signes d'appels.

2) Signes tumoraux

Ils se traduisent par la présence d'une hypertrophie des organes hématopoïétiques (adénopathies et splénomégalie) ou une hépatomégalie.

Il existe aussi des localisations particulières, d'emblée ou au cours de l'évolution :

- Localisations méningées à l'origine de céphalées, de paralysie des nerfs périphériques
- Localisations cutanées sous forme de leucémides dans les LA monoblastiques
- Hypertrophie gingivale dans les leucémies monoblastiques

3) Signes cliniques de gravité

Il s'agit d'urgences thérapeutiques :

- Le syndrome hémorragique diffus et grave par coagulopathie de consommation. Il est dû à la libération par les blastes de substances entraînant un syndrome de coagulation intravasculaire disséminé et/ou une fibrinolyse. Cette complication est surtout retrouvée dans les LAM promyélocytaires (LAM3) ou dans les LAM très hyperleucocytaires.
La CIVD aggrave le risque hémorragique du fait de la thrombopénie.
- La détresse respiratoire due au phénomène de leucostase dans les capillaires pulmonaires, conséquence d'une hyperleucocytose majeure ($>100\ 000/\text{mm}^3$). Des signes d'hypoxie sont également retrouvés au niveau cérébral par des troubles de conscience voire un coma ou des convulsions.

4) Orientation lymphoïde ou myéloïde de la LA selon la présentation clinique

Les LAL touchent plus souvent les enfants et sont fréquemment dominées par le syndrome tumoral. Il faut être vigilant sur l'existence de signes neurologiques

(envahissement méningé). Les signes d'insuffisance médullaire sont souvent associés, notamment un syndrome anémique.

Les LAM se retrouvent plus souvent chez l'adulte avec un syndrome d'insuffisance médullaire au premier plan. Il n'existe habituellement pas d'adénopathie, la splénomégalie est possible. Certains signes cliniques sont assez caractéristiques : hypertrophie gingivale, infiltrats cutanés dans les LA à composante monocyttaire.

E. Diagnostic biologique

1) Hémogramme

Il est toujours anormal et constitue l'examen d'orientation majeur du diagnostic. Il traduit les conséquences de l'insuffisance médullaire et de la prolifération blastique.

Tout d'abord, concernant l'insuffisance médullaire, l'anémie existe de façon quasi constante (90% des cas) et parfois sévère. Elle est habituellement normochrome normocytaire ou modérément macrocytaire (LAM avec dysmyélopoïèse) et arégénérative.

La thrombopénie est très fréquente parfois inférieure à 10G/L qui entraîne un risque d'hémorragies spontanées.

La leucocytose est très variable, pouvant aller de la leucopénie (<3G/L) à l'hyperleucocytose majeure (>100G/L). La neutropénie est fréquente.

La lecture du frottis sanguin après coloration au MGG (May Grünwald Giemsa) permet de mettre en évidence la présence de blastes circulants pouvant représenter l'essentiel des leucocytes (dans les formes hyperleucocytaires), mais ils peuvent aussi être absents ou très rares (dans les formes leucopéniques).

L'aspect morphologique de ces blastes varie d'une LA à une autre et leur identification est parfois difficile.

2) Ponction médullaire

Elle permet de réaliser un examen cytologique (le myélogramme) et diverses techniques complémentaires. Elle est systématique en cas de suspicion de LA.

✓ Le myélogramme

Il s'agit de l'examen clé du diagnostic, indispensable même lors de la présence de blastes circulants. Il va permettre d'affirmer le diagnostic et de typer la leucémie d'un point de vue morphologique.

La moelle est le plus souvent richement cellulaire, pauvre en mégacaryocytes, et contient, par définition, au moins 20% de blastes (selon les critères de l'OMS).

Différents critères morphologiques des blastes vont permettre la séparation des LA en 2 grands groupes :

- LA lymphoblastiques : les blastes sont de taille petite ou moyenne et le cytoplasme est peu abondant
- LA myéloïdes : les blastes contiennent souvent quelques granulations et parfois 1 ou plusieurs bâtonnets rouges (azurophiles) appelés corps d'Auer.

L'étude cytochimique des blastes permet de mettre en évidence des activités enzymatiques spécifiques, et notamment la myéloperoxydase dont la positivité dans plus de 3% des blastes permet d'affirmer la nature myéloïde de la LA.

La combinaison des études morphologiques et cytochimiques des frottis médullaires permet de classer les LAM parmi l'une des 8 catégories (M0 à M7) de la classification FAB (French American British).

Pour exemple, l'activité myéloperoxydase est négative dans les LAM0, LAM7 et quelques LAM5.

Les estérases non spécifiques (NASDA) sont faiblement positives dans les myéloblastes, positives et inhibées par le fluorure de sodium dans les monoblastes.

Le myélogramme doit être complété par un immunophénotypage, un caryotype des cellules leucémiques et des techniques de biologie moléculaire.

✓ L'immunophénotypage

Il s'agit d'une technique essentielle dans la démarche diagnostique des leucémies aiguës, en complément de la cytologie, au vu de sa rapidité et de son accessibilité.

Elle repose sur l'utilisation de la cytométrie en flux qui permet d'étudier à haut débit, par immunofluorescence, toute préparation cellulaire en suspension. Les antigènes exprimés par une cellule (appelés « CD » : *cluster of differentiation*) permettent de la caractériser à l'aide d'anticorps couplés à des fluorochromes.

Cet immunophénotypage permet :

- De déterminer l'appartenance à une lignée cellulaire précise, et de préciser le niveau de différenciation pour identifier et/ou préciser le diagnostic des formes de LA (selon la classification WHO 2016 des LA)
- Un rôle pronostique par la mise en évidence d'un phénotype corrélé à des anomalies cytogénétiques et moléculaires
- D'identifier la présence de marqueurs au niveau des cellules blastiques en vue de l'utilisation d'une thérapeutique ciblée par des anticorps monoclonaux
- De détecter le profil antigénique aberrant des blastes intéressants pour suivre la maladie résiduelle

Concernant les LAM, l'immunophénotypage reste indispensable pour le diagnostic des LAM0 exprimant des marqueurs myéloïdes sans activité myélo-péroxydase en cytochimie et des LAM7.

Enfin l'immunophénotypage est utilisé dans la recherche des leucémies aiguës de lignée ambiguë. Il s'agit des leucémies aiguës indifférenciées dépourvues d'antigène spécifique de lignée et des leucémies aiguës de phénotype mixte aussi appelées leucémies biphénotypiques caractérisées par l'expression concomitante de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes (B ou T) par les blastes.

Globalement ces LA représentent moins de 2% du total des LA. La classification OMS permet d'individualiser plusieurs sous-catégories.

Le panel de base utilisé pour l'immunophénotypage des LA comporte :

- Des marqueurs d'immaturité : HLA-DR, CD34, CD38
- Des marqueurs associés à la lignée lymphoïde T : CD2, CD3, CD4, CD5, CD7
- Des marqueurs associés à la lignée lymphoïde B : CD10, CD19, CD20, CD22
- Des marqueurs associés aux cellules NL : CD56
- Des marqueurs associés à la lignée myéloïdes : CD33, CD13, CD14, CD15, CD117, CD11b, CD65.

✓ Le caryotype des cellules leucémiques

Le caryotype médullaire permet l'obtention et l'interprétation des chromosomes en métaphase afin de réaliser le diagnostic des anomalies chromosomiques.

Ces anomalies peuvent être des anomalies de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs *loci*) ou de réparation (cassures chromosomiques).

Dans les LAM, ces anomalies cytogénétiques sont acquises et non aléatoires. Elles peuvent être spécifiques, comme dans les LAM3 avec la translocation t(15;17), ou associées préférentiellement à un type de LAM comme les LAM2 avec la translocation t(8;21).

Il existe des anomalies primaires présentes dans toutes les cellules du clone leucémique et des anomalies secondaires surajoutées et présentes dans un ou plusieurs sous-clones.

La détection de ces anomalies chromosomiques acquises permet une aide à la prise en charge diagnostique et/ou pronostique des patients atteints de LAM.

Cette méthode d'analyse du caryotype consiste en la mise en culture d'un prélèvement de moelle, après numération des cellules à 37°C pendant 24-48h. Suivi d'un blocage des cellules en métaphase obtenu par l'adjonction d'un poison du fuseau mitotique (le plus souvent la colchicine) en fin de culture puis d'un choc hypotonique pour une dispersion optimale des chromosomes et de plusieurs fixations avant étalement sur lame.

Enfin le marquage des chromosomes est réalisé pour permettre l'identification et l'analyse des chromosomes donnant respectivement des bandes R (Reverse) et des bandes G (Giemsa).

Pour un diagnostic de LAM, il est recommandé (nécessaire en l'absence d'anomalie détectée) d'analyser au moins 20 mitoses, même s'il est admis que 15 mitoses peuvent être suffisantes en cas d'anomalie clonale.

Une anomalie est considérée clonale si 2 mitoses sont porteuses de la même anomalie, en cas de remaniement de structure ou de gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte. La formule chromosomique est écrite selon la nomenclature internationale (ISCN 2009 : *International System for Human Nomenclature 2009*).

L'analyse chromosomique conventionnelle (le caryotype) peut être complétée par une analyse de cytogénétique moléculaire. La plus utilisée est l'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) qui permet de confirmer ou non la présence de certains remaniements.

Elle consiste en l'utilisation de sondes marquées directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes.

Les anomalies cytogénétiques clonales acquises sont observées chez 50 à 60% des patients présentant une LAM *de novo*, 59% chez les enfants et 52% chez les adultes.

✓ Biologie moléculaire

La biologie moléculaire dans les LAM prend une place de plus en plus importante dans la stratégie diagnostique et surtout pronostique. Sa sensibilité élevée et les possibilités de standardisation en font un outil de choix dans l'évaluation diagnostique et pronostique des LA, si bien que de nombreuses techniques de biologie moléculaire ont aujourd'hui leur place dans la plupart des protocoles en vigueur.

Elles permettent d'étudier certaines altérations géniques rencontrées de manière récurrente dans les LAM et représentent également une alternative pour la recherche de certaines anomalies lorsque le caryotype est un échec (exemple : fusion de *PML-RAR α* ou *AML1-ETO*).

30 à 40% des leucémies aiguës présentent une translocation équilibrée induisant classiquement la fusion de deux gènes avec production d'un ARN chimérique dont la mise en évidence constitue un argument diagnostique et permet de définir certaines entités de LA au pronostic bien établi avec une prise en charge thérapeutique la plus adaptée possible.

Par ailleurs de nombreuses altérations ont pu être identifiées et trouvent particulièrement leur place en absence d'anomalie cytogénétique récurrente.

Concernant les LAM, certains gènes tels que *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* sont fréquemment mutés et constituent des marqueurs moléculaires décisionnels pour la prise en charge thérapeutique du patient.

F. Classification des LAM

1) Classification FAB (franco-américano-britannique)

Cette classification a été créée en 1976 par un groupe international de chercheurs français, américains et britanniques et révisée en 1985 (43).

Elle permet de classer les leucémies aiguës myéloïdes selon des critères morphologiques et cytochimiques des anomalies du sang et de la moelle osseuse.

Il faut plus de 30% de blastes médullaires pour poser le diagnostic de leucémie aiguë myéloïde.

La classification FAB distingue 8 variétés de LAM définies selon leur différenciation et leur degré de maturation granuleuse (Tableau 2).

Tableau 2 : Classification FAB (44)

FAB	Morphologie et caractéristiques	Cytochimie			Immuno-phénotype ^{a,b}	Fréquence
		MPO	EST	PAS		
M0	« Leucémie aiguë myéloblastique, peu différenciée », blastes immatures, immunophénotypage nécessaire	< 3 %	-	-	Myéloïde	< 2 %
M1	« Leucémie aiguë myéloblastique sans maturation » Blastes immatures, immunophénotypage nécessaire	3-10 %	-	-		20 %
M2	« Leucémie aiguë myéloblastique avec maturation » 3-20 % de promyélocytes, souvent avec des corps d'Auer Sous-type « M2Baso » : avec basophilie	> 30 %	-	-		30 % < 2 %
M3	« Leucémie aiguë promyélocytaire » (LAP) > 30 % de promyélocytes, corps d'Auer souvent en amas, « fagots » Sous-type « M3v » Variante microgranulaire : noyaux lobulés ou réniformes, des corps d'Auer, parfois des granulations azurophiles, morphologie semblable à celle des blastes monocytoides. Analyses cytogénétique et génétique moléculaire nécessaires	+++	-	-/+	HLA-DR-	10 %
M4	« Leucémie aiguë myélomonocytaire ». Semblable à M2, toutefois fraction pro- monocytaire > 20 % Sous-type « M4Eo » : ≤ 30 % d'éosinophiles anormaux (noyaux type monocyte, granules éosinophiles ou basophiles immatures). Analyses cyto-/moléculaire génétiques nécessaires	+	+	-		30 %
M5	« Leucémie aiguë monoblastique » ≥ 80 % des cellules médullaires non érythroïdes sont des cellules à type de monocyte. Sous-type « M5a » monoblastes immatures, monoblastes « M5b » avec maturation, noyau cérébriforme.	+/-	+	-/+		10 %
M6	« Érythroleucémie aiguë » (Di Guglielmo) ≥ 50 % des cellules médullaires nucléées sont des érythroïdes, ≥ 30 % des cellules non érythroïdes sont des blastes	-	-	+/-	Glycophorine+	< 5 %
M7	« Leucémie aiguë mégacaryoblastique » Population de blastes hétérogènes, mégacaryocytes anormaux. Souvent « ponction sèche », immunophénotypage nécessaire dans ce cas	-	-	+/-	CD61+/ CD41+	< 5 %

^a Dans tous les types de LAM : ≥ 2 des marqueurs suivants sont positifs : myéloperoxydase, CD13, CD33, CD65, CD117
^b La classification FAB est basée sur des critères morphologiques et cytochimiques. À quelques exceptions près (M0, M7) il n'y a pas de forte corrélation entre la classification FAB et l'immuno-phénotype. Les marqueurs listés correspondent aux associations fréquentes. Phénotypage immunologique ► Chap. 2.5
MPO myéloperoxydase, EST estérase non spécifique (naphtyle acétate estérase), PAS réaction acide périodique-Schiff

2) Classification OMS :

En 2001, l'OMS en collaboration avec l'association européenne des hémopathies a publié cette classification qui a permis de compléter la classification FAB en intégrant les informations cytogénétiques aux informations morphologiques, cytochimiques, immunophénotypiques et cliniques. Ceci a permis de définir plusieurs entités de LAM ayant une signification pronostique distincte.

Cette classification a été révisée en 2008 puis en 2016 afin d'y intégrer les nouveaux marqueurs moléculaires, elle divise les LAM en 7 catégories (4 principales et 3 annexes) (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification OMS 2016 des leucémies aiguës myéloblastiques et hémopathies apparentées(45)

Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

AML with recurrent genetic abnormalities

- AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1
- AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22);CBFB-MYH11
- APL with PML-RARA
- AML with t(9;11)(p21.3;q23.3);MLLT3-KMT2A
- AML with t(6;9)(p23;q34.1);DEK-NUP214
- AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); GATA2, MECOM
- AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3);RBM15-MKL1
- Provisional entity: AML with BCR-ABL1
- AML with mutated NPM1
- AML with biallelic mutations of CEBPA
- Provisional entity: AML with mutated RUNX1

AML with myelodysplasia-related changes

Therapy-related myeloid neoplasms

AML, NOS

- AML with minimal differentiation
- AML without maturation
- AML with maturation
- Acute myelomonocytic leukemia
- Acute monoblastic/monocytic leukemia
- Pure erythroid leukemia
- Acute megakaryoblastic leukemia
- Acute basophilic leukemia
- Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma

Myeloid proliferations related to Down syndrome

Transient abnormal myelopoiesis (TAM)
Myeloid leukemia associated with Down syndrome

Acute leukemias of ambiguous lineage

Acute undifferentiated leukemia
Mixed phenotype acute leukemia (MPAL) with t(9;22)(q34.1;q11.2); BCR-ABL1
MPAL with t(v;11q23.3); KMT2A rearranged
MPAL, B/myeloid, NOS
MPAL, T/myeloid, NOS

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma

B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, NOS
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with recurrent genetic abnormalities
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2);BCR-ABL1
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(v;11q23.3);KMT2A rearranged
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); ETV6-RUNX1
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hyperdiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with hypodiploidy
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.3) IL3-IGH
B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3);TCF3-PBX1
Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma, BCR-ABL1-like
Provisional entity: B-lymphoblastic leukemia/lymphoma with iAMP21

T-lymphoblastic leukemia/lymphoma

Provisional entity: Early T-cell precursor lymphoblastic leukemia

Provisional entity: Natural killer (NK) cell lymphoblastic leukemia/lymphoma

Selon l’OMS, le seuil de blastes dans la moelle définissant une LAM est de 20%. La première catégorie regroupe les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes. Il s’agit des LAM avec une translocation t(8;21) impliquant une fusion des gènes *AML1* et *ETO*, des LAM avec une inv(16) ou une translocation t(16;16) impliquant la fusion des gènes *CBFβ* et *MYH11*, des LAM avec une translocation t(15;17) impliquant la fusion des gènes *PML* et *RARα*. Pour ces 3 entités, la présence seule de ces anomalies décrites est suffisante pour poser le diagnostic de LAM, quel que soit le pourcentage de blastes dans la moelle osseuse. Nous retrouvons également dans cette première catégorie : les LAM avec translocation t(9;11), les LAM avec translocation t(6;9), les LAM avec inversion 3 ou translocation t(3;3) et les LAM avec translocation t(1;22). Concernant ces 4 entités, le diagnostic de LAM ne peut être posé que si le pourcentage de blastes médullaires est supérieur à 20%.

La révision de la classification en 2016 a mis en place 2 entités bien distinctes que sont les LAM avec mutation biallélique de *CEBPA* et les LAM avec mutations de *NPM1*.

Pour compléter cette catégorie, deux entités provisoires ont été incluses : les LAM avec transcrite *BCR-ABL1* et les LAM avec mutations de *RUNX1*.

La deuxième catégorie regroupe les LAM avec des anomalies de type myélodysplasie. Il s'agit des LAM secondaires à un SMD, un SMP/SMD, les LAM avec des anomalies cytogénétiques spécifiques des SMD et les LAM présentant une dysplasie supérieure à 50% des cellules d'au moins 2 lignées hématopoïétiques.

La troisième catégorie regroupe les LAM post-chimiothérapie, SMD et SMD/SMP liées aux traitements, c'est-à-dire survenant après un traitement préalable par chimiothérapie, radiothérapie, immunosuppresseurs administré pour une maladie préalable, cancéreuse (90% des cas) ou non (10% des cas).

Elle représente environ 20% des LAM et SMD dont 75% sont dus aux traitements alkylants ou radiothérapie et 25% sont dus aux inhibiteurs de topoisomérase 2.

La quatrième catégorie regroupe les LAM sans spécificités particulières. Il s'agit des LAM non incluses dans les autres catégories qui représentent 25 à 30% de l'ensemble des LAM. Il s'agit des LAM de la classification FAB auxquelles se sont ajoutées les LAM avec différenciation basophile et les LAM avec myélofibrose.

Trois catégories annexes se sont greffées. Il s'agit des sarcomes granulocytaires, les proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle (réaction leucémoïde transitoire, LAM associées à la trisomie 21 constitutionnelle) et enfin la tumeur blastique plasmocytoïde dendritique (caractérisée par son immunophénotype CD4+CD56+).

G. Facteurs pronostiques des LAM

1) Facteurs préthérapeutiques

- Age : l'âge est un pronostic défavorable. La tolérance à la chimiothérapie est inférieure, notamment due à une diminution de la clairance des drogues (46) et les LAM des sujets âgés sont souvent associées à des caractéristiques clinico-biologiques péjoratives : fréquence de précession par un SMD, expression du gène *MDR1* et caryotypes défavorables (anomalies des chromosomes 5 et/ou 7 et caryotypes complexes).

Par ailleurs, environ 50% des patients âgés (c'est-à-dire ayant plus de 60 ans) développent une LAM avec anomalie cytogénétique (47) dont la

présence en faveur d'un pronostic favorable est rare, à l'opposé des sujets jeunes (48).

Les patients âgés de plus de 65 ans ont des taux de survie à cinq ans inférieurs à 10% (49).

Ces patients présentent également un *performance status* élevé (selon l'échelle de Zubrod) et des comorbidités plus fréquentes (hépatiques, cardiaques, rénales) qui influencent sur une mortalité précoce (50).

- Taux de leucocytes initial : L'hyperleucocytose au diagnostic est associée à un taux de mortalité plus élevé. En effet, un nombre important de leucocytes sanguins (>100 G/L) entraîne un risque élevé de leucostase au niveau du système nerveux central et/ou des poumons.

De plus, les patients avec un taux initial de leucocytes supérieur à 30 G/L ont une durée de rémission complète significativement réduite et un risque de rechute accru (51).

- LAM secondaires regroupent les LAM liées au traitement (t-AML) et les LAM avec des anomalies de types myélodysplasie: Les résultats de la chimiothérapie intensive sont moins bons dans les LAM précédées par une phase de SMD que dans les LAM *de novo* puisque les taux de rémission complète sont de 40 à 60 % et que seul environ 10 % des patients obtiennent une rémission prolongée. L'allogreffe reste le seul traitement véritablement curatif.

En cas de LAM induite par la chimiothérapie (t-AML), après utilisation prolongée d'agents alkylants, la réponse à la chimiothérapie est mauvaise et la survie est généralement courte (médiane d'environ 8 mois). La réponse à la chimiothérapie, en cas de LAM chimio-induites après utilisation d'inhibiteurs de topo-isomérase II, est similaire à celle des LAM *de novo* ayant les mêmes anomalies cytogénétiques : favorable si inv(16), t(8;21), t(15;17) ; variable si anomalies en 11q23, défavorable si t(8;16).

- Cytogénétique : Les anomalies cytogénétiques représentent le principal facteur pronostique prédictif des chances d'obtenir une rémission complète mais aussi une rechute (52) (53). Elles sont présentes dans 50 à 60% des LAM de l'adulte. La recherche de ces anomalies cytogénétiques est indispensable au diagnostic car la classification OMS des LAM utilise les données cytogénétiques qui ont un caractère pronostique. Ces anomalies clonales acquises détectées dans les cellules blastiques comportent des pertes ou des gains de chromosomes, des translocations chromosomiques aboutissant à la création de gènes de fusion ou à la dérégulation de l'expression de gènes, des délétions (del) ou une inactivation fonctionnelle de gènes suppresseurs de tumeur.

Nous retrouvons :

- Les LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes qui présentent un pronostic favorable telles que t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16) et l'anomalie en 11q23 sur le gène *MLL* pour 25-30% des patients. De plus, le pronostic est médiocre pour les anomalies de *MLL* sauf si il y a présence d'une translocation en t(9;11) où le pronostic est intermédiaire.
- Les LAM avec délétion partielle ou complète des chromosomes 5 ou 7, ou la présence d'anomalies cytogénétiques complexes (c'est-à-dire ≥ 3 anomalies) retrouvées dans 20-25% des patients sont de mauvais pronostic. Ces anomalies sont surtout présentes dans les LAM avec anomalies liées aux myélodysplasie et LAM chimio-induites.
- Les LAM avec anomalies cytogénétiques diverses représentant 10-15% des patients.
- Les LAM à caryotype normal pour 45% des patients (54). Dans ce cas, il faut étudier le niveau d'expression ou l'état mutationnel de certains gènes.

Ainsi les patients sont classés en 3 groupes de risque (55) (56) selon la classification ELN de 2016 :

Catégories	Anomalies génétiques
Favorable	<ul style="list-style-type: none"> ✓ t(8;21)(q22;q22) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> ✓ inv(16)(p13.1q22) ; <i>CBFβ-MYH11</i> ✓ Mutation de <i>NPM1</i> sans <i>FLT3-ITD</i> ✓ Mutation biallélique de <i>CEBPA</i>
Intermédiaire-I	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Mutation de <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i> ✓ <i>NPM1</i> non muté et <i>FLT3-ITD</i> ✓ <i>NPM1</i> non muté sans <i>FLT3-ITD</i>
Intermédiaire-II	<ul style="list-style-type: none"> ✓ t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A</i> ✓ Anomalies cytogénétiques non classées comme favorable ou défavorable
Défavorable	<ul style="list-style-type: none"> ✓ inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>GATA2</i>, <i>MECOM(EVI1)</i> ✓ t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> ✓ t(v;11q23); réarrangement de <i>KMT2A</i> ✓ Caryotype complexe (≥3), -5 ou del(5q); -7; abn(17p) ✓ Mutation de TP53 ✓ Mutation de <i>RUNX1</i> ✓ Mutation de <i>ASXL1</i>

- Résistance multidrogue *MDR1* : La Gp-170 (ou P-glycoprotéine PGP) codée par le gène *MDR1* est une protéine transmembranaire d'efflux qui diminue la concentration intracellulaire des agents anticancéreux réduisant ainsi leur activité antitumorale. Cette résistance conférée par la PGP est multidrogue car elle touche plusieurs classes d'anticancéreux tels que les vinca-alcaloïdes, les anthracyclines et dérivés et les taxanes. Ainsi la présence de blastes de phénotype MDR est corrélée à des taux de rémission complète significativement inférieurs et à un risque de rechute significativement supérieur.
- Biologie moléculaire : Concernant les anomalies moléculaires, elles vont permettre d'identifier plus précisément le pronostic de la pathologie notamment dans le groupe des patients avec une LAM et un caryotype normal (57). Ce groupe fait partie de la catégorie de risque cytogénétique intermédiaire. En quelques années, le nombre de mutations recherchées et ayant un impact sur la prise en charge thérapeutique des patients a évolué.

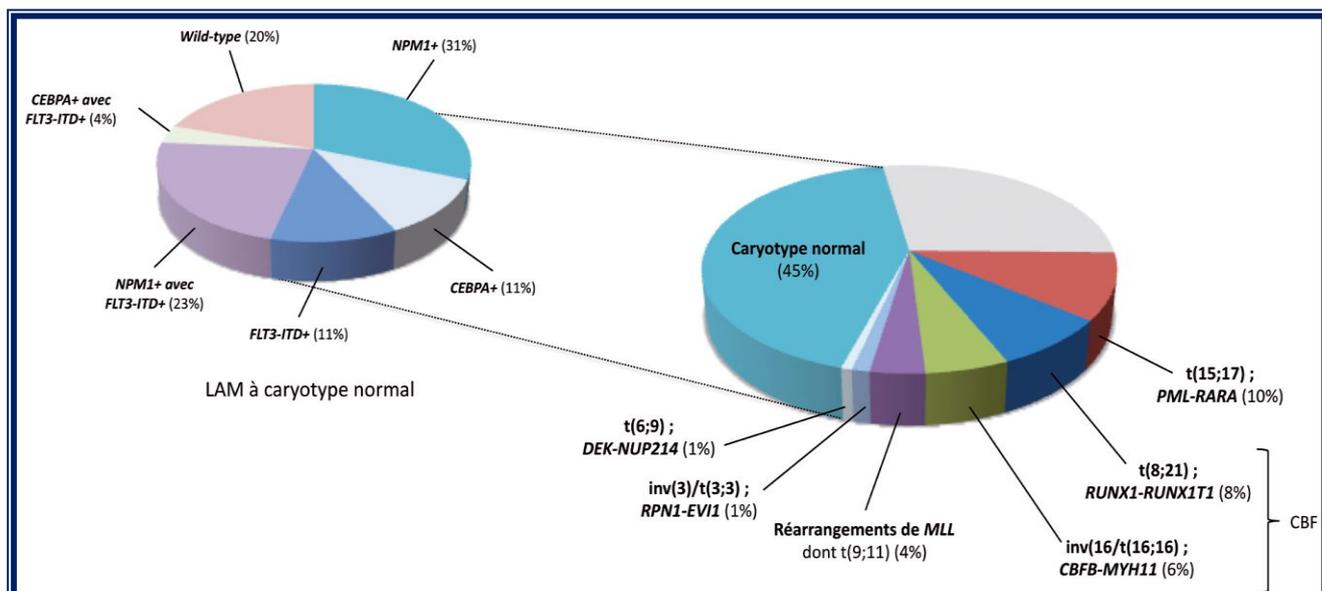


Figure 4 : Anomalies moléculaires des LAM de l'adulte

Les mutations recherchées dans les LAM les plus fréquemment retrouvées et ayant un intérêt particulier sont les mutations de *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* (Figure 4), les mutations de gènes de l'épigénétique et d'autres mutations telles que *RUNX1* et *WT1*.

- ✓ Les mutations de *NPM1*, *CEBPA* et *FLT3* sont particulièrement intéressantes dans les LAM et leur mise en évidence conditionne la stratégie thérapeutique. Les entités « LAM avec mutation de *NPM1* » et « LAM avec mutation biallélique de *CEBPA* » constituent des entités à part entière dans la révision de la classification OMS de 2016. Les mutations de *FLT3*, du fait de leur association possible avec les mutations de *NPM1* et *CEBPA*, ne sont pour l'instant pas considérées comme des entités distinctes.

NPM1: Le gène de la nucléophosmine *NPM1*, localisé en 5q35, code pour une phosphoprotéine ubiquitaire de poids moléculaire compris en 35 et 40kDa. Cette protéine *NPM1* exerce un rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme mais avec une localisation nucléolaire préférentielle. Elle présente diverses fonctions : un rôle oncogène et suppresseur de tumeurs selon le niveau d'expression du gène ou la localisation subcellulaire de la protéine. Elle permet également l'assemblage et le transport des particules préribosomales à travers la membrane nucléaire, la stabilisation de p53, la régulation de l'ADN polymérase α et la duplication des centrosomes.

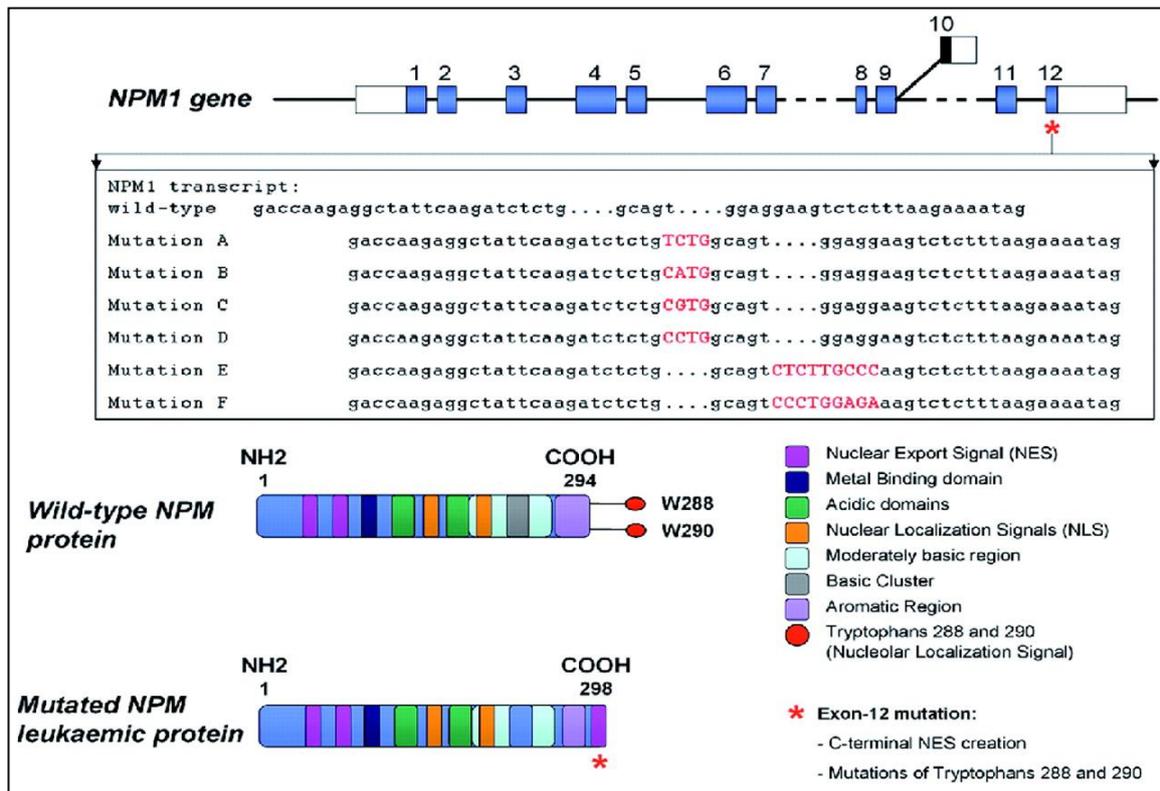


Figure 5 : Structure du gène *NPM1*

Le gène *NPM1* est constitué de 12 exons (Figure 5). Les mutations sont localisées dans cet exon et dans 95% des cas il s'agit d'une insertion de 4 paires de base en position 960. Elles sont à l'origine d'un décalage du cadre de lecture avec modification C-terminale de la protéine qui se traduit par la création d'un signal d'export nucléaire (NES) conduisant à sa délocalisation cytoplasmique. Celle-ci est probablement critique pour le rôle de *NPM1* dans la leucémogénèse. La mutation la plus fréquente est la mutation de type A avec une duplication TCTG représentant 70-80% des cas chez l'adulte suivie des mutations de type B avec duplication CATG et type D avec duplication CCTG représentant à elles deux 15-20% des cas (58).

Il existe également une quarantaine de variants mutationnels de *NPM1* (59). Les mutations de *NPM1* sont retrouvées préférentiellement dans 35% des LAM *de novo* de l'adulte et plus particulièrement dans 50% des LAM à caryotype normal. Elles sont rares dans les LAM de l'enfant (2-6% des cas) et absentes dans les LAM secondaires.

Les mutations de *NPM1* sont corrélées de façon positive avec les mutations de *FLT3* (*ITD*, *TKD*) et représentent 40% des LAM mutées *NPM1*. La présence d'une mutation de *NPM1*, dans une LAM à caryotype normal en l'absence de *FLT3-ITD*, est de pronostic favorable (Figure 6). Ces patients ont une survie de 60% à 5 ans comparable aux patients du groupe Core

Binding Factor et ne justifie pas d'un recours à l'allogreffe de CSH en première rémission complète.

La coexistence des mutations *NPM1* et *CEBPA* est quant à elle inhabituelle. Les mutations de *NPM1* sont relativement stables au cours de l'évolution de la maladie, ce qui en fait des marqueurs de choix pour le suivi de la maladie résiduelle.

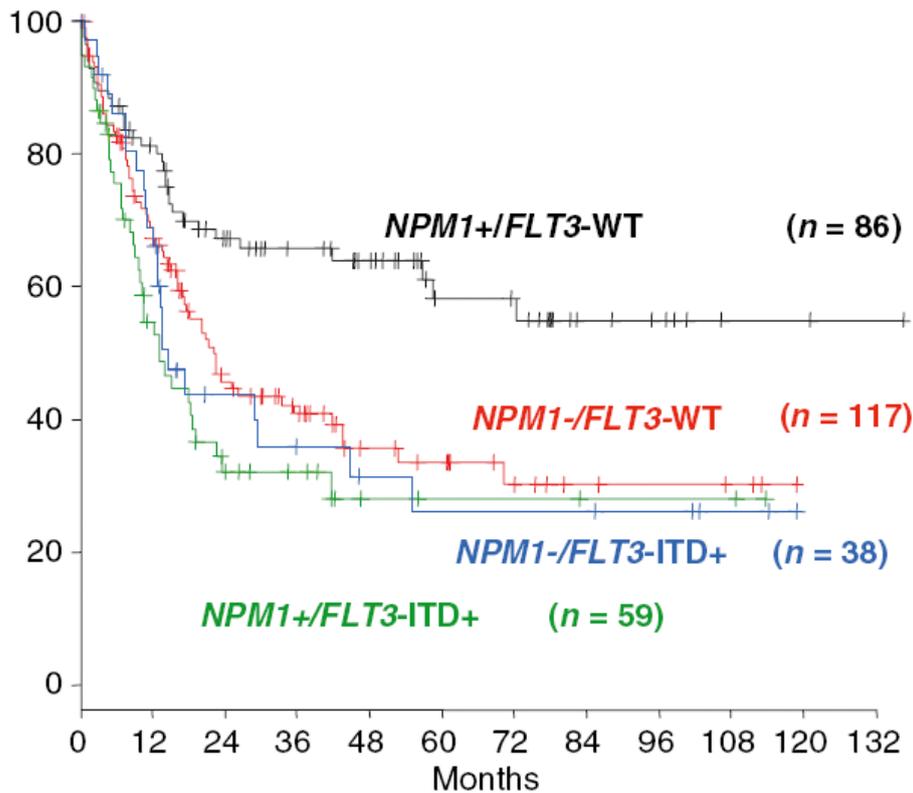


Figure 6 : Impact des mutations de *NPM1* (avec et sans *FLT3-ITD*) sur la survie des patients de LAM à caryotype normal. (60)

FLT3 : Le gène *FLT3*, situé en 13q12, code pour un récepteur FMS-like tyrosine kinase (TRK) de type III impliqué dans la différenciation, la prolifération et la survie des cellules souches hématopoïétiques. Il est normalement exprimé par les progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes, puis son expression diminue au cours de l'hématopoïèse.

Les mutations du gène *FLT3* sont parmi les plus fréquentes dans les LAM puisqu'on les retrouve dans 25 à 30% des cas. Il existe deux types d'anomalies :

- La duplication interne en tandem (*FLT3-ITD*) dans le domaine juxta membranaire : elle est associée à un pronostic péjoratif. Les mutations *FLT3-ITD* concernent donc environ 25 % des LAM de l'adulte et 10 % des LAM de l'enfant, mais sont préférentiellement associées à certains sous-

groupes puisqu'on les retrouve dans 35 à 45 % des LAM à caryotype normal et des LAP et dans deux tiers des LAM avec t(6;9).

- La mutation ponctuelle affectant le codon 835 et 836 du second domaine tyrosine kinase et sans impact pronostic représentant 10% des LAM et 15% des LAM à caryotype normal. Par ailleurs de nombreuses études ont montré que la présence de *FLT3-ITD* confère un pronostic défavorable dans les LAM à caryotype normal associée à une augmentation de l'incidence cumulée des rechutes, une diminution de la survie globale et une résistance à la chimiothérapie standard, nécessitant un recours à l'allogreffe de CSH. En revanche, pour les mutations ponctuelles de *FLT3-ITD* l'impact pronostic reste controversé. Enfin, la connaissance du statut mutationnel de *FLT3* pourrait s'avérer intéressante pour guider la thérapeutique puisque des molécules inhibitrices de *FLT3* sont disponibles dans le cadre de certains essais thérapeutiques.

CEBPA : Le gène *CEBPA* situé en 19q13.1 code pour un facteur de transcription de type *basic zipper* impliqué dans le contrôle de la prolifération et la différenciation des progéniteurs myéloïdes.

Le *CEBPA* comporte 4 domaines, la partie N terminale contient 2 domaines de transactivation TAD1 et TAD2, tandis que la partie C terminale présente le domaine leucine-zipper et le domaine de liaison à l'ADN (Figure 7).



Figure 7 : Structure de la protéine CEBPA

Il est surtout exprimé dans les cellules de la lignée myélomonocytaire et intervient dans les stades précoces de la différenciation. En tant que facteur de transcription, le *CEBPA* est capable d'inhiber l'expression de l'oncogène *c-MYC* et d'activer celle des gènes spécifiques de la lignée granulocytaire *via* son action synergique avec PU-1 ou le complexe CBF. La perte d'expression de la protéine *CEBPA* est secondaire à des mutations, des modifications post-transcriptionnelles, des interactions protéines-protéines avec des protéines de fusion comme *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFβ-MYH11* mais également des modifications de l'épigénétique. Ces anomalies jouent un rôle critique dans la transformation leucémique (61).

Les mutations ponctuelles acquises de *CEBPA* sont décrites dans 5 à 15% des LAM quel que soit l'âge (62). Il en existe deux types : les mutations frameshift ou non-sens N-terminales et les mutations in-frame C-terminales généralement retrouvées simultanément. Ces deux types de mutations engendrent donc deux types de profils bien distincts : les patients double mutés (*CEBPA^{dm}*) versus simple mutés (*CEBPAsm*). Dans 65% des cas, les mutations C et N terminales sont bialléliques, majoritairement des hétérozygotes composites mutés en N-term sur un allèle et en C-term sur l'autre allèle et le reste étant homozygotes probablement par mécanisme de disomie uniparentale (UPD). Les LAM *CEBPAsm* possèdent une mutation en C- ou en N-terminal et sont caractérisées par la plus grande fréquence des mutations associées de *NPM1* ou *FLT3-ITD* (respectivement 35 % et 30 % versus 3 % et 7 % dans les LAM *CEBPA^{dm}*) (63). Les mutations confèrent un pronostic favorable uniquement si la mutation est bi-allélique (dans 50% des cas) dans les LAM à caryotype normal chez l'adulte (64) (65) (Figure 8), entité distincte qui sera confirmée dans la nouvelle classification ELN (et OMS) de 2016 alors que l'ancienne classification ELN ne mentionnait que les mutations globales de *CEBPA*.

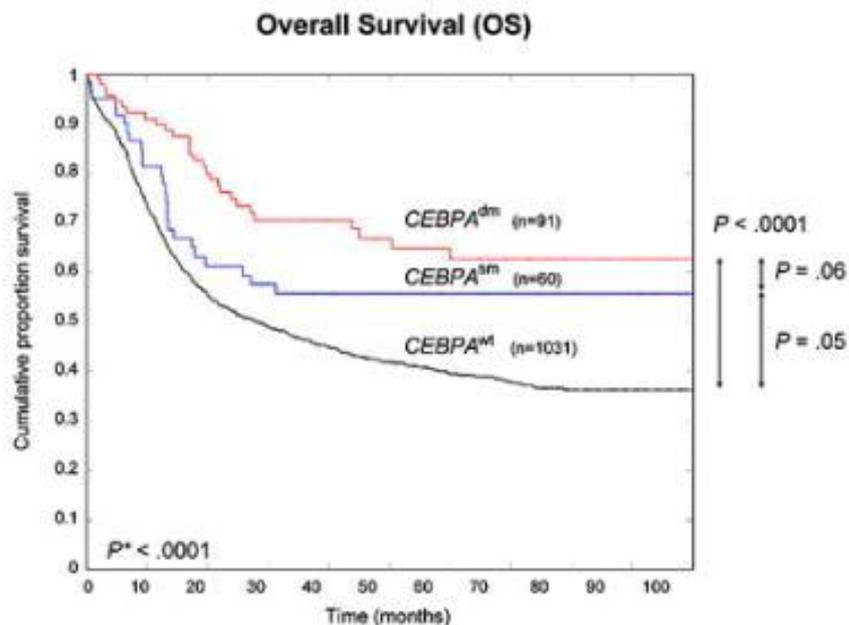


Figure 8 : Impact des mutations de *CEBPA* (double mutés et simple mutés) sur la survie des patients atteints de LAM-CN :

De nombreuses autres mutations récurrentes ont également été décrites telles que les mutations affectant les gènes du contrôle épigénétique comme *IDH1*, *IDH2*, *TET2*, *DMT3A* ou *ASXL1*. L'étude de ces mutations pourrait permettre de mieux définir le pronostic des patients atteints de LAM à caryotype normal.

2) Réponse au traitement

Bien que les nombreux facteurs préthérapeutiques liés au patient lui-même ou à sa maladie constituent en général de bons indicateurs pronostiques, il n'en existe aucun qui prenne en considération les différences interindividuelles dans le métabolisme des molécules ou la réponse immune anti-leucémique. Au diagnostic de LA, le nombre de cellules tumorales est d'environ 10^{12} cellules. Or dès que ce nombre devient inférieur au seuil de 10^{10} sous l'action de la chimiothérapie, les cellules leucémiques ne sont plus détectées par l'examen cytologique du sang et la moelle osseuse, on considère alors que le patient est en rémission hématologique complète. Toutefois cela ne signifie pas que les cellules tumorales aient entièrement disparu de l'organisme mais simplement qu'elles sont présentes à des taux inférieurs aux limites de détection des techniques cytologiques.

Par ailleurs, l'interprétation de ces techniques reste parfois difficile notamment pour les moelles de richesse variable ou encore lors de la présence de blastes de régénération.

Face à ces problèmes de sensibilité, un outil de choix permettant d'évaluer de façon précise, sensible et objective la réponse thérapeutique à l'échelle individuelle a été mis en place, il s'agit de l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD).

Celle-ci est définie comme la persistance de cellules leucémiques ayant survécu à la chimiothérapie et présentes en nombre inférieur au seuil de détection des méthodes cytologiques classiques.

Cette MRD est devenue au fil du temps, un facteur pronostique majeur pour le risque de rechute dans les leucémies aiguës. En effet, elle permet de suivre l'évolution de la masse tumorale, d'apprécier la sensibilité des cellules tumorales aux différents traitements et d'évaluer la qualité de la rémission complète.

Au final, la MRD permet de prédire la rechute hématologique avant qu'elle ne se manifeste cliniquement et de déclencher de manière plus précoce une intensification thérapeutique.

Ainsi pour évaluer la réponse au traitement, le suivi de la maladie résiduelle (Minimal Residual Disease MRD) est réalisé soit par immunophénotypage en cytométrie en flux soit en biologie moléculaire sachant que la sensibilité de l'immunophénotypage est inférieure à celle de la biologie moléculaire (de l'ordre de 10^{-3} à 10^{-4}) (Figure 9).

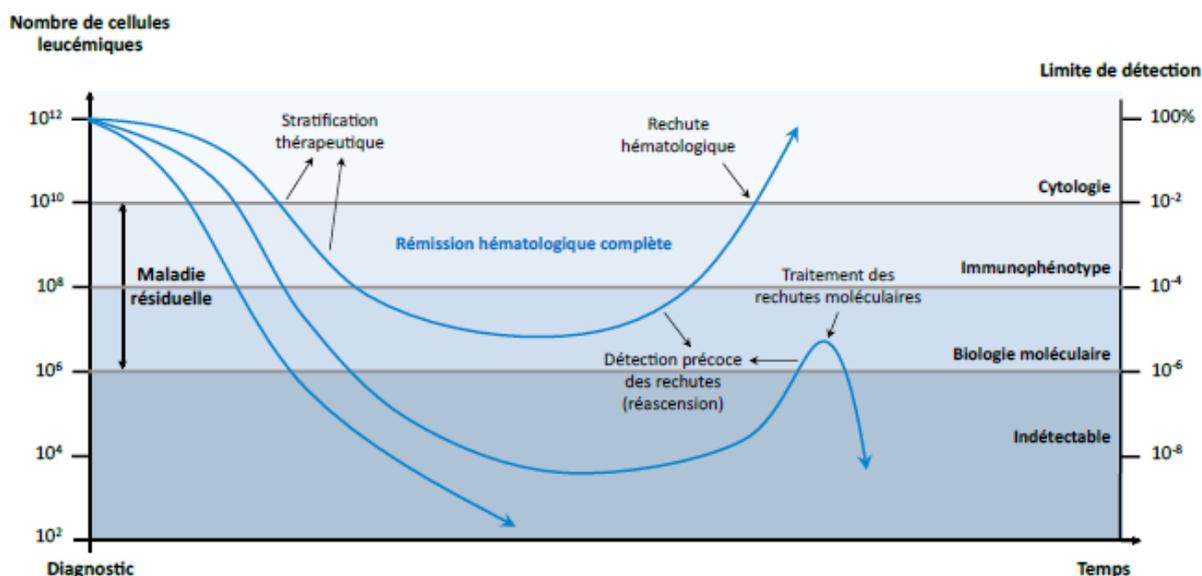


Figure 9 : La maladie résiduelle dans les leucémies aiguës

Le suivi de la maladie résiduelle pour les LAM s'effectue essentiellement en routine en biologie moléculaire par la quantification de différents marqueurs moléculaires par PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR)(66). Cette technique présente une très grande sensibilité avec une limite de détection de l'ordre de 10^6 . Toutefois pour suivre cette MRD, il faut disposer d'un marqueur spécifique des cellules tumorales et stable dans le temps. Différents marqueurs peuvent alors correspondre à cette description : les transcrits de fusion récurrents (comme *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, *PML-RAR α* (67)) les mutations géniques, la surexpression de certains gènes sont utilisés dans le suivi de la MRD des LAM ou encore les réarrangements V(D)J clono-spécifiques utilisés dans le suivi de la MRD des LAL.

Le choix de ce marqueur constitue une étape décisive dans le processus de suivi de la MRD. Les transcrits de fusion constituent une cible spécifique, stable, applicable au plus grand nombre et faisable techniquement en routine pour un coût acceptable. Ces transcrits de fusion concernent environ 30 à 40% des LA.

Ainsi, ces techniques sont appliquées en routine chez les malades présentant les transcrits de fusion spécifiques.

Il existe dans les LAM de bon pronostic avec 90% de rémission complète et un taux de survie à 5 ans de 65% ne nécessitant pas d'allogreffe en première rémission complète :

- ✓ Le transcrit *PML-RARA* issu de la translocation t(15;17) permet de suivre la MRD dans les leucémies aiguës promyélocytaire dans 99% des cas. Une MRD positive après traitement ou une repositivation au cours de l'évolution est prédictif d'une rechute hématoLOGIQUE. La MRD permet donc de modifier la stratégie thérapeutique par chimiothérapie précoce ou

la transplantation de cellules souches. Des études ont montré le bénéfice du traitement précoce devant la rechute moléculaire avec notamment un gain de survie significatif (68) (69).

- ✓ Les transcrits *AML1-ETO* et *CBFβ-MYH11* issus respectivement de la translocation t(8;21) et de l'inversion 16 inv(16) retrouvés dans les LAM à *core binding factor* sont utilisés pour le suivi et ont montré un intérêt pronostique sur le risque de rechute (67). L'intérêt du suivi de la MRD au cours du traitement de ces LAM CBF a été démontré grâce aux résultats du protocole CBF-2006 (70) (71). La MRD est apparue comme le paramètre le plus discriminant et même le seul facteur prédictif du risque de rechute en analyse multivariée.

Toutefois lorsque ces anomalies sont absentes et que les patients appartiennent au groupe de risque intermédiaire et défavorable, d'autres marqueurs peuvent être utilisés pour le suivi de la MRD tels que : les mutations de l'exon 12 du gène *NPM1* (de type A,B,D,J et autres variants rares) retrouvées dans 50% des LAM à caryotype normal avec une bonne sensibilité (de l'ordre de 10^{-5}) (72) (73) ou encore l'expression de *WT1* qui est surexprimé dans environ 80% des LAM (74) (Figure 10). Il faut préciser que la surexpression de *WT1* présente essentiellement un intérêt dans les LAM sans transcrite de fusion ni mutation de *NPM1* car l'expression de *WT1* n'est pas spécifique du clone leucémique, il existe un « bruit de fond » généré par l'expression basale de *WT1* dans les tissus, le seuil de sensibilité atteint se situe autour de 10^{-3} avec une supériorité du sang par rapport à la moelle.

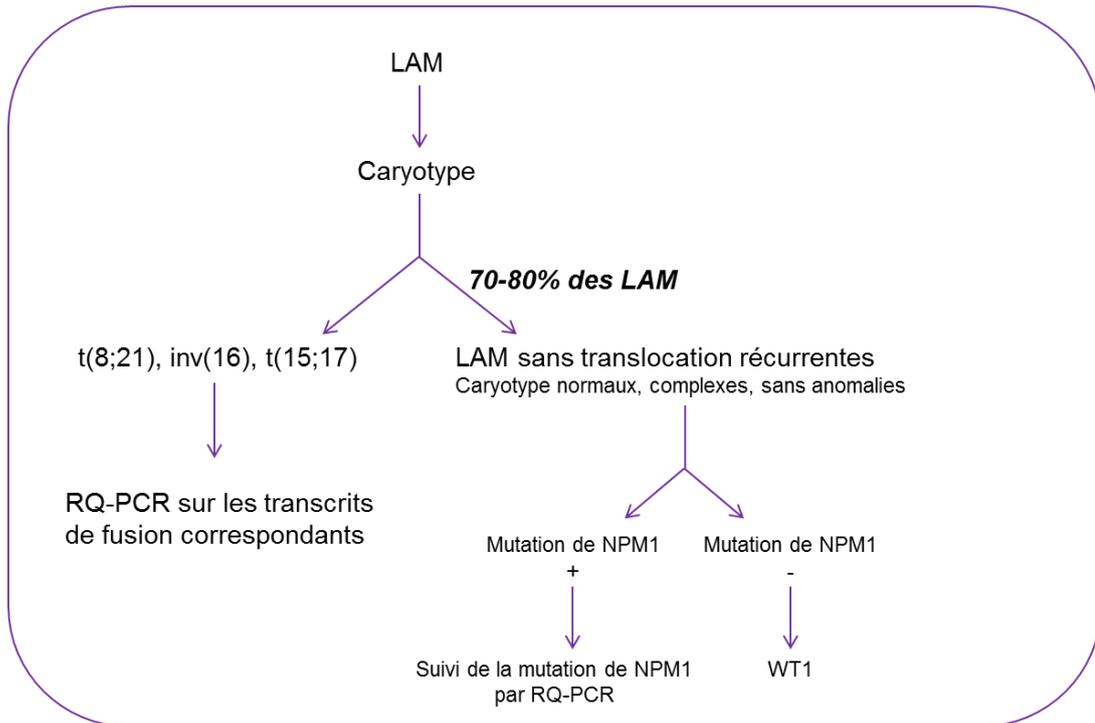


Figure 10 : Suivi de la MRD dans les LA

H. Stratégie thérapeutique dans les LAM :

Le traitement des LAM vise à obtenir la disparition des blastes anormaux ce qui permet à la moelle osseuse normale de reconstituer les populations de cellules du sang (leucocytes, érythrocytes, plaquettes).

1) Chimiothérapie intensive :

Ce traitement se déroule habituellement en plusieurs phases :

- L'induction : il s'agit d'une chimiothérapie d'une durée de 7 à 10 jours. L'objectif est d'obtenir une rémission donc de rendre indétectable les blastes anormaux dans le sang et la moelle osseuse tout en retrouvant un hémogramme normal ou subnormal. Ce traitement nécessite une hospitalisation des patients afin de réaliser des transfusions sanguines, d'observer en continu les effets indésirables de la chimiothérapie intensive et de permettre la reconstitution des populations sanguines. En général, le traitement d'induction comporte une association de 2 drogues : l'anthracycline (daunorubicine 45 à 60 mg/m²/jour pendant 3 jours ou idarubicine ou mitoxantrone 36 à 40 mg/m² dose totale délivrée sur 3 à 5 jours) et l'aracytine (Ara-C) 100 à 200 mg/m²/jour en perfusion continue pendant 7 à 10 jours.

Concernant la LAM 3, il existe des thérapies ciblées telles que les anthracyclines et l'acide tout-trans-rétinoïque (ATRA 45mg/m²/j) sachant que certains protocoles

proposent désormais un traitement sans anthracycline (ATRA + arsenic) donc sans chimiothérapie (75) (76).

Une fois la rémission complète obtenue, il persiste un petit nombre de cellules anormales dans la moelle osseuse, il est alors nécessaire d'instaurer d'autres étapes de traitement.

Toutefois si le myélogramme révèle encore la présence de plus de 5% de blastes dans la moelle osseuse après 1 ou 2 chimiothérapies d'induction, on met en place des traitements de rattrapage qui correspondent le plus souvent à des cures de réinduction. Si le patient ne répond pas favorablement au traitement, on estime qu'il est réfractaire. L'indication de greffe de moelle osseuse est alors posée après une ou deux cures de consolidation pour offrir une chance de guérison.

- La consolidation : elle vise à maintenir la rémission hématologique et consiste en l'administration de fortes doses de chimiothérapie. Il s'agit de réduire le risque de réapparition de la maladie dans le futur. Ce traitement utilise un des 2 agents de chimiothérapie utilisés pour l'induction initiale. Il est administré sur 5 jours environ puis renouvelé tous les mois pendant 3 ou 4 mois. Les patients ne sont pas contraints de séjourner à l'hôpital au terme des séances de chimiothérapie car l'effet de la chimiothérapie est moins intense que celle de l'induction.

Cependant, le risque d'infection reste élevé et au moindre signe d'appel infectieux les patients doivent revenir à l'hôpital du fait de l'affaiblissement de leur système immunitaire par la chimiothérapie.

Après une chimiothérapie de consolidation pour des patients de moins de 50 ans en rémission complète avec un donneur HLA identique familial, une allogreffe est systématiquement discutée à l'exception des LAM appartenant au groupe de risque favorable selon les recommandations de l'ELN en 2009 (77). En effet, l'orientation thérapeutique dans les LAM dépend de l'âge et de l'état clinique du patient, des caractéristiques pronostiques et notamment cytogénétiques et moléculaires de la LAM.

2) Chimiothérapie non intensive

Les patients âgés de plus de 60 ans et ceux présentant au diagnostic des éléments pronostics péjoratifs tels que : les comorbidités associées, une cytogénétique défavorable, le caractère secondaire, la fragilité liée au terrain peuvent être déclarés inaptes à recevoir une chimiothérapie intensive et sont alors dirigés vers un traitement moins intensif, ne nécessitant pas toujours une hospitalisation. Il s'agit surtout de privilégier la qualité de vie et de proposer une chimiothérapie palliative. Concernant les options thérapeutiques possibles, sont proposées :

- Les essais cliniques
- La chimiothérapie à faible dose (Aracytine)
- Les agents hypométhylants (Azacytidine) qui influencent la génétique de la leucémie notamment en désactivant les gènes à l'origine de la prolifération des cellules anormales
- Les immunomodulateurs (Lénalidomide) qui empêchent la division et la prolifération des cellules leucémiques
- Les soins de support qui incluent les facteurs de croissance et les transfusions sanguines

3) Le protocole ALFA-0701 :

Le protocole ALFA-0701 est une étude multicentrique randomisée de phase III ayant inclus des patients âgés de 50 à 70 ans, et présentant une LAM diagnostiquée, non traitée antérieurement. Ce protocole étudie l'effet de l'addition de l'anticorps monoclonal Gemtuzumab Ozogamicine (Mylotarg®) utilisé en doses fractionnées. Les patients inclus dans le protocole devaient avoir entre 50 et 70 ans et présenter une LAM *de novo*.

Ainsi les critères d'inclusion étaient :

- Un score ECOG compris entre 0 et 3 pour évaluer l'état général du patient
- Une fonction cardiaque dans les limites de la normale et évaluée par scintigraphie ou échographie
- Un consentement éclairé

Les critères d'exclusion regroupaient :

- Les LAM secondaires à un traitement par chimiothérapie ou radiothérapie pour une néoplasie
- Les LAM secondaires à un SMD ou SMP
- Les LAP
- Une atteinte du système nerveux central
- Une insuffisance rénale ou hépatique
- Une pathologie maligne évolutive ou une infection non contrôlée
- Une sérologie VHB, VHC ou VIH positive (sauf sérologie témoignant d'une vaccination)
- Un test de grossesse positif pour les femmes en âge de procréer

Le traitement du protocole ALFA-0701 comprend (Figure 11):

- Un traitement d'induction de type « 3+7 » avec 2 bras de randomisation A et B. Chacun comprenant la daunorubicine à la dose de 60 mg/m²/j en intraveineux de J1 à J3 associée à la cytarabine à 200 mg/m²/j en perfusion intraveineuse continue de J1 à J7 ; le bras B comporte en plus du Mylotarg® à doses fractionnées soit 3 g/m² à J1, J4, J7 en perfusion intraveineuse de 2h après prévention des réactions allergiques par méthylprednisolone.
- Une évaluation à J15 grâce à la réalisation d'un myélogramme. Si la blastose médullaire est supérieure à 10%, une cure complémentaire associant la daunorubicine à J1 et J2 à la Cytarabine de J1 à J3.
- Les patients en rémission complète reçoivent ensuite deux cures de consolidation. Pour les bras A et B, la daunorubicine est administrée à la dose de 60 mg/m²/j à J1 et la cytarabine à la dose de 1 mg/m²/12h de J1 à J4 et du Mylotarg® 3mg/m²/j à J1 pour les patients inclus dans le bras B.

Cette étude a permis de montrer un effet bénéfique du Mylotarg® sur les RFS, EFS et OS du bras B versus le bras A. Au final, l'addition du Mylotarg® à la chimiothérapie en première ligne a permis d'obtenir de meilleurs résultats que la chimiothérapie seule chez les patients de 50 à 70 ans atteints de LAM de novo (78).

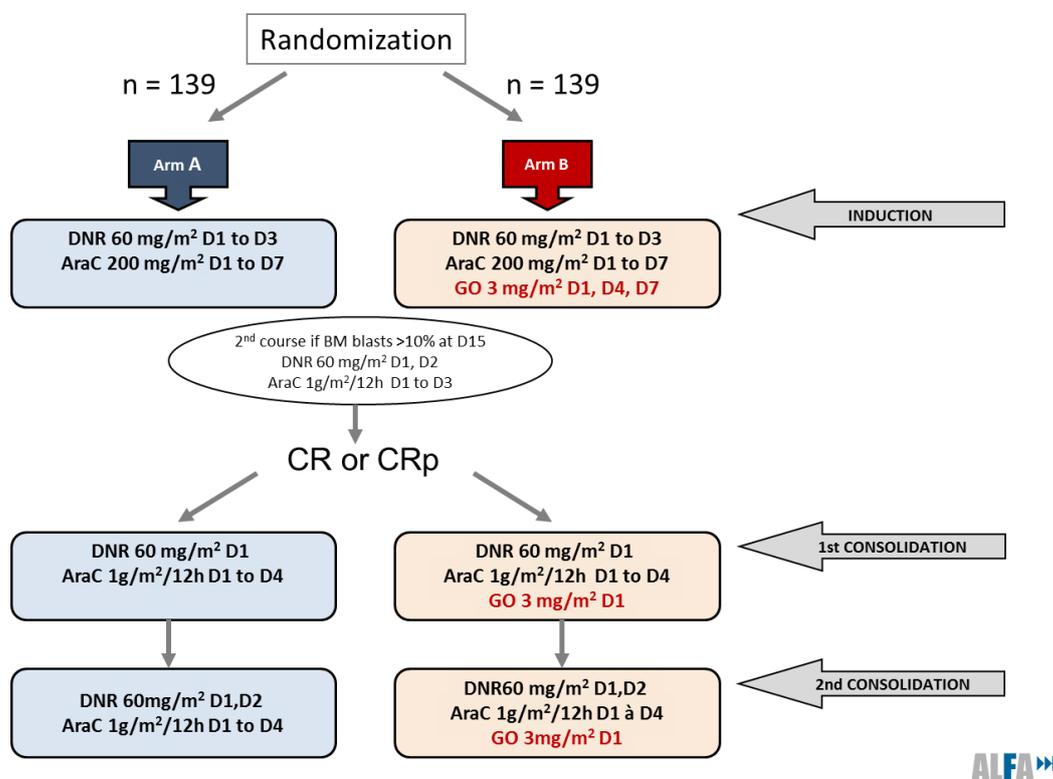


Figure 11 : Schéma du protocole ALFA-0701

4) Le protocole ELAM-02 :

Le protocole ELAM-02 est un protocole multicentrique sur le traitement des LAM de l'enfant et de l'adolescent. L'objectif principal est d'étudier l'intérêt d'un traitement d'entretien par Interleukine 2 de manière randomisée chez les patients non allogreffés, sur la survie sans rechute, en rémission complète à l'issue du traitement par chimiothérapie dans le cadre de la prise en charge habituelle des LAM. Il s'agit également d'étudier les facteurs pronostiques biologiques qui comportent la cytogénétique et la biologie moléculaire principalement, de comparer les résultats de l'allogreffe à ceux de la chimiothérapie et à ceux obtenus avec un traitement d'entretien par Interleukine 2 après chimiothérapie et enfin d'analyser l'ensemble de la toxicité liée au traitement. L'essai comportait 441 enfants de moins de 18 ans entre mars 2005 et décembre 2011.

Les critères d'inclusion regroupaient :

- L'âge entre 0 et 18 ans
- Les LAM non antérieurement traitées, de type de type FAB M0, M1, M2, M4, M4 éosinophile, M5, M6, M7, non classable ou sur myélodysplasie (blastose > 20 %)
- Un consentement écrit des deux parents et de l'enfant (en fonction de l'âge) pour participer à l'étude

Les critères d'exclusion regroupaient :

- Trisomie 21
- LAM3 et M3 variant
- LAM secondaires

Enfin les critères d'inclusion du protocole de recherche thérapeutique, avant la randomisation pour IL-2 :

- Les patients en rémission complète à l'issue de la chimiothérapie d'induction et des consolidations
- L'absence de donneur familial identique sauf pour les patients avec t(8 ;21), et autres anomalies cytogénétiques et moléculaires reconnues de pronostic favorable
- L'absence d'indication de greffe phéno identique
- absence de contre-indication à l'emploi de l'IL-2

Le traitement du protocole ELAM-02 comprend (Figure 12):

- Un traitement d'induction par Aracytine 200mg/m²/j pendant 7j en perfusion continue associée à la Mitoxantrone 12mg/m²/j pendant 5j sur une perfusion d'une heure.
- Une évaluation à J15 grâce à la réalisation d'un myélogramme. Selon la blastose médullaire, le traitement de consolidation n°1 est réalisé à partir de J21 (si blastose >25%) ou après sortie d'aplasie (si blastose < 25%) avec une association d'Aracytine 3g/m² x 2/j pendant 3j sur une perfusion de 3 heures et d'Amsacrine 100mg/m²/j pendant 3j sur une perfusion d'une heure.
- Un traitement de consolidation n°2 par Aracytine 200mg/m²/j pendant 4j en perfusion continue associée à VP16 100mg/m²/j pendant 4j sur une perfusion d'une heure et la Daunorubicine 40mg/m²/j pendant 4j sur une perfusion de deux heures ou une allogreffe de moelle osseuse.
- Un traitement de consolidation n°3 par Aracytine 3mg/m² x 2/j à J1,J2,J8,J9 et L-Asparaginase 6000U/m²/j à J2 et J9.
- Après la consolidation n°3 et après vérification des critères d'inclusion avant randomisation, un myélogramme est réalisé en sortie d'aplasie. Après rémission complète persistante, les patients sont inclus soit dans le bras de randomisation sans IL-2 soit dans l'autre bras comportant un traitement d'entretien par IL-2.

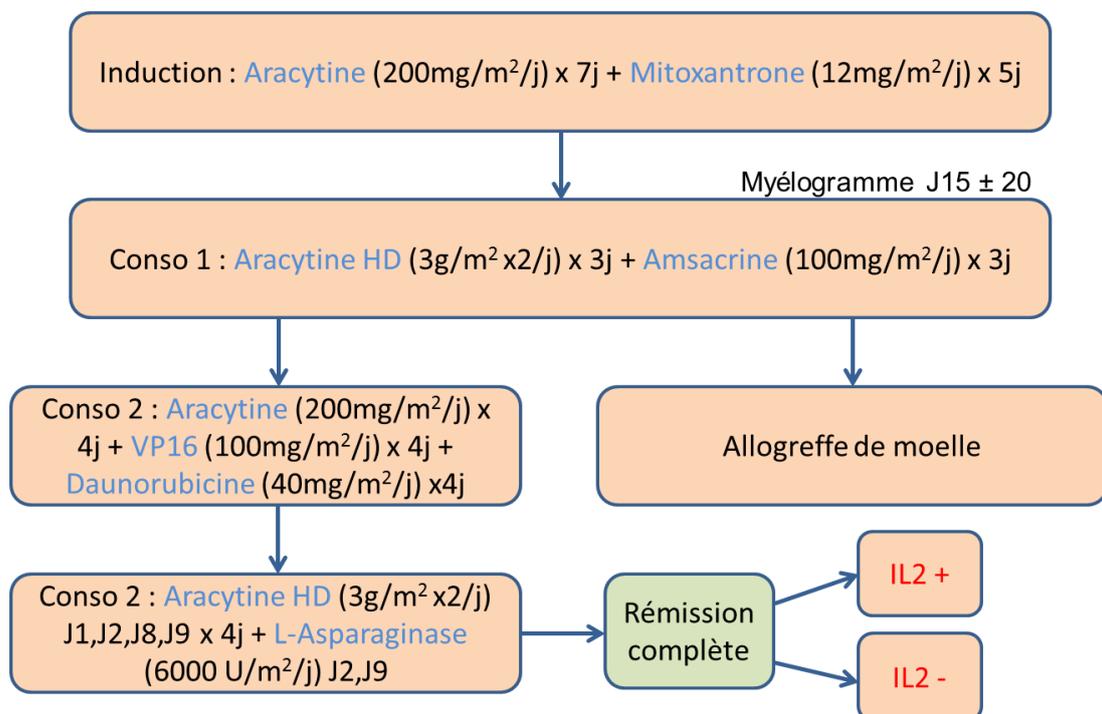


Figure 12 : Schéma du protocole ELAM02

OBJECTIFS

Nous avons pu voir que les translocations récurrentes sont un mécanisme privilégié d'activation d'oncogènes dans les tumeurs hématopoïétiques et qu'elles sont particulièrement fréquentes dans les LAM. La mise en évidence des transcrits de fusion et des mutations de *NPM1* occupe donc une place très importante pour le diagnostic, la classification des LAM mais aussi pour la stratification pronostique et le choix d'un traitement adapté.

Actuellement, les principales anomalies recherchées au diagnostic de LAM au diagnostic sont les transcrits de fusion *AML1-ETO*, *CBF β -MYH11*, *PML-RARA* et *MLL-AF9* ainsi que la recherche des mutations de *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA*.

Toutefois, ces analyses sont réalisées le plus souvent par RT-PCR et/ou séquençage de manière isolée pour chaque paramètre, c'est-à-dire qu'il faut réaliser une recherche spécifique de ces anomalies afin de les détecter. La RT-MLPA (79) (80) ou amplification de sondes dépendante d'une ligation, va nous permettre de détecter l'ensemble des transcrits chimériques « conventionnels » (81) ainsi que des transcrits plus rares et certaines mutations de *NPM1*.

Nous avons analysé les patients atteints de LAM du protocole adulte ALFA-0701 et du protocole pédiatrique ELAM-02. Enfin nous avons testé cette RT-MLPA pour les patients de routine sur une durée de 4 mois et demi afin de vérifier les résultats retrouvés par la technique et de prouver son efficacité dans la recherche de transcrits rares non détectés par les techniques de biologie moléculaire classique.

De ces résultats, nous discuterons de l'intérêt de la mise en place de la RT-MLPA au diagnostic de LA en routine au laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille.

MATERIELS ET METHODES

I) Patients

Les patients étudiés dans ce travail sont inclus dans le protocole ALFA-0701 (âge compris entre 50 et 70 ans) et le protocole ELAM-02 (âge entre 0 et 18 ans). Les échantillons de moelle osseuse et de sang périphérique prélevés lors du diagnostic et au cours du suivi ont été conservés au laboratoire d'Hématologie du Centre de Biologie Pathologie de Lille et au centre de conservation des échantillons. Toutefois seuls les patients pour lesquels le cDNA présentait un nombre de copie d'*ABL* >10 000 étaient retenus (seuil témoignant d'une qualité acceptable de l'échantillon), les autres étant rejetés d'emblée.

Nous avons étudiés 244 patients sur 278 du protocole ALFA-0701 et 195 patients sur 441 du protocole ELAM-02.

Enfin nous avons testé en routine du 1^{er} décembre 2015 au 15 avril 2016 cette technique de RT-MLPA sur 419 patients au diagnostic d'hémopathie maligne.

II) Isolements cellulaires

A partir de la moelle osseuse et des échantillons de sang périphérique recueillis sur tube EDTA, les leucocytes sont isolés afin de préparer les culots cellulaires en vue d'extraire leur ARN. Tout d'abord il s'agit d'isoler les leucocytes grâce à un milieu de séparation ou Ficoll®. Les tubes contenant le Ficoll sont centrifugés 5 minutes à 1500 tours/minute et l'anneau contenant les leucocytes ainsi que le surnageant sont transvasés dans un tube Falcon de 50 mL. Un volume de tampon de lyse est ensuite ajouté (qsp 40 mL). Après incubation de 10min à température ambiante, une centrifugation à 3000 tours/min est réalisée pendant 10min puis le surnageant est éliminé et le culot est repris dans une solution de lavage. Après une nouvelle centrifugation de 10min à 4°C à 3000 tours/min, le surnageant est une seconde fois éliminé et le culot est remis en suspension dans une 10mL de solution de lavage. Enfin un aliquot de 200µL est prélevé pour la numération automatisée des leucocytes par le Pentra® Horiba dans le but d'obtenir des préparations de culots cellulaires contenant chacun 5M de cellules. Le volume final et la numération de leucocytes étant connus, il est possible d'aliquoter cette suspension dans des tubes Eppendorff® de 2mL pour avoir 5M de cellules par tube. Les tubes Eppendorff® sont ensuite centrifugés 4 min à 4°C à 12 000 tours/min. Le surnageant est éliminé et les culots secs sont conservés à -80°C.

Ces culots sont surtout utilisés pour l'extraction d'ADN car ils ne préservent pas au mieux les ARN. D'autres culots sont alors repris dans différents tampons comme le Trizol ou le Maxwell permettant une meilleure conservation des ARN à -80°C.

III) Extraction de l'ARN

A partir des culots cellulaires congelés, il existe deux méthodes d'extraction de l'ARN. Une des deux méthodes est de moins en moins utilisée. En effet, l'extraction de l'ARN total par la technique de référence : le Trizol est une méthode manuelle qui tend à être remplacée par la méthode d'extraction de l'ARN maxwell automatisée donc plus rapide, plus reproductible et moins contraignante, moins toxique.

Nous allons donc présenter les deux méthodes :

1) La méthode d'extraction au Trizol

Lorsqu'il s'agit d'un culot sec, le culot est repris par 1 mL de Trizol. Si le culot est déjà repris dans du Trizol, le prélèvement doit être décongelé puis l'homogénéisé.

Une solution est préparée avec 1 mL de solution de lyse et 200 µL de chloroforme/isomylalcool et vortexée pendant 30 secondes jusqu'à l'obtention d'un aspect laiteux.

Après 15 min dans la glace, cette solution est ajoutée dans le tube contenant le culot cellulaire puis le mélange est centrifugé à 15 000 tours/min à 4°C pendant 5 min.

La phase aqueuse est transférée dans un tube de 1,5 mL de « Rnase free » (dépourvue de Rnase).

600 µL d'isopropanol sont ajoutés, l'homogénéisation s'effectue par retournement avant de laisser au minimum 1h à -20°C.

Le tube est alors centrifugé 30 min à 15 000 tours/min à 4°C. Le surnageant est éliminé par renversement et sont ajoutés 800 µL d'éthanol 75%.

Le tout est centrifugé 10 min à 15 000 tours/min à 4°C puis 5 min à 15 000 tours/min à 4°C en éliminant le surnageant par renversement entre les 2 centrifugations.

Le culot doit ensuite sécher 10 min sous la hotte, il est repris par un mélange de 20 µL de Rnase free, 1 µL de Rnase out et 20 µL d'eau. Le tube contenant l'ARN est alors placé dans la glace et l'ARN est dosé par méthode spectrophotométrique sur le Dropsense®.

2) La méthode d'extraction sur l'automate Maxwell

Le Maxwell est un appareil semi-automatique permettant d'extraire des acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques par séries de 16 échantillons en un temps réduit. L'ARN est extrait à partir du kit Maxwell®16 LEV simply RNA Cells

(Promega). La procédure repose sur une lyse des cellules suivie d'une purification de l'ARN dans différentes solutions. L'ARN élué dans un faible volume d'eau DNase RNase free est de haute qualité permettant des applications telles que la PCR en temps réel quantitative.



3) Le dosage de l'ARN

La zone d'absorbance maximale des acides nucléiques se situe à 260 nm. Les protéines, principaux contaminants des solutions d'acides nucléiques, absorbent à 260 nm mais présentent un maximum d'absorption autour de 280 nm par les acides aminés aromatiques. La mesure du rapport de DO 260/280 permet donc de contrôler la pureté des échantillons d'ARN obtenus en évaluant la présence de contaminants (solvants organiques, protéines résiduelles) dans la solution d'ARN. On attend un rapport 260/280 supérieur ou égal à 2,0 dans le cas d'un ARN pur. Un rapport plus faible traduit généralement une contamination en protéines.

Un second ratio 260/230 est également déterminé et doit être supérieur à 2. Un rapport plus faible traduit une contamination par des molécules organiques telles que le phénol (Trizol).

Le dosage des ARN nécessite des plaques Drop S. Il faut ajouter 2 μL d'échantillon par puits après avoir vortexé et centrifugé. Puis cette plaque est introduite dans l'appareil dans les 2h pour éviter l'évaporation.

Le DropSense® permet ainsi la détermination de la concentration d'ARN (exprimée en $\text{ng}/\mu\text{L}$) ou de protéines en présence de molécules contaminantes absorbant dans l'UV/visible.

4) Normalisation de la concentration en ARN

La concentration en ARN des échantillons doit être normalisée à 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$ avant la rétro-transcription de l'ARN en ADN complémentaire. Pour cela, il existe une table de calcul excel préétablie permettant de normaliser cet ARN et de déterminer le volume d'eau et le volume mère d'ARN afin d'obtenir une solution fille d'ARN de 10 μL à 100 $\text{ng}/\mu\text{L}$.

IV) Rétro-transcription

1) Principe

La RT (Reverse Transcriptase) est la rétro-transcription de l'ARN en ADNc. Cette synthèse de l'ADNc est catalysée par une transcriptase inverse (avec un Primer aléatoire) qui est une ADN polymérase ARN dépendante capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADN complémentaire. Ceci correspond à « l'inverse » d'une réaction de transcription de l'ADN en ARN (Figure 13).

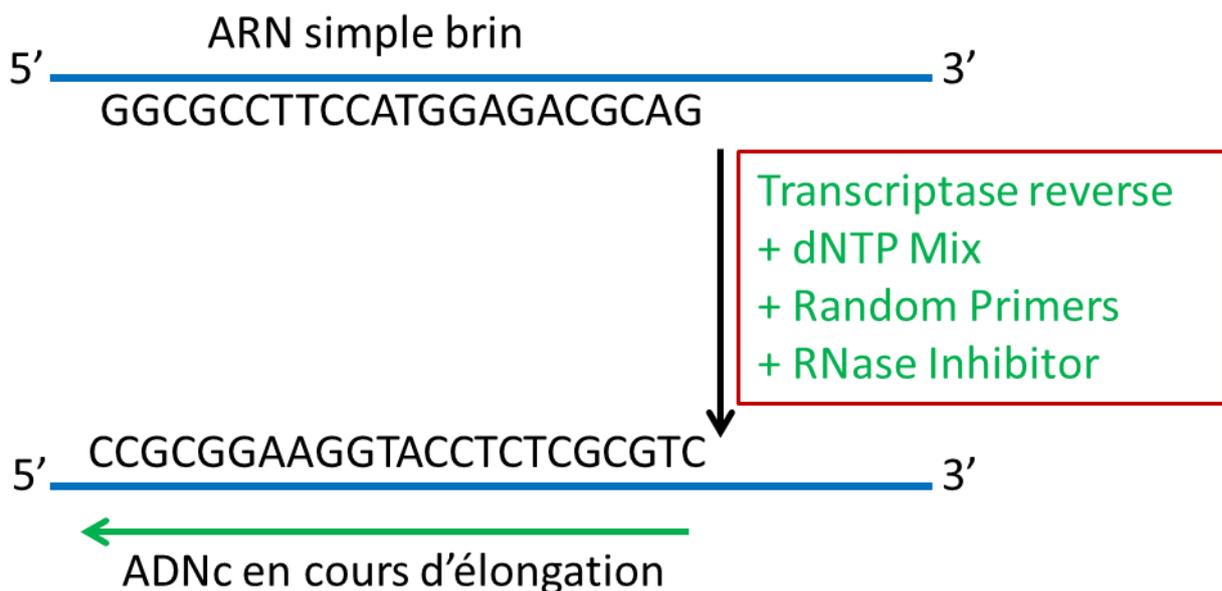


Figure 13 : Principe de la rétro-transcription

Les réactifs utilisés lors de la rétro-transcription (kit RT Applied Biosystem®) sont : le RT Buffer 10x, les désoxyribonucléotides (dNTP) 25x à 100mM constitutifs de l'ADN (adénosine, cytosine, guanine, thymine), les Random Primers 10x qui permettent de rétrotranscrire l'ensemble de l'ARN et non des séquences spécifiques, l'inhibiteur de RNase, la transcriptase reverse Multiscribe™ 50U / μ L (Tableau 4) Tableau 1. L'ensemble de ces constituants étant appelé « le Mix » est mis en incubation avec l'ARN à rétrotranscrire dans un thermocycleur (Mastercycler, Eppendorf, Hambourg, Germany).

Tableau 4 : Réactifs et volumes utilisés pour la rétro-transcription

Réactifs	Volume par tube (µL)
H2O	3.2
RT Buffer 10X	2
Random Primers 10X	2
dNTP 25X (100mM)	0.8
Inhibiteur de RNase	1
Multiscribe™ Transcriptase inverse (50U/µL)	1
Volume Mix	10
ARN	10

2) Qualité des cDNA obtenus : Q-PCR gène de référence *ABL*

a) Principe

La Q-PCR ou PCR quantitative en temps réel est une technique de PCR qui permet de suivre le processus d'amplification en continu ou « temps réel ». Les produits de PCR néoformés ou amplicons sont quantifiés grâce à la mesure de la fluorescence à chaque cycle. Cette intensité de fluorescence étant proportionnelle à la quantité d'amplicons. Cette quantification s'effectue soit à l'aide d'agents intercalants se liant à l'ADN double brin (ex : SYBR Green) soit de sondes fluorescentes (ex : Taqman).

Ainsi, plus l'échantillon est concentré en molécules cibles à l'origine, moins il faudra de cycles pour atteindre un point pour lequel le signal fluorescent est significativement supérieur au bruit de fond. Ce point est défini comme le Ct (cycle threshold) et apparaît en début de phase exponentielle. Cette quantification n'étudie donc pas la fin de la PCR et n'est donc pas affectée par les éléments limitants identifiés lors de la phase du plateau. Ce concept de Ct est à la base de la précision et de la reproductibilité de la technique.

De plus, lors de la réaction, sont utilisées des matrices de quantification connues générant respectivement des valeurs de Ct qui permettent de comparer le Ct obtenu et de le traduire en un résultat quantitatif. Ainsi, une droite standard d'équation $Ct = a$

$x \log[\text{concentration}] + b$, est obtenue grâce à la détermination du Ct de dilutions successives d'un échantillon de concentration connue. Au final, pour un échantillon inconnu, le report de son Ct sur cette droite permettra de déterminer sa concentration.

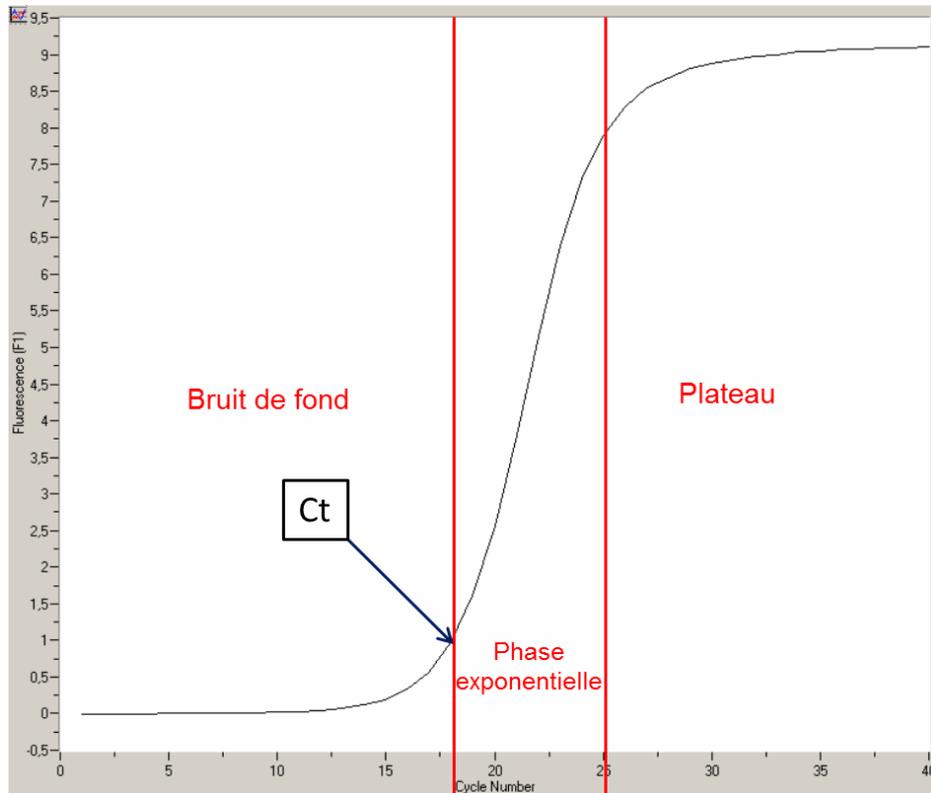


Figure 14 : Profil typique en Q-PCR avec représentation du Ct

Si l'on suit la fluorescence au cours du temps d'une PCR en temps réel, on observe une augmentation de cette fluorescence et donc du nombre de fragments PCR en 3 phases distinctes (Figure 14) :

- Phase de bruit de fond : La quantité de fragment amplifié est insuffisante pour générer un signal fluorescent supérieur au bruit de fond (et donc la fluorescence générée).
- Phase exponentielle : La quantité de fragment amplifié génère un signal fluorescent supérieur au seuil de détection de l'appareil, puis le nombre de produits amplifié double à chaque cycle. En coordonnées logarithmiques, cette phase est représentée par une droite.

- Phase de plateau (ou de saturation) : certains composants de la réaction (et en particulier le nombre de molécules de Taq disponibles) deviennent limitants. Le système ne permet plus une amplification exponentielle.

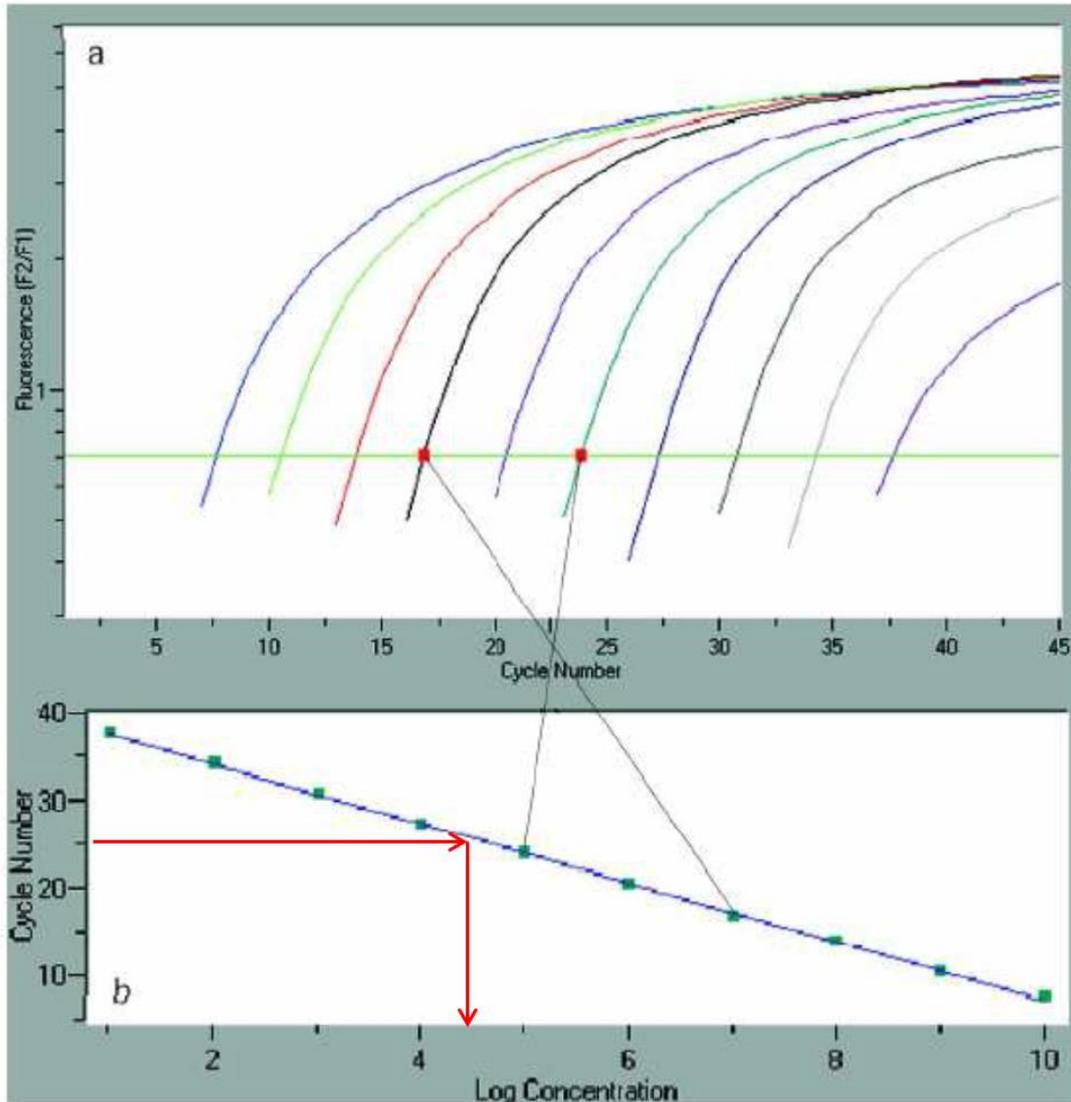


Figure 15 : Représentation de la droite standard en Q-PCR

La droite standard va représenter les valeurs de C_t obtenues expérimentalement en fonction du log des concentrations en molécules cibles fixées, issues de séries de dilutions d'un échantillon standard. La valeur de C_t est inversement proportionnelle au log base 10 de la concentration initiale en molécules cibles.

Le C_t obtenu à partir d'un échantillon de concentration inconnue va ainsi être traduit en concentration en molécules cibles grâce à la droite standard (**Figure 15**).

b) Les agents intercalants (SYBR Green)

Le SYBR Green est un fluorophore spécifique de l'ADN qui s'incorpore dans le petit sillon de la double hélice de l'ADN et émet une fluorescence (Figure 16). A l'inverse, lorsqu'il est libre, il est très peu fluorescent. Lors de la PCR en temps réel, on observe donc une augmentation de la fluorescence au cours de l'étape d'élongation et une chute de cette fluorescence à la dénaturation. La quantification est ainsi réalisée grâce au suivi de la fluorescence à la fin de chaque étape d'élongation de chaque cycle.

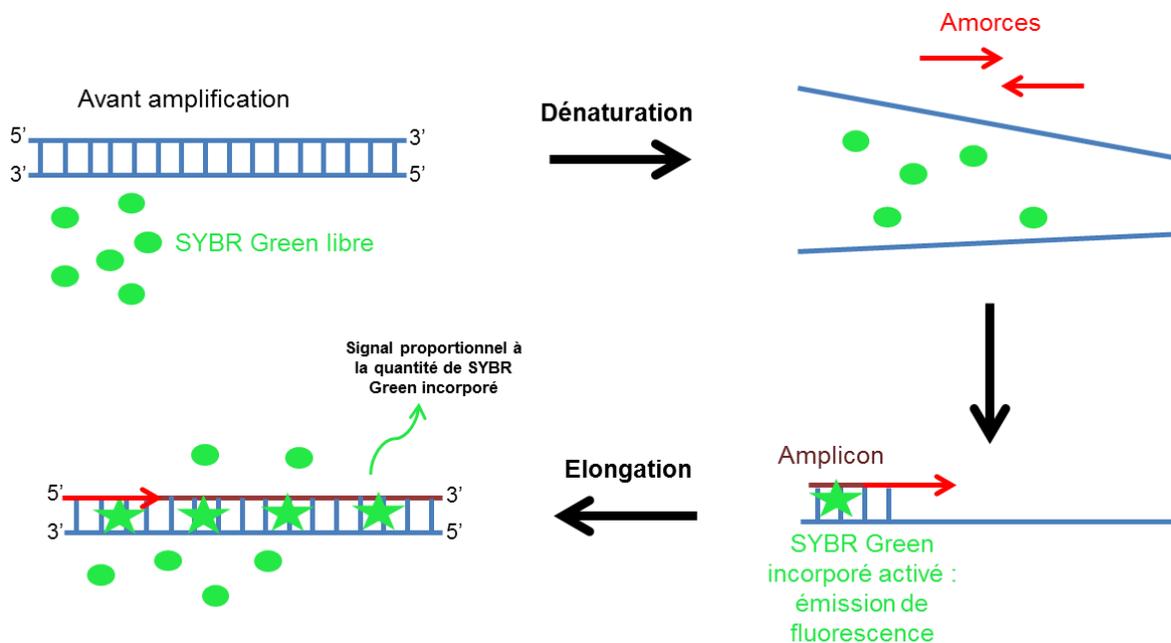


Figure 16 : Principe de la Q-PCR utilisant le SYBR Green

Cette technique de Q-PCR présente des avantages, c'est une technique économique, facile d'utilisation, ne nécessitant pas une expertise particulière pour le design de sondes fluorescentes et qui n'est pas affecté par des mutations de l'ADN cible, à l'inverse des sondes spécifiques.

Toutefois, il existe un inconvénient majeur pour cette technique : le manque de spécificité de la fluorescence mesurée puisque celle-ci dépend entièrement de la spécificité du couple d'amorces. En effet, il existe un risque de faux positifs avec une surestimation de la quantification, le SYBR Green se fixe à n'importe quelle molécule d'ADN double brin y compris des produits non spécifiques (ex : dimères d'amorces, mauvais appariements).

c) Sondes fluorescentes de type Taqman

Les sondes d'hydrolyse ou sondes Taqman utilisent l'activité 5' exonucléasique de la Taq polymérase pour hydrolyser une sonde fluorescente fixée sur sa cible (Figure 17).

Cette cible se situe à l'intérieur d'un produit PCR amplifié par deux amorces. Elle s'hybride durant la phase d'hybridation. Cette sonde contient un fluorochrome émetteur à son extrémité 5' (*reporter*) dont l'émission est inhibée par un bloqueur d'énergie situé à l'extrémité 3' (*quencher*). L'activité exonucléasique de la taq est double-brin spécifique. Elle ne va pas hydrolyser les sondes non fixées. Si l'amplicon est correctement amplifié par les 2 amorces PCR, la sonde Taqman va s'hybrider sur sa cible après l'étape de dénaturation. Lorsque la taq atteint la sonde hybridée, son activité exonucléasique va déplacer la sonde et la dégrader. Cette étape entraîne la séparation du *reporter* et du *quencher* et donc une augmentation de la fluorescence du *reporter* proportionnelle au nombre de sondes hydrolysées. Le système Taqman utilise une étape combinée d'hybridation et de polymérisation à 60-62°C.

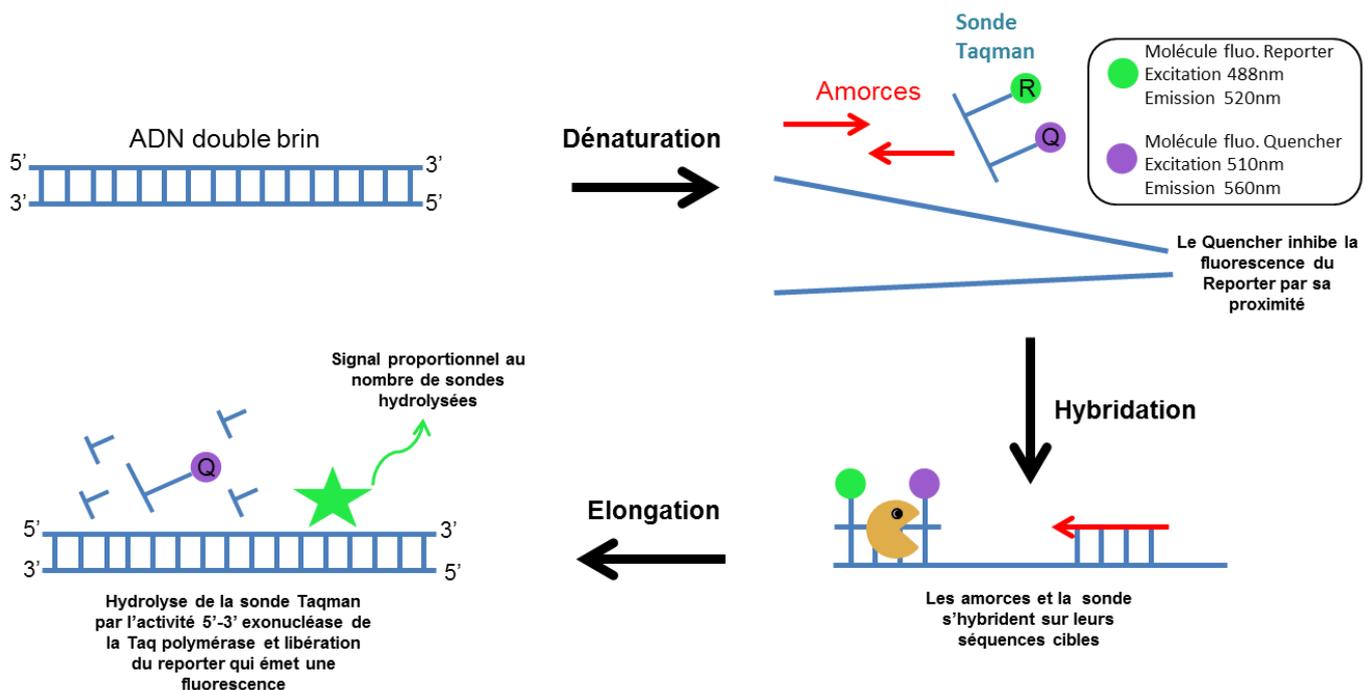


Figure 17 : Principe de la Q-PCR utilisant la méthode Taqman

La technique de Q-PCR en méthode Taqman présente une spécificité accrue notamment au niveau des primers et de l'hybridation de la sonde Taqman. Il existe

également une possibilité de multiplexage avec des sondes portant des fluorochromes différents.

d) Résultats et interprétation :

Au laboratoire la Q-PCR Taqman ABELSON a été réalisée lors de notre étude sur le QS7 (QuantStudio™ Flex Real-Time PCR System). Toutefois, la Q-PCR Taqman ABELSON réalisée en Hématologie pour la routine est effectuée sur le QS5 qui constitue un modèle plus simple. Les résultats de la Q-PCR utilisant *ABL* comme gène de référence sont exprimés en nombre de copies d'*ABL*. Ainsi, à chaque cDNA obtenu par RT-PCR, correspond un résultat de Q-PCR en nombre de copies d'*ABL*. Ce nombre de copies d'*ABL* permet de définir la qualité du cDNA obtenue. Elle est estimée insuffisante lorsqu'il est inférieur à 10 000 copies d'*ABL*, la technique de RT-MLPA ne peut alors pas être réalisée car il existe un risque de faux négatif.

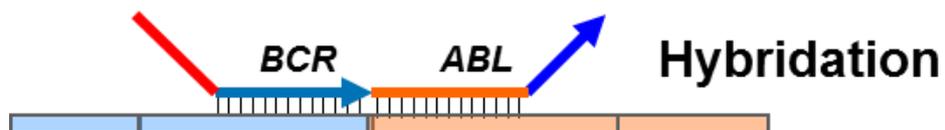


V) LD-RTPCR des transcrits de fusion

Toutes les réactions sont réalisées dans un thermocycleur à couvercle chauffant (Mastercycler, Eppendorf, Hambourg, Germany).



Après la rétro-transcription de l'ARN en ADNc (RT Applied Biosystem®) et la vérification de la qualité des cDNA, 6,25µL de cDNA sont incubés avec 3µL du mix de sondes LD-RTPCR (contenant 1,5µL de SALSA-MLPA Buffer (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands) + 1,5µL de la dilution finale du mélange des sondes oligonucléotidiques) à 95°C pendant 2min puis 60°C pendant 1h. Si un transcrite de fusion est présent, deux sondes présentes dans le mix oligonucléotidique s'hybrident ensemble au niveau de la jonction aberrante du cDNA.

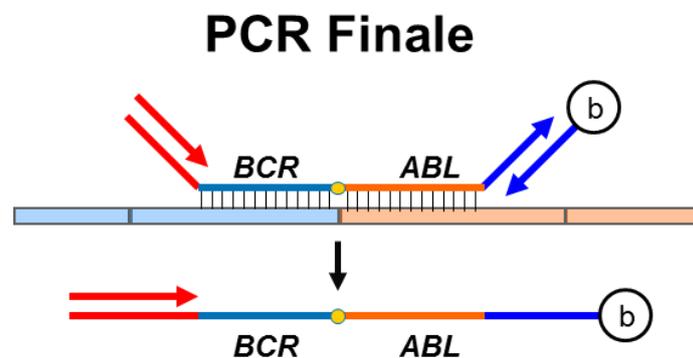


Sont ensuite ajoutés à 54°C, 32µL du mix qui permettra l'étape de ligation. Ce mix contient 25µL d'eau, 3µL de SALSA-Ligase 65 Buffer A, 3µL de SALSA-Ligase 65 Buffer B et 1µL de SALSA-Ligase 65 (MRC Holland). L'ajout de la ligase va permettre d'établir une liaison covalente entre les deux sondes après 15min à 54°C puis 5min à 98°C pour stopper la réaction de ligation.



Pour l'amplification par PCR, 5µL du produit de ligation est transféré dans un nouveau tube contenant 45µL du mix PCR dont 25µL de Red'y'Star Mix

(Eurogentec®, Liege, Belgium), 18µL d'eau, 1µL à 10µM d'amorce biotinylée U1 (GGGTTCCCTAAGGGTTGGA) et 1µL à 10µM d'amorce non biotinylée U2 (GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA). Alternativement, une amorce U1 non biotinylée peut être utilisée avec une amorce U2 biotinylée pour permettre la caractérisation de la jonction dans l'autre sens, lorsque la première possibilité n'a pas permis l'identification du partenaire. L'amplification par PCR est ainsi réalisée grâce aux amorces U1 et U2 qui viennent se fixer aux extrémités de la séquence des deux sondes. Cette amplification s'effectue dans un thermocycleur (Eppendorf®) grâce à un programme de PCR de 6min à 94°C puis 35 cycles de 30s à 94°C, 30s à 58°C, 30s à 72°C enfin 72°C pendant 4min et une conservation possible du produit de PCR à 4°C.



VI) Electrophorèse sur gel

Le produit de PCR (10µL) est ensuite analysé sur gel. Cette analyse s'effectue sur gel d'acrylamide. Toutefois, ses propriétés cancérigènes et reprotoxiques ainsi que la contrainte au niveau du temps nous a poussés à développer une électrophorèse sur gel d'agarose à 4%. Cette analyse s'effectue grâce à des gels commercialisés par ThermoFisher Invitrogen™ et une base permettant de faire migrer les échantillons sur le gel. La révélation s'effectue sous UV.



VII) Pyroséquençage

a) Principe du pyroséquençage :

Le pyroséquençage permet d'effectuer un séquençage moins cher et plus rapide qu'un séquençage par la méthode de Sanger et la lecture de la séquence est directe. Les désoxyribonucléotides triphosphate (dNTP) sont ajoutés l'un après l'autre (et non pas tous ensemble comme dans la méthode de Sanger). Si le désoxyribonucléotide ajouté est complémentaire du désoxyribonucléotide du brin matrice, il est incorporé dans le brin en cours de synthèse et un pyrophosphate inorganique (PPi) est libéré. L'ATP sulfurylase transforme stoechiométriquement le pyrophosphate libéré en ATP. L'ATP formé est utilisé par une luciférase qui transforme la luciférine en oxyluciférine qui génère un signal lumineux proportionnel à la quantité d'ATP. Le capteur CCD du séquenceur capte le signal lumineux et le traduit par un pic sur le pyrogramme™.

La hauteur du pic est proportionnelle à l'intensité du signal lumineux, elle-même proportionnelle au nombre de nucléotides incorporés au même moment (Figure 18).

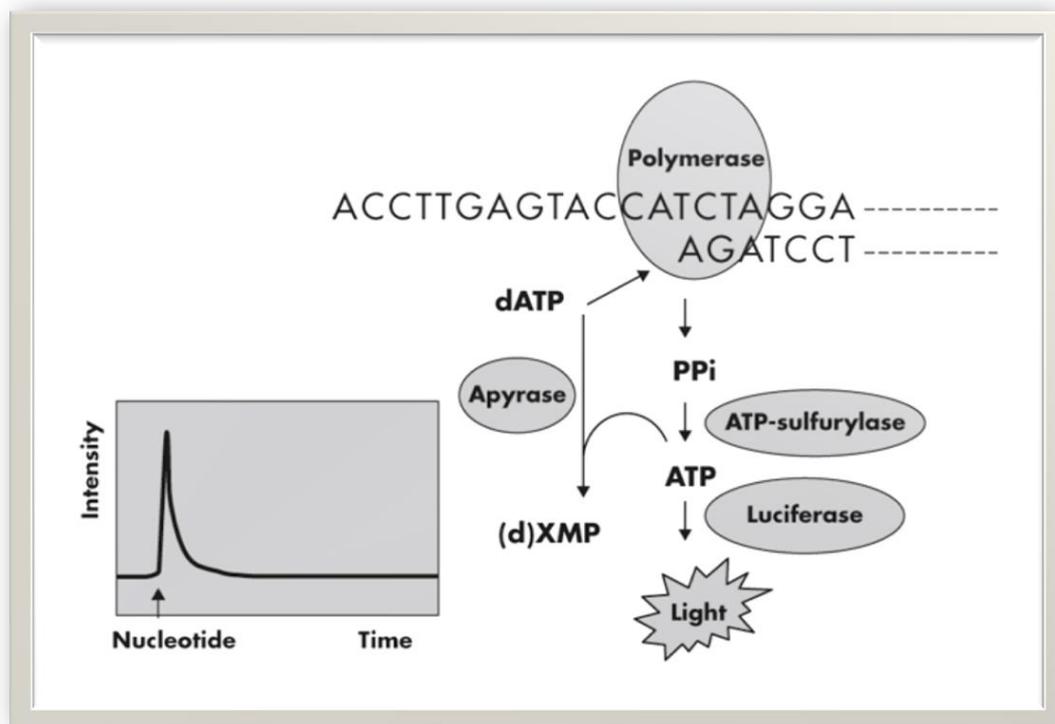


Figure 18 : Principe du pyroséquençage

b) Séquençage du produit amplifié

Une fois la présence d'un transcrit révélé sur le gel, il faut l'identifier par pyroséquençage.

Ainsi 20µL du produit de PCR est mis incubation avec 70µL du mix « billes » contenant 38µL de Binding buffer, 31µL d'eau et 1µL de Streptavidine. Cette protéine tétramérique purifiée à partir de *Streptomyces Avidinii* possède une très forte affinité pour la biotine. Or l'amorce U1 ajoutée dans les réactions précédentes est biotinylée ce qui va permettre une interaction non covalente très puissante entre la les billes de Streptavidine et l'amorce U1 biotinylée.

Ces volumes sont déposés dans une plaque PCR mise sous agitation à 1400 tours/min pendant 15min. Cette étape permet d'immobiliser le produit de PCR biotinylé sur les billes de Streptavidine.

Pendant ce temps, une dilution d'amorce U2 (non biotinylée) est préparée à l'aide de 0,5µL de U2 et 11,5µL d'Annealing buffer déposée dans une plaque pyromark Q96.

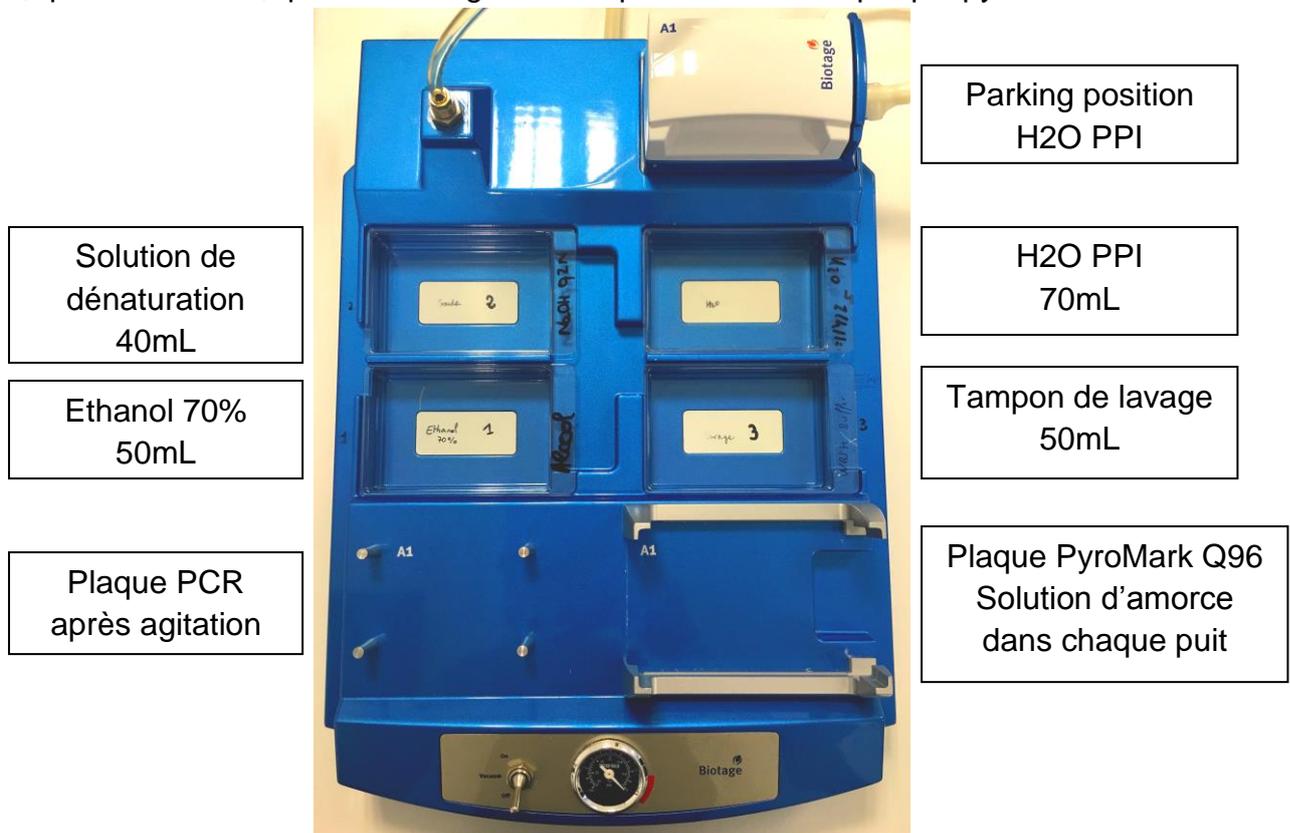


Figure 19 : Station sous vide du pyroséquenceur

Il faut mettre en marche la pompe à vide et placer l'interrupteur de la sonde à filtres sur ON puis tester l'aspiration en plaçant la pompe dans un compartiment H2O PPI. Après arrêt de l'agitation, la plaque PCR est placée sur la station sous vide (Figure 19) puis la solution y est aspirée grâce à la sonde en vérifiant au final que tous les puits soient vides. La sonde est ensuite maintenue 6s dans l'éthanol 70% puis 6s

dans la solution de dénaturation (NaOH). Celle-ci est levée à plat et après 10s d'attente elle est placée dans le tampon de lavage pendant 12s. Il faut ensuite lever la sonde et l'incliner afin d'évacuer le liquide. L'interrupteur de la sonde est placé sur OFF et les billes sont libérées, par agitation légère, dans la plaque PyroMark Q96 contenant le mix « amorce de séquence ».

La sonde doit ensuite être replacée dans le compartiment contenant de l'eau.

L'amorce de séquence non biotinylée est hybridée sur les échantillons par chauffage de la plaque PyroMark Q96 sur le chauffe plaque à 80°C pendant 2min.

Les échantillons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 10min.

Il faut ensuite remplir la cartouche PyroMark Q96 selon les volumes de réactifs figurant dans le rapport « Run information » du logiciel PyroMark. Il s'agit des cupules contenant l'enzyme, le substrat, les bases A,T,C,G. Cette cartouche est insérée dans le pyroséquenceur (Figure 20) et un test de dépôt de chacun des réactifs est réalisé sur une plaque test.



Figure 20 : Pyroséquenceur PyroMark MD Q96 Qiagen

Si le test est conforme, la plaque PyroMark Q96 contenant les échantillons est insérée dans l'appareil.

Après avoir rentré le plan de plaque dans le logiciel PyroMark du pyroséquenceur, le run est lancé et les résultats sont obtenus au niveau informatique sous forme de pyrogramme (Figure 21).

JAK2	E9	RJAK2E9	GAAATTGAACTTAGCTCATTAAAGGGAAGCT
JAK2	E11	RJAK2E11	CGAGAAAATGTCATTGAATATAAACACTGT
JAK2	E17	RJAK2E17	TTCTTCAGGAGAGAATACCATGGGTACC
JAK2	E19	RJAK2E19	ATTATGAACTATTAACAGAAAATGACATGT
PCM1	E26	FPCM1E26	CCTAGTGAGAGCCTTGCTACTACTGATGAT
PCM1	E36	FPCM1E36	ACTGAATCTCCAGTGTTAGTGAATGACTAT
PML	E3	FPMLE3 (bcr3)	GCTCTTGCATCACCCAGGGGAAAG
PML	E6	FPMLE6 (bcr1)	CAGTGGCGCCGGGGAGGCAG
RARA	E3	RRARAE3	CCATTGAGACCCAGAGCAGCAGTTC
NPM1	E4	FNPM1E4	CAGTGCATATTAGTGGACAGCACTTAGTAG
NPM1	E6	FNPM1E6F	GATGATGATGAAGAGGATGATGATGAAGA
PLZF (ZBTB16)	E3	FPLZFE3	CTGAGAATGCACTTACTGGCTCATTGAG
PLZF (ZBTB16)	E4	FPLZFE4	GGAGACACACAGGCAGACCCATACTG
STAT5b	E15	STAT5bE15	ATCACCATTGCTTGGAAAGTTTGATTCTC
STAT5b	E16	STAT5bE16	ACCAGTTCCTGCGAGTCTGCTACTG
RBM15 (OTT)	E2	FRBM15E2	ATTACCTGGTCATGATCATTGTCCGTG
MKL1 (MAL)	E4	RMKL1E4	TGCTACAGTTGAAACTCCAGCAGCGC
MKL1 (MAL)	E5	RMKL1E5	CTTTGAAAAGTCCAGCCGCATTTTCAT
CBFB	E4	FCBFBE4	GAGTTTGATGAGGAGCGAGCCAG
CBFB	E5	FCBFBE5	CAGGTCTCATCGGGAGGAAATGGAG
CBFB	E5b	FCBFBE5b	AGTTTCACAGCTGCTGGCAGTAACTG
MYH11	E7	RMYH11E7	GCCAAGGCGAACCTAGACAAGAATAAG
MYH11	E8	RMYH11E8	AATGAAGTTGAGAGCGTCACAGGGAT
MYH11	E9	RMYH11E9	GAGCTGCTTCAAGAAGAAACCCGGC
MYH11	E10	RMYH11E10	CTCTCCGACTCGAAGAAGAAGCTGC
MYH11	E11	RMYH11E11	TTGTTAGCCGAGGAGAAAAACATCTCTTC
MYH11	E12	RMYH11E12	GTCCATGAGCTGGAGAAGTCCAAGC
MYH11	E13	RMYH11E13	CTTCACGAGTATGAGACGGAAGTGAAG
E2A (TCF3)	E13	FE2AE13	TCTCGGCCTCCGACTCCTACAGTG
PBX1	E2	RPBX1E2	TTTTGAGTATCCGAGGAGCCCAGGAG
TEL (ETV6)	E4	FTELE4	GGTCATACTGCATCAGAACCATGAAGAAG
TEL (ETV6)	E5	FTELE5	CCATGCCCATTTGGGAGAATAGCAG
AML1 (RUNX1)	E2	RAML1E2	AATGCATACTTGAATGAATCCTTCTAGAG
AML1 (RUNX1)	E3	RAML1E3	ATGCCAGCACGAGCCGCCGCTTC
SIL	E1a	FSILE1a	ACCTCAGCTCCGCGGAAGTTGCG
TAL	E3	RTALE3	ATCGCCAGGACCACACCCGAG
TAL	E4	RTALE4	GATGACCGAGCGGCCGCCGAGC
TAL	E5	RTALE5	GTCCCCACACCAAAGTTGTGCG
MOZ	E16	FMOZE16	AAGAAGATGAAGAGTCAGATGATGCTGATG
CBP	E2	RCBPE2	ATTTTGGATCATTGTTTGACTTGAAAATG
CBP	E3	RCBPE3	ATGGGAATAACTGGGAACACAAGTCC
NUP98	E10	FNUP98E10	TACAACCAGTGGCGGGCTCTTTG
NUP98	E11	FNUP98E11	GCTTGGTGCAGGATTTGGAACAG
NUP98	E12	FNUP98E12	GGAGCCCCCAGGCCCCAGTAG
NUP98	E13	FNUP98E13	GATGTCAGACCCTAAGAAGAAGGAAGAG
NUP98	E14	FNUP98E14	AGCCAATGGAGCATTGATGCCCAA
NSD1	E6	RNDS1E6	CTGTGCGGTGAGAGAAGAAACGC
JARID1A	E27	RJARID1A	GATGACAGCATGGAAGAGAAACCACTA
HOXA9	E1	RHOXA9E1	TTGATAGAGAAAAACAACCCAGCGAAG
HOXA9	E2	RHOXA9E2	ATAACCCAGCAGCCAACCTGGCTTC
TOP1	E8	RTOP1E8	GATGGTAAATTGAAAAAACCAAGAAT
DDX10	E6	RDDX10E6	TTCTTGATGAAGCAGATAGAATCTTGG
DDX10	E7	RDDX10E7	CACCCCTGCCACTTTGGAACAGA

RAP1GDS1	E2	RAP1GDS1E2	ATAATCTCAGTGATACCTTGAAGAAGCTG
RAP1GDS1	E3	RAP1GDS1E3	ATACGGAAACAAGTGA AAAAATCCAAGC
P2RY8	E1	FP2RY8E1	CTTCTGCCGCTGCTTCTGCACAG
CRLF2	E2	RCRLF2E1	GCATGGGGCGGCTGGTTCTGCTG
CBFA2T3	E10	FCBFA2T3E10	CTGAGGACATCTGGAGGAAGGCTG
CBFA2T3	E11	FCBFA2T3E11	CAGCAGGAGGACTCCAGCGAG
GLIS2	E2	RGLIS2E2	GCTTCCTGCTGAACTCCAAGTTCC
GLIS2	E3	RGLIS2E3	GACTTCCAGCCACTGCGCTATTT
AML1	E5	FAML1E5c	GGGCCCCGAGAACCTCGAAATC
ETO	E2	RETOE2c	(ATC)G TACTGAGAAGCACTCCACAATGCCA G
PAX5	E4	PAX5E4Fc	CAGCTTCCAGTCACAGCATAGGCT
CHIC2	E3	CHIC2E3Fc1	GCCAGTTATTTGCCTCAGTAAAAGACAG
MNX1	E1	MNX1E1Fc	CCTAAGATGCCCGACTTCAACTGCT
MN1	E1	MN1E1Fc	AGAACCCCAACAGCAAAGAAGGCT
TEL (ETV6)	E3	ETV6E3Rc	(GCT)TGCAGCCAATTTACTGGAGCAGG
TEL (ETV6)	E3	ETV6E2Rc	(CAG)GAACGAATTTTCATATACACTCCAGAG AGC
SET	E7	FSETE7c	TGATGAAGGGGAGGAAGGAGAGGAA
SET	E7	FSETE7c2	ATGAAGGGGAGGAAGGAGAGTCCG
DEK	E9	FDEKE9c	CACAATGAAACAGATTTGCAAAAAGGAA
DEK	E9	FDEKE9c2	CACAATGAAACAGATTTGCAAAAAGTCCG
CAN	E17	RCANE17c	(TCG)CTTCATGGAGATATAAGTAGCCTGAA
CAN	E18	RCANE18c	(GAA)ATTCGGCGCCTTCATCAGTATGTG
NPM1		FMutDNPM1	ACCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGCCTG
NPM1		FMutJNPM1	ACCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGTATG
NPM1		FMutANPM1	ACCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGTCTG
NPM1		FMutBNPM1	ACCAAGAGGCTATTCAAGATCTCTGCATG
NPM1		RmutNPM1	GCAGTGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG
FIP1L1	E12	FIP1E12F	GGGCAAATGAGAACAGCAACATACAG
PDGFRA	E12(i1)	PDGFAE12R	CTGCCTTATGACTCAAGATGGGAGTTTC
TPM3	E8	TPME8F	TGGA AAAAGACAATTGATGACCTGGAAG
CCDC6	E1	CCDC6E1F	TGCGCAAAGCCAGCGTGACCATC
CCDC6	E7	CCDC6E7F	CGAGTTCAAGCAGGCCTATATCACCTG
PDGFRB	E11	PDFGBE11R	CCTTGCCCTTTAAGGTGGTGGTG
c-MYB	E8	MYBE8F	AGCTAAAAGGACAGCAGGTGCTACCA
GATA1	E5	GATA1E5R	ATTGTCAGTAAACGGGCAGGTA CTCACT
ZMYM2	E16	ZMYM2E16F	ATTCCTGTTCTACTACAGTTCTGTTCT
CNTRL	E40	CNTRLE40F	CAGTATGAGTACACGGAGCTCAAGAAAACAG
TRIM24	E9	TRIM24E9F	CCAGCAACCTTCCATCTCTCATCAG
TRIM24	E10	TRIM24E10F	TTCTTGGCTCAACAAGCCATAAAAACAG
TRIM24	E11	TRIM24E11F	GGTCTTATAATCTTCCCTCTCTTCCGGAT
FGFR1OP	E5	FGFR1OPE5F	AAGGGCCAACCACTGGGGAA
FGFR1OP	E6	FGFR1OPE6F	AAAACAAGTGACAGACAACACCAAGTAAG
FGFR1OP	E7	FGFR1OPE10F	CGGGCAGAAGGCTGGTGACAAG
FGFR1	E10	FGFR1E10R	GTGTCTGCTGACTCCAGTG CATCC
EML1	E17	EML1E17F	CAGCTCTCTGTAATGCGATACTCACCAG
ZMIZ1	E18	ZMIZE18F	CCGCAGAGCACTGTATCACGAAAA
RCSD1	E3	RCSD1E3F	CTGGGCCAGAATGGTGAGGAG
SFPQ	E9	SFPQE9F	GGTTCATGATGGGAAGTGACATG
FOXP1	E19	FOXP1E19F	GCACACCTCTCAATGCAGCTTTACAG
SNX2	E3	SNX2E3F	CGTGATCTTTGATAGATCCAGGGAAGAG
INPP5D	E9	INPP5DE9F	TGAGGACAAGTTCTACAGCCACAAGAAAA

RANBP2	E18	RANBP2E18F	ACATTTTCATGGGGCTCCACTAACAG
MLF1	E2	MLF1E2R	TGAGTCCATTCTTGACACCGAG
ARNT	E2	ARNTE2R	AAATGACATCAGATGTACCATCACTGGG
PDE4DIP	E19	PDE4DIPE19F	GATGTCAGCATACCCAGATCCACATTAG
NDE1	E6	NDE1E6F	GTTTCAGAGACTGAAGGATGAAGCCAGAG
MLL	E9	FMLLE9b	ATCCCTGTAAAACAAAACAAAAGAAAAG
MLL	E10	FMLLE10b	AGTCCACAGGATCAGAGTGGACTTTAAG
MLL	E11	FMLLE11b	CTCTGTGCCAGTAGTGGGCATGTAGAG
MLL	E12	FMLLE12b	GTGGAAGGCAACATCAGGCTACAAAAG
PICALM (PICALM-AF10)	E16	PICALME16	ACCGCTTGGAAATGCTGCAACAATG
PICALM (PICALM-AF10)	E18	PICALME18	CCAACAGGCATGATAGGATATGGAATT
PICALM (PICALM-AF10)	E19	PICALME19	CTTTGGCCCTGTATCAGGAGCACAG
AFF1/AF4	E4	RAF4E4	CAGACCTACTCCAATGAAGTCCATTG
AFF1/AF4	E5	RAF4E5	GAAATGACCCATTCATGGCCGCC
AFF1/AF4	E6	RAF4E6	GACTCTCAGCATGTACAGTTCTGTAAC
AFF1/AF4	E7	RAF4E11	CCTGAGCCTCCAACAACAAAACAAATG
MLL	E3	RMLLE3	GATGAGCAATTCTTAGGTTTTGGCTCA
MLLT3/AF9	E4	RAF9E4	GAAGAACCTAGGAAAGTCCGCTTTG
MLLT3/AF9	E5	RAF9E5	GACCCTAATAGGAGTATTCATACCAGC
MLLT3/AF9	E6	RAF9E6	TCTGAACAACCCAGTCCCTGCCAG
MLLT3/AF9	E9	RAF9E9	ATTCTTGAAGTGAAAAGTCCAATAAAGCAA
MLLT3/AF9	E10	RAF9E10	GCATACCTAGATGAACTGGTAGAGC
MLLT1/ENL	E2	RENLE2	TGCACCGTCCAGGTGAGGTTAGA
MLLT1/ENL	E4	RENLE4	GAGGAGCCGAGGAAGGTCTGCTT
MLLT1/ENL	E5	RENLE5	GTGATGGTAATGCCCGAAGGAGC
MLLT1/ENL	E6	RENLE6	GACGCCAACAAGGAGAGCAGCAA
MLLT1/ENL	E7	RENLE7	TCTGCCCAGTCAAGCCCGTCCAA
MLLT10/AF10	E4	RAF10E4	AGATGTGAACTTTGTCCCATTAAGGAT
MLLT10/AF10	E6	RAF10E6	ACTTGCTACATTTGTGATGAACAAGGAAG
MLLT10/AF10	E9	RAF10E9	AAATATAAAGAGAAGGACAAACACAAACAGA
MLLT10/AF10	E10	RAF10E10	ACTTATACAAGCACTAGCAACAACCTCTATA
MLLT10/AF10	E16	RAF10E16	GCAAATACTCTATCTGGATCTTCTCTC
MLLT4/AF6	E2	RAF6E2	GATTTGGAGTTCATGGAGTGATGAG
ELL	E2	RELLE2	GATTCTGTTTCACTGAGGCCATCTATC
ELL	E3	RELLE3	CACATCTCCATCCCCAGCCTGA
ELL	E6	RELLE6	GTGGCCAACATGAGTGCTAAGGAC
EPS15/AF1P	E2	REPS15E2	TTATCAAGTGGGAATCCTGTATATGAAAAAT
EPS15/AF1P	E6	REPS15E6	CATGATACCAGTAGTCCTTTGCTAATC
MLLT6/AF17	E8	RAF17E8	AGTCGAAAGGACAAAGAACGCCTTAAG
MLLT6/AF17	E9	RAF17E9	GTCTCCTCCTCGGCTTCTCTTC
MLLT6/AF17	E12	RAF17E10	GTGTTTTCTCTGGCTGGCTCTACC
SEPT6 / SEPTIN6	E2	RSEPT6E2	GGTGAAGGTTGCCGAAGTGTCCC
MLLT11/AF1Q	E2	RAF1QE2	GAAGCTATGAGGGACCCTGTGAG
CIP2A / KIAA1524	E17	RCIP2AE17	GCACGGACACTTGCTAGTATGTTG
AFF4/AF5Q31	E4	RAFF4E4	GCATCAGCTTCTGGTGATGTGAGC
AFF4/AF5Q31	E5	RAFF4E5	GAGATGACGCATTCATGGCCTCC
AFF4/AF5Q31	E6	RAFFEE6	GAGTCTCAGCAGTCCAATTTTGGC
ARHGAP26/GRAF	E19	RGRAFE19	ATATTTAACACCGTGCCCGATATGCC
MAPRE1	E2	RMAPREE2	AAGATGGCAGTGAACGTATACTCAACG
MAPRE1	E4	RMAPREE4	ATAATTCCTGTGGACAAATTAGTAAAAGGA
MAPRE1	E6	RMAPREE6	GTCAACGTATTGAAACTTACTGTTGAAGAC
SEPT5/PNU TL1/hCDCRel 1/CDCREL/AF22	E3	RSEPT5E3	GACATTGACAAGCAGTACGTGGGC

SEPT9/MSF/MSF1/AF17q 25/KIAA0991/PNUTL4	E2	RSEPT9E2	GAGGCACGCGGACCTCCAGTGGC
	E3	RSEPT9E3	CCTTGAAAAGATCTTTTGAGGTCGAGG
TET1/CXXC6	E9	RTET1E9	GAAAAAAACCTTGAAGATAACTTACAGAGTT
AFF3/LAF4	E5	RLAF4E5	GAGAGTAGATCTGGAGAAACCAACAG
AFF3/LAF4	E6	RLAF4E6	GAGATGACCTGGCTTCCACCACT
AFF3/LAF4	E10	RLAF4E10	CAGGCAGCTCAGAGAACGGCTCT
CASC5/AF15Q14	E12	RCASC5E12	ATTTTTGATCACCATACTGAAGAGGATATAG
FOXO3/AF6Q21	E3	RFOXO3E3	AACTCCATCCGGCACAACCTGTC
MAML2	E2	RMAML2E2	CTCCAGGGTTCCTTGAAAAGAAAACAG
MAML2	E3	RMAML2E3	GATCAACACTCTGTGGTAGGCCAG
NRIP3	E2	RNRIP3E2	CAACCTCATAATATTCTGCAGAGGGCG
ARHGEF17	E2	RARHG17E2	GACATGCGGAAGCACGTGGCCAT
ARHGEF17	E3	RARHG17E3	GGCTACATGCAGCCGCTGAAGCA
ARHGEF17	E4	RARHG17E4	TTCTCCAAGGATGTCTAGTAAACATC
ARHGEF17	E5	RARHG17E5	CAAAGCATGCGTGAGAACAAGGAG
C2CD3	E13	RC2CD3E13	CCAGAAGTCATTGGATCTGTGTCAC
C2CD3	E14	RC2CD3E14	GTAACCATGGAGCTTATTACAGATAACAAA
C2CD3	E15	RC2CD3E15	GTGATTCCTGTCTCTGTCTTCC
C2CD3	E17	RC2CD3E17	GCAGAGGACCGAGGAAATGGACT
ARHGEF12 / LARG	E11	RARG12E11	GATGGAGCTGTAGTTACACCCTCC
ARHGEF12 / LARG	E12	RARG12E12	AGTCCAAGAGTGGCCAAAAGAG
ARHGEF12 / LARG	E13	RARG12E13	GACACTCAATCACTTGTGCGGAAGTC
CBL	E10	RCBLE10	GTGGAACGGCCGCCTTCTCCATT
DCPS	E2	RDCPSE2	GTGAATGAGGCCTCTGGGGATGG
RCSD1	E2	RCSD1E2F	AGGCGGCTGCAGCCAAGGAG
ZC3HAV1	E12	ZC3HAV1E12F	ATGAAACTCATGAAAACAAATACGGAAAAG
EBF1	E10	EBF1E10F	AAGGAACACCAGGCAGATTCATTTATACAG
EBF1	E15	EBF1E15F	CCAACGGGAACAGCCTGCAAG
EBF1	E14	EBF1E14F	CTGCCAACTCCCCCTATGCCA
ZEB2	E10	ZEB2E10F	CCTTCTGCGACATAAATACGAACACACAG
EBF1	E13	EBF1E13F	GCATCACAAGCCACCAATCAGG
SSBP2	E16	SSBP2E16F	AATTTCTTAAATCCTTTTCAGAGTGAGAGT
SSBP2	E6	SSBP2E6F	GCCCCATTGAGGATACCTAATCAG
ATF7IP	E13	ATF7IPE13F	TCGGCAGGTCAATCCCCAAAATA
PAX5	E5	PAX5E5F	CCAACAAGCGCAAGAGAGACGAAG
SSBP2	E8	SSBP2E8F	GGAATGGTGCCCTTAGGACCACAG
SSBP2	E10	SSBP2E10F	CCAAACCAACAAATGCCAATTCA
STRN3	E9	STRN3E9F	CATGAAGGTGCAAGAGCAGAGGAAG
STRN3	E8	STRN3E8F	GAAAGGGGAAGAAAGGGGTGAAGA
SPAG9	E26	SPAG9E26F	ACATTGAGCCTTATGTAAGCAAAATGTTAG
ABL2	E5	ABL2E5R	GTGTATGTGACTGCTGAGAGCCGCT
ABL2	E3	ABL2E3R	AAGCTTTGCATCGTCCCTATGGTTG
PDFGB	E9	PDFGBE9R	TCCCTGTCCGAGTGCTGGAGC
CSF1R	E12	CSF1RE12R	AAGCCCAAGTACCAGGTCCGCT
JAK2	E15	JAK2E15R	ATATTCTGGTTCAGGAGTTTGAAAATTTG
JAK2	E18	JAK2E18R	AAGCTACAATTTTATGAAGATAGGCATCAG
NTRK3	E15	NTRK3E15R	ATGTGCAGCACATTAAGAGGAGAGACAT

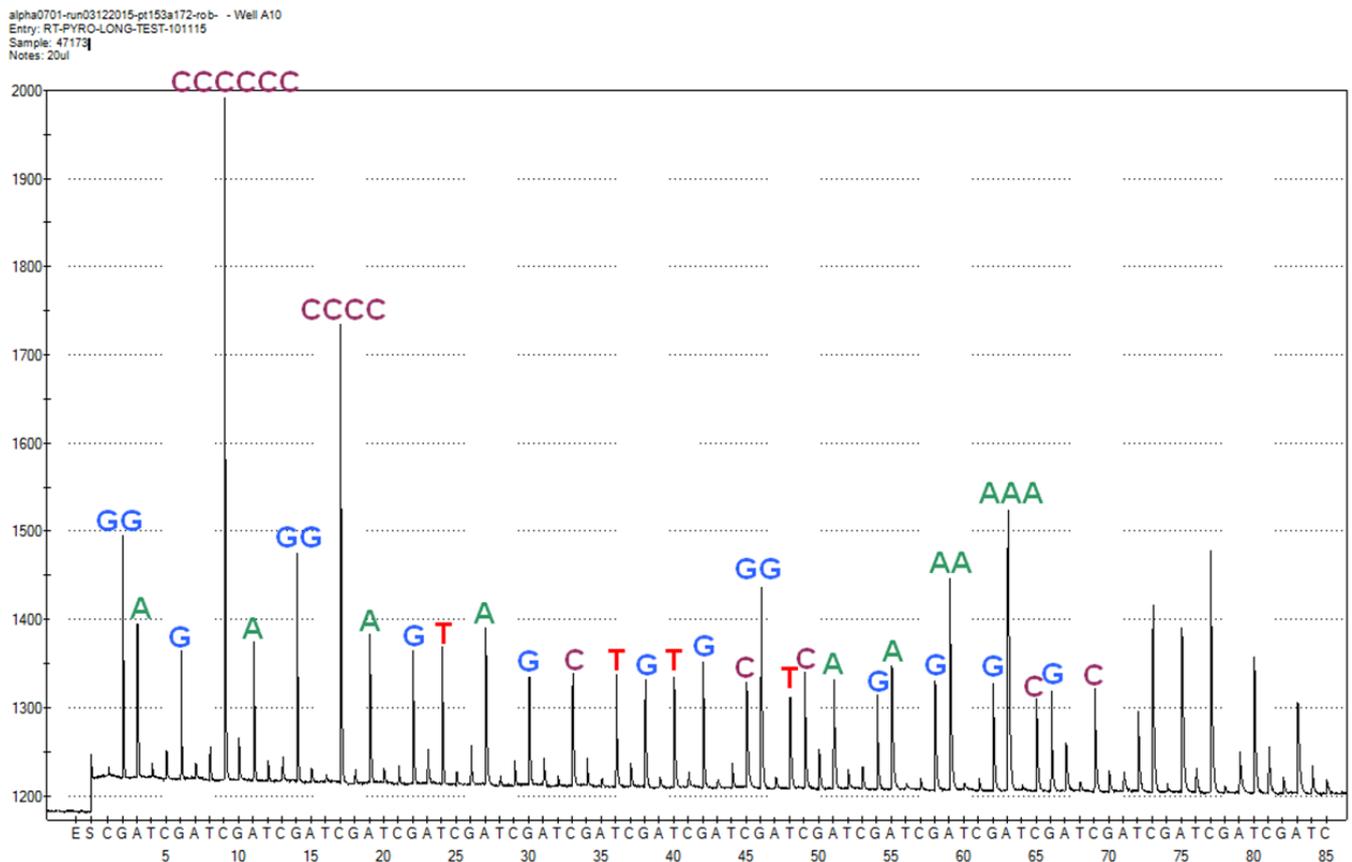
NTRK3	E14	NTRK3E14R	GTCCCGTGGCTGTCATCAGTGG
--------------	-----	-----------	------------------------

Toutes les sondes présentes dans le mix RT-MLPA sont des oligonucléotides (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany) composées d'une région spécifique complémentaire avec le cDNA et fusionnées à une extrémité 5' ou 3'. Les sondes à gauche sont des « unmodified DNA oligos » et ont la même extrémité GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA en 5'. Les sondes à droite sont des « modified DNA oligos » avec la même extrémité TCCAACCCTTAGGGAACCC en 3' et un phosphate en 5'.

Ainsi toutes les sondes 3' ont été phosphorylées à leur extrémité 5' pour permettre la réaction de ligation. Enfin toutes les sondes ont été réunies pour constituer un pool avec une concentration finale de 1fmole/ μ L chacune dans 10mM de Tris / 1mM d'EDTA pour créer le mix de RT-MLPA.

VIII) Identification du transcrit de fusion

Une fois la séquence du transcrit de fusion révélée par pyroséquençage, il faut analyser le pyrogramme (Figure 22) afin d'identifier ce transcrit de fusion. Il s'agit d'analyser base par base le pyrogramme afin de retrouver la séquence complète, sachant que la hauteur de chaque pic est proportionnel au nombre de bases insérées.



Grâce à la lecture du pyrogramme de gauche à droite, nous retrouvons sur cet exemple la séquence : **GGAGCCCCCAGGCCCCAGTAGCTGTGCGGTCAGAGAAGAAACGC** Il faut ensuite trouver à quel transcrit cette séquence correspond. Pour cela, on recherche la séquence obtenue dans le tableau excel (Tableau 5) qui regroupe les gènes et les séquences correspondantes selon les exons impliqués.

1	Gene	Exon	Oligo	Seq Unileft	Seq Spé	Seq Uni right	Sequence complete
70	TAL	E4	RTALE4	-	GATGACCGAGCGCCGCCGAGC	TCCAAACCTTAGGGAACCC	GATGACCGAGCGCCGCCGAGCTCCAAACCTTAGGGAACCC
71	TAL	E5	RTALE5	-	GTCCCAACCAAAAGTTGTGCG	TCCAAACCTTAGGGAACCC	GTCCCAACCAAAAGTTGTGCGTCCAAACCTTAGGGAACCC
72							
73	MDZ	E16	FMDZE16	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	AAGAAGATGAAGTTCAGATGATGCTGATG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA AAGAAGATGAAGTTCAGATGATGCTGATG
74	CBP	E2	RCBPE2	-	ATTTTGGATCATTGTTGACTTGGAAAATG	TCCAAACCTTAGGGAACCC	ATTTTGGATCATTGTTGACTTGGAAAATGTCCAAACCTTAGGGAACCC
75	CBP	E3	RCBPE3	-	ATGGGAATAACTGGGAACACAAGTCC	TCCAAACCTTAGGGAACCC	ATGGGAATAACTGGGAACACAAGTCC TCCAAACCTTAGGGAACCC
76							
77	NUP98	E10	FNUP98E10	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	TACAACCACTGGCGGCTCTTTG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA TACAACCACTGGCGGCTCTTTG
78	NUP98	E11	FNUP98E11	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	GCTTGGTGCAGGATTTGGAAACAG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA GCTTGGTGCAGGATTTGGAAACAG
79	NUP98	E12	FNUP98E12	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	GGAGCCCCCAGGCCAGTAG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA GGAGCCCCCAGGCCAGTAG
80	NUP98	E13	FNUP98E13	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	GATGTCAGACCTTAAGAGAAGGAAG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA GATGTCAGACCTTAAGAGAAGGAAG
81	NUP98	E14	FNUP98E14	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	AGCCAATGGACATTCATGCCAA	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA AGCCAATGGACATTCATGCCAA
82							
83	NSD1	E6	RNSD1E6	←	CTGTGCGGTTCAGAGAAGAAACGC	TCCAAACCTTAGGGAACCC	CTGTGCGGTTCAGAGAAGAAACGCTCCAAACCTTAGGGAACCC
84							
85	JARID1A	E27	RJARID1A	-	GATGACAGCATGGAAGAGAAACACTA	TCCAAACCTTAGGGAACCC	GATGACAGCATGGAAGAGAAACACTATCCAAACCTTAGGGAACCC
86							
87	HDXA9	E1	RHDXA9E1	-	TTGATAGAGAAAAACAACCCAGCAG	TCCAAACCTTAGGGAACCC	TTGATAGAGAAAAACAACCCAGCAGTCCAAACCTTAGGGAACCC
88	HDXA9	E2	RHDXA9E2	-	ATAACCCAGCAGCAACTGGCTTC	TCCAAACCTTAGGGAACCC	ATAACCCAGCAGCAACTGGCTTCCAAACCTTAGGGAACCC
89							
90	TOP1	E8	RTOP1E8	-	GATGGTAAATGAAAAAACCAAGAAT	TCCAAACCTTAGGGAACCC	GATGGTAAATGAAAAAACCAAGAAT TCCAAACCTTAGGGAACCC
91							
92	DDX10	E6	RDDX10E6	-	TTCTTGATGAAGCAGATAGAATCTGG	TCCAAACCTTAGGGAACCC	TTCTTGATGAAGCAGATAGAATCTGGTCCAAACCTTAGGGAACCC
93	DDX10	E7	RDDX10E7	-	CACCCCTGCCATTTGGAAACAGA	TCCAAACCTTAGGGAACCC	CACCCCTGCCATTTGGAAACAGTCCAAACCTTAGGGAACCC
94							
95	RAP1GDS1	E2	RAF1GDS1E2	-	ATAATCTCAGTACCTTGAAGAAGCTG	TCCAAACCTTAGGGAACCC	ATAATCTCAGTACCTTGAAGAAGCTGTCCAAACCTTAGGGAACCC
96	RAP1GDS1	E3	RAF1GDS1E3	-	ATACGGAAACAAGTGAATAAATCCAAGC	TCCAAACCTTAGGGAACCC	ATACGGAAACAAGTGAATAAATCCAAGCTCCAAACCTTAGGGAACCC
97							
98	F2RY8	E1	FP2RY8E1	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA	CTTCTGCGCTCTCTGCACAG	-	GTGCCAGCAAGATCCAATCTAGA CTTCTGCGCTCTCTGCACAG

Séquence: **GGAGCCCCCCAGGCCCCAGTAG** | **CTGTGCGGTTCAGAGAAGAAACGC**
NUP98 E12 NSD1 E6

La séquence obtenue pour l'exemple correspond au transcrit de fusion *NUP98* Exon 12 – *NSD1* Exon 6.

Concernant les analyses réalisées en routine au diagnostic des LA au laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille, nous retrouvons pour les LAM :

Anomalies recherchées	Technique utilisée	RT-MLPA
Duplications de <i>MLL</i>	RT-PCR	DéTECTABLE
Mutations de <i>NPM1</i>	Analyse de fragment puis Sanger (si positif)	DéTECTABLE (sauf variants rares non suivis en MRD)
<i>AML1-ETO</i>	RQ-PCR	DéTECTABLE
<i>CBFβ-MYH11</i>	RQ-PCR	DéTECTABLE
<i>PML-RARα</i>	RT-PCR (envoyé à Paris)	DéTECTABLE
<i>MLL-AF9</i>	RQ-PCR	DéTECTABLE
<i>DEK-CAN</i>	RT-PCR	DéTECTABLE

Pour les LAL B :

Anomalies recherchées	Technique utilisée	RT-MLPA
<i>BCR-ABL</i>	RT-PCR	DéTECTABLE
<i>MLL-AF4</i>	RT-PCR	DéTECTABLE
<i>TEL-AML1</i>	RQ-PCR (TEL exon 4 non détecté)	DéTECTABLE (TEL exon 4 détecté)
<i>E2A-PBX1</i>	RQ-PCR	DéTECTABLE

Pour les LAL T :

Anomalies recherchées	Technique utilisée	RT-MLPA
<i>BCR-ABL</i>	RT-PCR	DéTECTABLE
<i>SIL-TAL</i>	RQ-PCR	DéTECTABLE
<i>NUP214-ABL</i>	RQ-PCR (<i>NUP214</i> exon 32 non détecté)	DéTECTABLE (<i>NUP214</i> exon 32 détecté)

Nous allons pouvoir tester la RT-MLPA sur des cohortes de patients dont les résultats cytogénétiques et moléculaires sont connus, notamment les protocoles français ALFA0701 et ELAM02. En effet, celle-ci permet en une seule analyse de détecter tous ces transcrits.

RESULTATS

I) Analyse du protocole ALFA0701 :

Nous avons analysé 244/278 patients du protocole ALFA0701, les 34 patients exclus de l'étude étant ceux dont le nombre de copies d'*ABL* était inférieur à 10 000 copies.

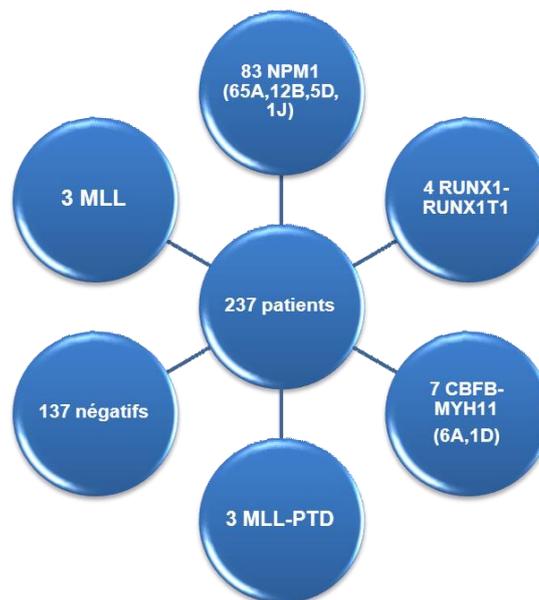


Figure 23 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour le protocole ALFA0701

La RT-MLPA confirme les résultats déjà connus (Figure 23) avec 83 mutations de *NPM1* (83/85 cas), 4 *RUNX1-RUNX1T1* (4/4 cas), 7 *CBFB-MYH11* (7/7 cas), 3 réarrangements de *MLL* (3/3 cas), 3 duplications de *MLL* (3/3 cas) et 137 négatifs. Elle permet également de détecter le type de mutations de *NPM1* dans la limite des 4 formes mutées de *NPM1* c'est-à-dire les mutations de type A,B,D,J et d'identifier la forme du transcrit *CBFB-MYH11*.

Toutefois deux variants rares de *NPM1* n'ont pas pu être détectés en RT-MLPA car les séquences n'étaient pas répertoriées dans le pool des sondes oligonucléotidiques, étant donné la rareté de ces variants. Ces transcrits sont alors uniquement détectables par analyse de fragments puis le type de mutation est identifié par Sanger.

Ainsi, les résultats retrouvés en RT-MLPA sont concordants avec les résultats de la cytogénétique et de la biologie moléculaire (Figure 23) sauf pour les variants rares des mutations de *NPM1*.

Par ailleurs, cette technique de RT-MLPA a permis d'identifier en plus, par rapport aux résultats de routine conventionnelle (Figure 24) une duplication de *MLL*, un transcrite *CALM-AF10* alors que la translocation t(10;11)(p13;q21) n'avait pas été retrouvée dans le caryotype complexe, un transcrite *CBFB-MYH11* alors que l'inversion du chromosome 16 n'avait pas été mise en évidence au caryotype standard, de même pour les transcrits *NUP98-NSD1* et *ETV6-NTRK3*.

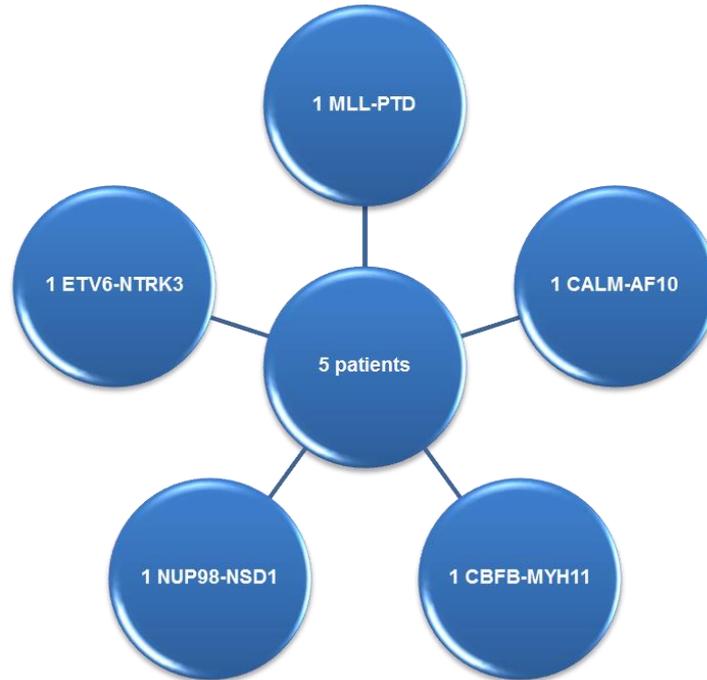


Figure 24 : Résultats retrouvés en RT-MLPA pour le protocole ALFA0701 non retrouvés en technique conventionnelle

II) Analyse du protocole ELAM02 :

Les résultats retrouvés par RT-MLPA concordent avec les résultats des techniques conventionnelles (Figure 25) avec 12 mutations de *NPM1* (11/12 cas), 18 *RUNX1-RUNX1T1* (18/18 cas), 18 *CBFB-MYH11* (18/18 cas), 21 réarrangements de *MLL* (21/26 cas), 3 *DEK-CAN* (3/3 cas), 2 *CALM-AF10* (2/2 cas) et 101 négatifs.

Certains réarrangements de *MLL* (n=5) mis en évidence par FISH ou au caryotype n'ont pas pu être retrouvés en RT-MLPA. Les échantillons ont été envoyés à l'université de Francfort en Allemagne dans le laboratoire du Pr. Rolf Marschalek pour le séquençage des réarrangements de *MLL*. Ceci nous a permis de confirmer que les exons concernés n'étaient pas inclus dans l'analyse avec ce mix oligonucléotidique.

Par ailleurs, 1 mutation de *NPM1* n'a pas été retrouvée en RT-MLPA car il s'agit d'une mutation KM non retrouvée dans le mix oligonucléotidique.

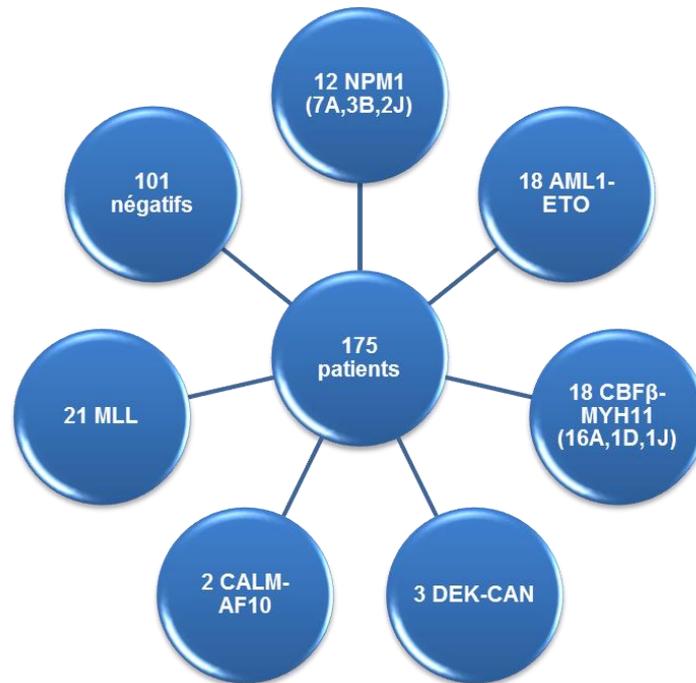


Figure 25 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour le protocole ELAM02

La RT-MLPA a permis de mettre en évidence 10 anomalies non recherchées ou non détectées (Figure 26) par technique classique : 3 mutations de *NPM1*, 1 duplication de *MLL* non vu en RT-PCR, 5 transcrits *NUP98-NSD1* et 1 *NUP98-JARID1A*. Elle a également permis de mettre en évidence 4 transcrits de fusion chimérique (Figure 26) *MN1-ETV6*, *MLL-CIP2A*, *cMYB-GATA1* et *MOZ-CBP* pour lesquels les translocations correspondantes ont été vues en cytogénétique. Toutefois, une mutation de *NPM1* identifiée en forme D par RT-MLPA a été vérifiée en séquençage Sanger et révèle une mutation de type 4.

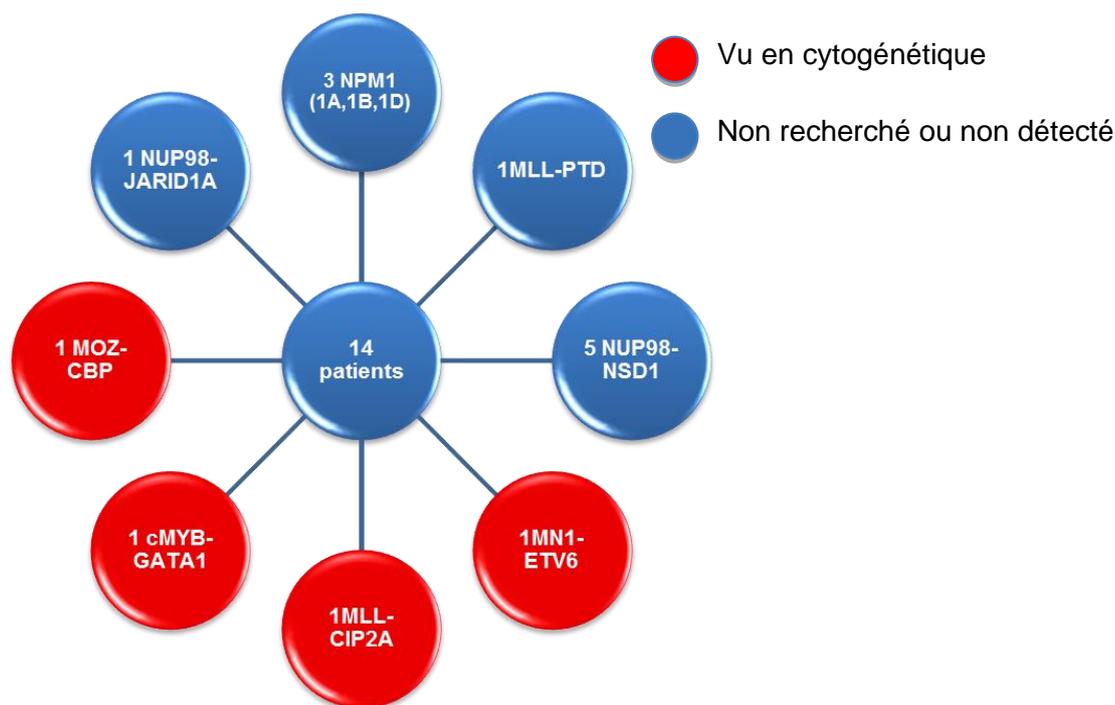


Figure 26 : Résultats retrouvés uniquement en RT-MLPA pour le protocole ELAM02

III) Application de la RT-MLPA au laboratoire du CHRU de Lille au diagnostic des LA :

Le nombre total de cas analysés est de 419 patients. Les résultats de la RT-MLPA concordent avec les techniques conventionnelles et comportent 39 mutations de *NPM1* (39/42 cas), 8 transcrits *RUNX1-RUNX1T1* (8/8 cas), 20 *BCR-ABL* (20/20 cas), 7 *CBFB-MYH11* (7/7 cas), 7 *ETV6-RUNX1* (7/7 cas), 2 *PML-RAR α* (2/2 cas), 11 duplications de *MLL* (11/11 cas), 6 réarrangements de *MLL* (6/6 cas), 1 *TCF3-PBX1* (1/1 cas) et 292 négatifs (Figure 27).

Parmi ces résultats au diagnostic de LA, 3 mutations de *NPM1* ont été rendues négatives par RT-MLPA alors qu'ils présentaient une mutation de *NPM1*. Il s'agissait toutefois de variants rares non répertoriés dans le mix oligonucléotidique.

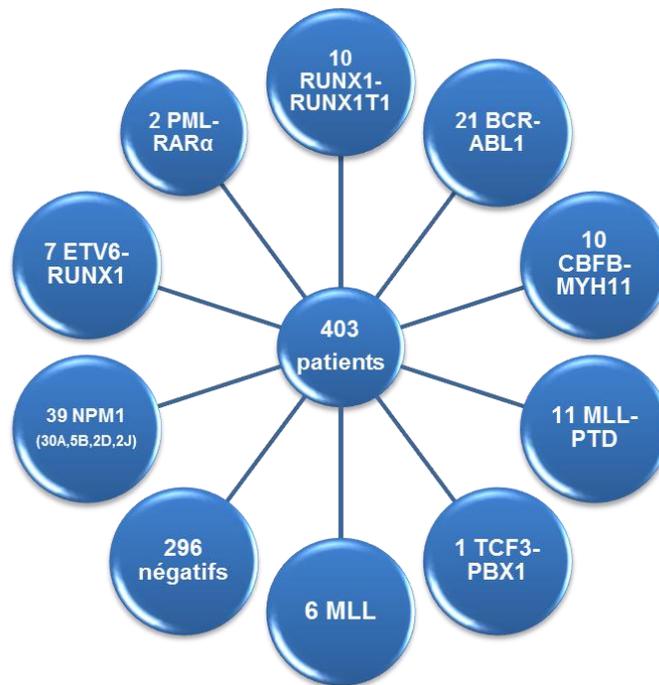
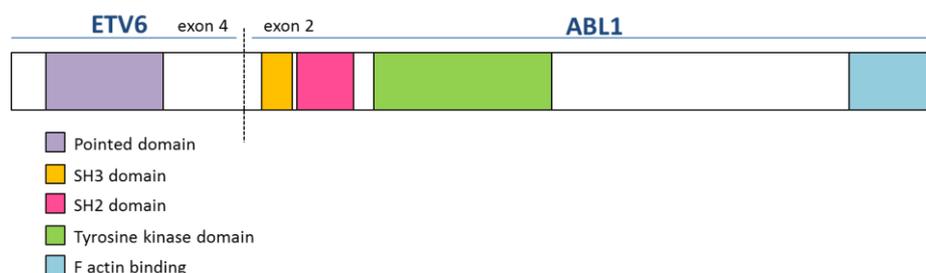


Figure 27 : Résultats concordants de la RT-MLPA pour la routine au laboratoire du CHRU de Lille

La RT-MLPA a permis de mettre en évidence 13 anomalies non recherchées ou non détectées par technique conventionnelle (Figure 29).

Nous pouvons distinguer les résultats concernant les LAL des LAM.

Concernant les LAL, nous avons détecté 1 *NUP214-ABL1*, 1 *EBF1-PDGFRB*, 2 *P2RY8-CRLF2*, 1 *ETV6-ABL1*, 1 *ETV6-RUNX1*, 1 *BCR-JAK2*. Parmi ces transcrits, 5 peuvent être ciblés par des ITK tel que l'imatinib ou des inhibiteurs de JAK2 (Figure 28).



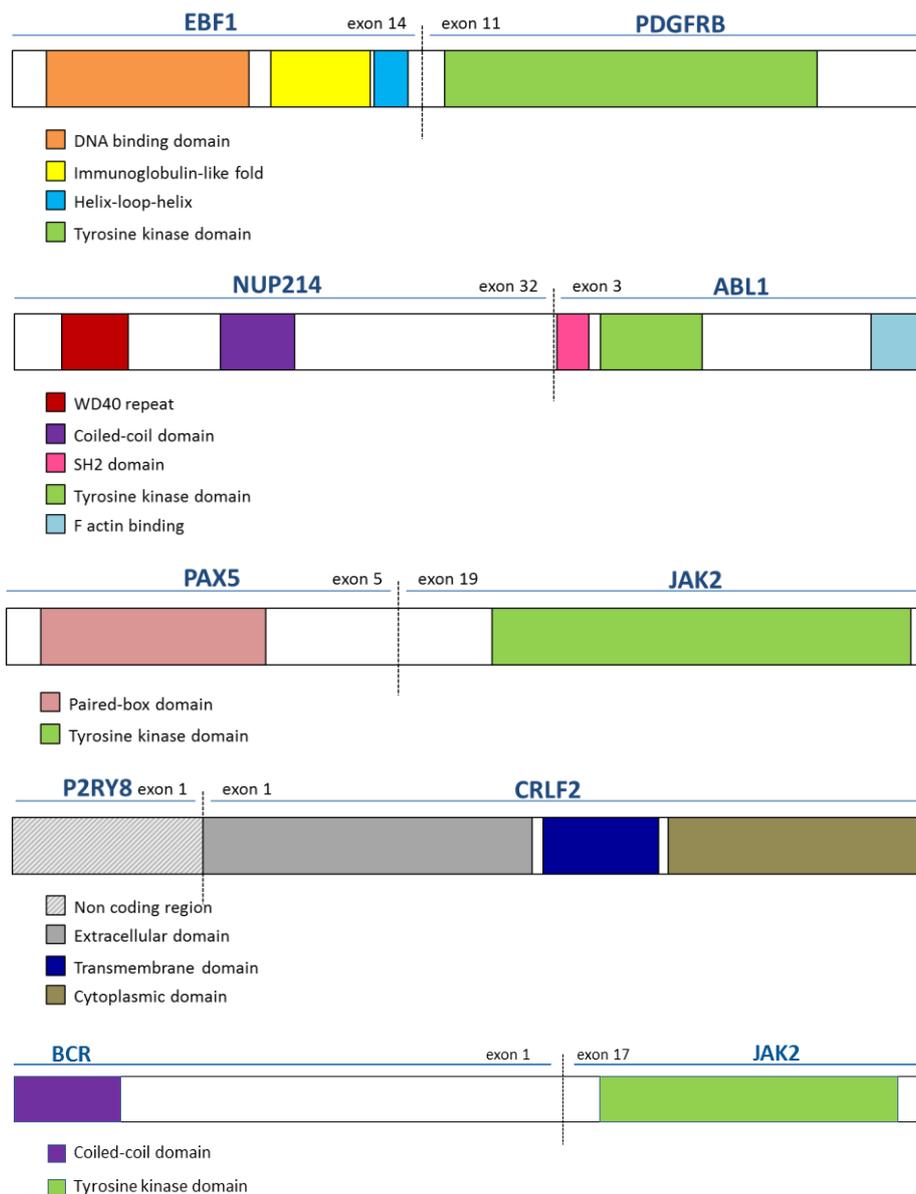


Figure 28 : Transcrits de fusion *BCR-ABL1* like retrouvés en routine

Concernant les LAM, ont été retrouvés 1 duplication de *MLL*, 1 réarrangement de *MLL*, un transcrit *CBFB-MYH11* non mis en évidence au caryotype et une mutation de *NPM1* type A.

Nous avons également mis en évidence 2 transcrits de fusion chimérique : 1 *PAX5-ETV6* et 1 *PAX5-JAK2* pour lesquels les translocations correspondantes avaient été mises en évidence au caryotype.

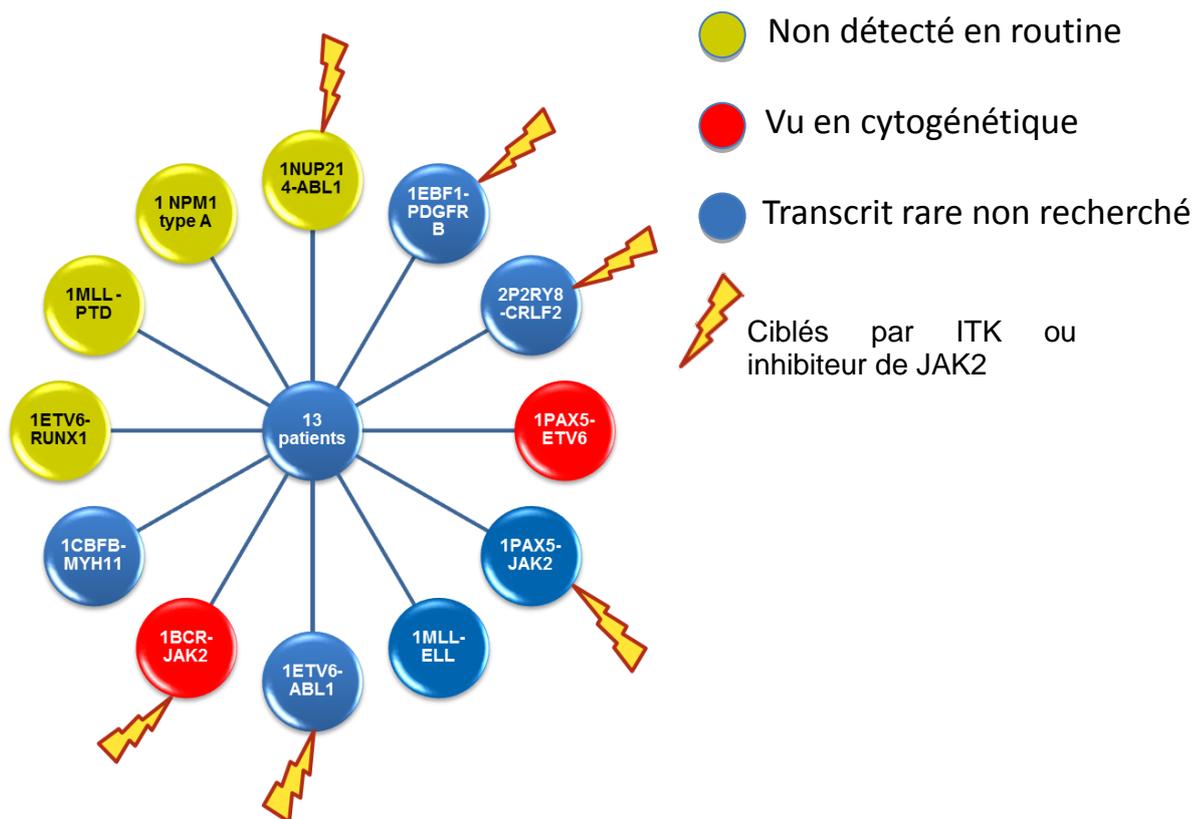


Figure 29 : Résultats retrouvés uniquement en RT-MLPA pour la routine au laboratoire du CHRU de Lille

Au final, l'analyse de l'ensemble des patients a permis de mettre en évidence des transcrits de fusion non détectés ou non recherchés au laboratoire par techniques conventionnelles (cytogénétiques et moléculaires) pour 13 patients sur 419 testés.

IV) Synthèse des résultats retrouvés en RT-MLPA et technique conventionnelle :

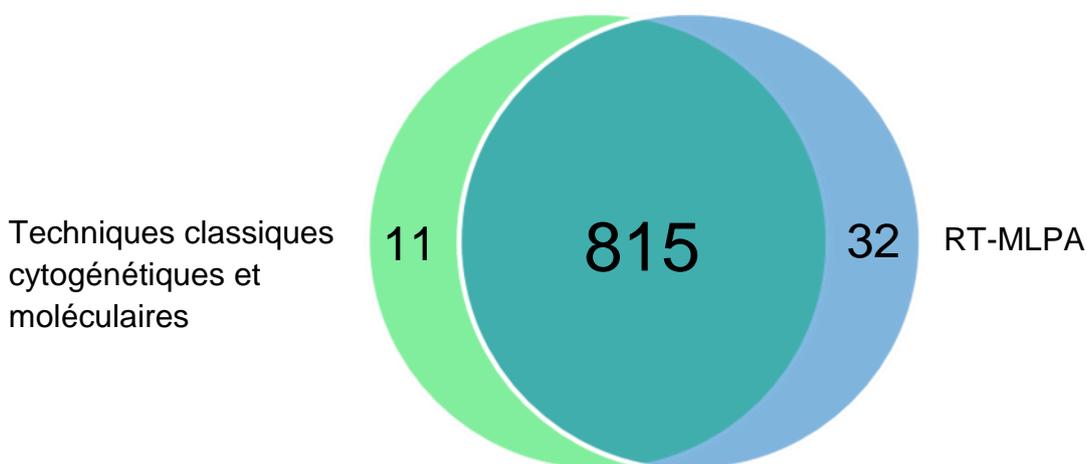


Figure 30 : Synthèse des résultats retrouvés dans notre étude

Nous allons décrire pour les résultats retrouvés uniquement en techniques classiques et ceux retrouvés uniquement en RT-MLPA les causes de non détection selon la technique.

Tableau 6 : Identification des résultats retrouvés uniquement en techniques conventionnelles

	Résultats CG et BM classiques	Résultats RT-MLPA	Conclusion
Patient 1,2,8,9,10,11	<i>NPM1</i> variant rare	négatif	Absent du design
Patient 3	<i>MLL-AF9</i>	négatif	Exon absent du design
Patient 4	<i>MLL-AF10</i>	négatif	Exon absent du design
Patient 5	<i>MLL-ELL</i>	négatif	Exon absent du design
Patient 6	<i>MLL-AF10</i>	négatif	Exon absent du design
Patient 7	<i>MLL-AF10</i>	négatif	Exon absent du design

Tableau 7 : Identification des résultats retrouvés uniquement par RT-MLPA

Patients	Résultats CG et BM classiques	Résultats RT-MLPA	Conclusion
Patient 1	négatif	Positif <i>MLL</i> -PTD	FISH non réalisée
Patient 2	<i>CBFB-MYH11</i> non recherché par FISH	Transcrit <i>CBFB-MYH11</i> positif	Inv(16) non vue en cytogénétique
Patient 3	<i>CALM-AF10</i> non recherché	Transcrit <i>CALM-AF10</i> positif	Non vu en cytogénétique conventionnelle
Patient 4	<i>NUP98-NSD1</i> non recherché	Transcrit <i>NUP98-NSD1</i> positif	FISH non réalisée
Patient 5	<i>ETV6-NTRK3</i> non recherché	Transcrit <i>ETV6-NTRK3</i> positif	Non vu en cytogénétique conventionnelle
Patient 6	<i>NPM1</i> non recherché	Mutation de <i>NPM1</i> (type A)	
Patient 7	<i>NPM1</i> non recherché	Mutation de <i>NPM1</i> (type B)	
Patient 8	<i>NPM1</i> non recherché	Mutation de <i>NPM1</i> (type D)	
Patient 9	négatif	Positif <i>MLL</i> -PTD	FISH non réalisée

Patients	Résultats CG et BM classiques	Résultats RT-MLPA	Conclusion
Patient 10,11,12,13,14	<i>NUP98-NSD1</i> non recherché par FISH	Positif <i>NUP98-NSD1</i>	Non vu en cytogénétique conventionnelle (cryptique) FISH non réalisée
Patient 15	<i>NUP98-JARID1A</i> non recherché par FISH	Positif <i>NUP98-JARID1A</i>	Non vu en cytogénétique conventionnelle (cryptique) FISH non réalisée
Patient 16	<i>MN1-ETV6</i> non recherché	Positif <i>MN1-ETV6</i>	t(12;22)(p13;q12) vue en cytogénétique
Patient 17	FISH <i>MLL</i> non réalisée	Positif <i>MLL-CIP2A</i>	t(3;11) vue en cytogénétique Gène partenaire confirmée par RT-MLPA
Patient 18	<i>cMYB-GATA1</i> non recherché	Positif <i>cMYB-GATA1</i>	t(X;6) vue en cytogénétique
Patient 19	<i>MOZ-CBP</i> non recherché	Positif <i>MOZ-CBP</i>	t(8;16) vue en cytogénétique
Patient 20	FISH <i>BCR-ABL</i> non réalisé RQ-PCR <i>NUP214-ABL1</i> négatif	Positif <i>NUP214-ABL1</i> (voir annexe 1)	Exon 32 de <i>NUP214</i> non détecté par technique de routine
Patient 21	<i>EBF1-PDGFRB</i> non recherché	Positif <i>EBF1-PDGFRB</i> (voir annexe 1)	Del(5)(q32q33) non vue en cytogénétique
Patient 22	<i>P2RY8-CRLF2</i> non recherché	Positif <i>P2RY8-CRLF2</i> (voir annexe 1)	Non vu en cytogénétique conventionnelle
Patient 23	<i>P2RY8-CRLF2</i> non recherché	Positif <i>P2RY8-CRLF2</i>	Non vu en cytogénétique conventionnelle
Patient 24	<i>PAX5-ETV6</i> non recherché	Positif <i>PAX5-ETV6</i>	dic(9;12) vue en cytogénétique
Patient 25	<i>PAX5-JAK2</i> non recherché	Positif <i>PAX5-JAK2</i> (voir annexe 1)	Non vu en cytogénétique conventionnelle
Patient 26	<i>ETV6-AML1</i> négatif	Positif <i>ETV6-AML1</i>	Exon 4 de <i>ETV6</i> non détecté par technique de routine
Patient 27	<i>ETV6-ABL1</i> non recherché	Positif <i>ETV6-ABL1</i> (voir annexe 1)	FISH non réalisée

Patients	Résultats CG et BM classiques	Résultats RT-MLPA	Conclusion
Patient 28	<i>BCR-JAK2</i> non recherché	Positif <i>BCR-JAK2</i>	t(9;9) vue en cytogénétique
Patient 29	<i>CBFB-MYH11</i> non recherché par FISH	Transcrit <i>CBFB-MYH11</i> positif type E	Non vu en cytogénétique
Patient 30	FISH <i>MLL</i> non réalisée	Transcrit <i>MLL-ELL</i> positif	Non vu en cytogénétique
Patient 31	<i>MLL</i> -PTD négatif/douteux en RT-PCR	Positif <i>MLL</i> -PTD	Détection difficile en RT-PCR sur gel Point de cassure inhabituel → signal faible
Patient 32	Mutation de <i>NPM1</i> négative	Mutation de <i>NPM1</i> (type A)	Expression de la mutation de <i>NPM1</i> plus importante sur ARN que sur ADN

V) Importance et implications cliniques des anomalies moléculaires retrouvées uniquement en RT-MLPA

La mise en évidence d'un transcrit LAL-Phi like (Figure 28) constitue une alternative au traitement classique de chimiothérapie par une thérapie ciblée (Annexe 1).

Le transcrit *CBFB-MYH11* retrouvé en RT-MLPA et non vu en cytogénétique conventionnelle chez le patient 29 a permis de le reclasser sur le plan pronostique. Il était initialement inclus dans le protocole BIG1 qui exclut les patients CBF. Par ailleurs, ce patient devait bénéficier d'une allogreffe génoidentique avec conditionnement séquentiel type FLAMSA. Or, la greffe chez les patients présentant un transcrit *CBFB-MYH11* n'est pas recommandée en première RC (77), son indication vers l'allogreffe a donc été rediscutée.

La découverte d'une duplication de *MLL* chez le patient 31 non vue en cytogénétique conventionnelle a permis son inclusion dans un essai clinique de phase I testant un inhibiteur de *LSD1* (KDM1A), une histone déméthylase (82).

DISCUSSION

Les techniques de biologie moléculaire sont aujourd'hui incontournables dans le bilan initial d'une leucémie aiguë. Leur sensibilité élevée et la possibilité de les standardiser en ont fait des outils de choix dans l'évaluation diagnostique et pronostique des malades atteints de LA. De plus, 30 à 40% des LA présentent une translocation équilibrée induisant la fusion de deux gènes avec production d'un ARN chimérique. Ce transcrite est alors considéré comme un marqueur moléculaire. Ces marqueurs moléculaires conditionnent le pronostic et sont de plus en plus importants pour la stratification thérapeutique comme le montre la classification ELN.

Ainsi des transcrits de fusion de bon pronostic sont retrouvés en particulier *PML-RAR α* (leucémie promyélocytaire) permettant l'administration d'une thérapeutique ciblée (ATRA, Arsenic) et à moindre degré *CBF β -MYH11* et *AML1-ETO* déterminant l'indication de greffe (77).

Des transcrits de fusion de mauvais pronostic peuvent être identifiés comme les réarrangements impliquant *MLL*, les transcrits de fusion *CALM-AF10* et *DEK-CAN*. Ces transcrits de fusion sont recherchés au diagnostic depuis un certain nombre d'années selon le protocole européen (83).

L'objectif de cette étude était de déterminer l'apport de la RT-MLPA dans la prise en charge des LAM au diagnostic par rapport aux techniques cytogénétiques et moléculaires déjà en place en routine. Il s'agissait de déterminer sa faisabilité, les avantages et inconvénients de cette technique mais également de savoir si sa mise en place en routine permettrait d'apporter une plus-value dans les résultats rendus au diagnostic des LAM et notamment d'apprécier si elle pourrait être une alternative à la RT-PCR conventionnelle.

Dans notre étude, nous avons tout d'abord analysé 244 patients du protocole ALFA0701 par RT-MLPA, 195 patients du protocole ELAM02 et 419 patients de routine. Les résultats de la RT-MLPA confirmaient les résultats des techniques cytogénétiques et moléculaires conventionnelles dans la plupart des cas, ce qui démontre l'excellente spécificité de cette technique.

Les anomalies non retrouvées sont des réarrangements de *MLL* impliquant des exons non présents dans le mix oligonucléotidique de RT-MLPA. En effet, 5 réarrangements de *MLL* du protocole ELAM02 n'ont pas été détectés par RT-MLPA et après envoi en Allemagne au laboratoire du Pr. Rolf Marschalek pour séquençage, il est apparu que les exons concernés lors de ses réarrangements n'étaient pas retrouvés dans la liste des exons présents dans le mix oligonucléotidique. Le screening par FISH reste donc indispensable étant donné la variabilité des partenaires de *MLL* et des points de cassure génomique. La deuxième anomalie ne

pouvant être détectée par RT-MLPA concerne les variants rares de *NPM1*, en effet seules les mutations de type A, B, D, J peuvent être retrouvées. De ce fait, le screening des mutations de *NPM1* reste indispensable par analyse de fragments puis séquençage Sanger pour identifier le type de mutation.

Ceci montre une des premières limites de la RT-MLPA, il s'agit d'une technique ciblée prenant en compte des gènes et des points de cassure connus inclus dans le mix oligonucléotidique. Cependant, l'analyse a permis de montrer que la plupart des réarrangements peuvent être détectés en utilisant cette technique. Par ailleurs, la RT-MLPA est évolutive. Il est possible de modifier le mix oligonucléotidique, c'est-à-dire d'ajouter ou d'enlever des sondes afin d'optimiser la recherche des transcrits de fusion. Certains transcrits présentent des exons fusionnés pouvant varier d'un patient à un autre, il est donc indispensable d'ajouter les exons pouvant être impliqués dans les réarrangements afin de ne pas rendre de faux négatifs. De plus, certains transcrits jusqu'alors peu connus peuvent être rajoutés afin de les détecter au diagnostic. Nous pouvons citer l'exemple du transcrit *TCF3-HLF* qui n'est actuellement pas recherché en routine au laboratoire d'Hématologie de Lille. Cependant, il s'agit d'un transcrit qui confère un pronostic péjoratif dans les LAL B avec de graves hypercalcémies (84) (85) (86), il est donc important de pouvoir le détecter au diagnostic. Après revue de la littérature et analyse des points de cassure *TCF3-HLF* (87), les exons correspondants ont été ajoutés dans le mix oligonucléotidique. Cet exemple montre le caractère évolutif très important de cette technique. Par ailleurs, pour réaliser notre étude sur la RT-MLPA, nous avons utilisé le mix oligonucléotidique comprenant 220 sondes. Un nouveau mix de 240 sondes, par ajout de nouveaux transcrits LAL Phi-like, a été créé afin d'élargir la détection des transcrits de fusion impliquant les voies d'activation *ABL* et *JAK2* pouvant bénéficier d'une thérapie ciblée.

Les résultats retrouvés uniquement en RT-MLPA dans l'analyse des LAM au diagnostic (concernant les protocoles étudiés et la routine) ont permis de mettre en évidence 23 anomalies dont 17 non recherchées ou non détectées, 4 dont les translocations avaient été mises en évidence par cytogénétique et 2 anomalies rendues faussement négatives par les techniques de routine habituelles. La RT-MLPA permet de retrouver des transcrits non mis en évidence au diagnostic de LAM et d'apporter une information pronostique notamment pour les transcrits *NUP98-NSD1* (88) (89), *NUP98-JARID1A* (90) de mauvais pronostic ou encore *CBFβ-MYH11* (et le type de transcrit correspondant) de bon pronostic (91) (92).

La cytogénétique conventionnelle est habituellement considérée comme le gold standard pour la détection des réarrangements chromosomiques récurrents dans les leucémies aiguës. Elle est souvent considérée comme obligatoire au moment du diagnostic mais nécessite un haut niveau d'expertise et ne détecte pas les réarrangements cryptiques. Ainsi d'autres approches complémentaires comme la FISH sont donc souvent nécessaires mais le coût peut rapidement devenir prohibitif.

De ce fait, de nombreux marqueurs pouvant fournir des informations cliniques importantes ne sont pas testés et diminuent les chances pour le patient de bénéficier des traitements optimaux. Nos résultats suggèrent que la RT-MLPA pourrait être une solution à ce problème car c'est une technique rapide réalisable en 2 à 3 jours permettant la détection de réarrangements cryptiques équilibrés et déséquilibrés à l'origine de transcrits de fusion. Elle permet de détecter en une seule analyse un grand nombre de transcrits qui nécessiteraient habituellement plusieurs analyses. Ceci permet de réduire le délai de rendu de résultats, le coût et le temps de travail des techniciens liés à chaque analyse spécifique des transcrits recherchés mais également de screener un très grand nombre de transcrits.

L'analyse de cette grande cohorte a permis de démontrer que la RT-MLPA était supérieure à la cytogénétique et la RT-PCR pour la détection des transcrits de fusion dans les LAM. A l'exception de cas très rares avec des points de cassures génomiques atypiques, elle détecte de manière efficace la quasi-totalité des fusions qui ont été identifiés au diagnostic dans les protocoles étudiés et révèle 19 anomalies qui ont été ignorées.

Bien que sa sensibilité reste inférieure à celle de la RT-PCR conventionnelle, elle est néanmoins suffisante lorsqu'elle est appliquée à des échantillons de sang ou de moelle osseuse prélevés sur des patients atteints de leucémie au moment du diagnostic dans lequel le pourcentage de cellules tumorales est généralement élevé. Elle se révèle donc être une alternative de choix pour la RT-PCR par sa capacité à détecter de nombreux réarrangements pratiquement jamais recherchés en routine et par sa rapidité de réalisation. Toutefois, elle ne permettra pas le suivi de la maladie résiduelle car le nombre de copies détectées est trop faible. C'est donc une technique intéressante pour screener les anomalies au diagnostic mais qui ne sera pas utilisée pour le suivi de la MRD.

Nous avons également testé en routine la RT-MLPA sur des prélèvements au diagnostic de LAL (84 patients). Les résultats concordants de la RT-MLPA avec les techniques classiques montraient une sensibilité pour 100% des anomalies et 9 anomalies étaient détectées en plus.

Nous avons retrouvé un transcrit *TEL-AML1* qui n'était pas détecté par RQ-PCR. Les amorces utilisées lors de cette RQ-PCR étaient celles recommandées par Gabert et al. (66), c'est-à-dire que les exons détectés sont *TEL* exon 5 et *AML1* exon 2. La RT-MLPA a permis de montrer que le transcrit *TEL-AML1* non détecté par RQ-PCR mais détecté par RT-MLPA concernait *TEL* exon 4 et *AML1* exon 2. La RT-MLPA a ainsi rattrapé un faux négatif rendu par PCR spécifique.

Au final, la cytogénétique avait permis de détecter les 2 translocations correspondantes aux 2 transcrits *PAX5-ETV6* et *BCR-JAK2* révélés par RT-MLPA.

Donc il restait 6 anomalies non recherchées ou non détectées et mises en évidence uniquement par RT-MLPA.

Parmi ces transcrits, 6 faisaient intervenir des composants de la voie *ABL* ou de la voie *JAK2*.

La détection de ces transcrits de fusion impliquant ces 2 voies de signalisation s'est avérée très importante depuis les études de Den Boer (93), Roberts (94) et de Moorman (95). En effet, ils ont pu montrer qu'il existait un réseau complexe d'anomalies activant des kinases. En théorie, tous ces gènes de fusion impliquant des kinases peuvent être ciblés par de petites molécules inhibitrices et par conséquent ils deviennent des biomarqueurs prédictifs. Par exemple, des études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que les fusions de *ABL1*, *ABL2*, *PDGFR β* , *CSF1R* sont sensibles à l'imatinib et au dasatinib et que *CRLF2*, *JAK2* et *EPOR* sont sensibles aux inhibiteurs de *JAK2* comme le ruxolitinib.

Par ailleurs, un petit nombre de patients pédiatriques présentant des gènes de fusion comme *ABL1*, *ABL2*, *PDGFR β* ou *CSF1R* et réfractaire au traitement habituel atteint une rémission complète sous imatinib ou dasatinib (96) (97). Cependant, ces patients sont hautement sélectionnés et le suivi est extrêmement limité.

Ces observations sont très encourageantes avec la détection en routine de ces transcrits de fusion ciblés spécifiquement par des inhibiteurs permettant d'offrir une option thérapeutique pour ces patients.

La prévalence de ces biomarqueurs a été établie dans une large cohorte représentative avec 1-2% des LAL B pour *ABL1*, *ABL2*, *PDGFR β* et *CSF1R* alors qu'elle atteint 3-5% pour *CRLF2*, *JAK2* et *EPOR* jusque 15% pour chez les adolescents et adultes jeunes atteints de LAL.

Les études récentes ont montré que les réarrangements *P2RY8-CRLF2*, *EBF1-PDGFR β* sont les gènes de fusion les plus retrouvés. La FISH, en utilisant des amorces ciblant ces kinases, permettrait une première approche dans la détection de ces transcrits de fusion. La RT-MLPA quant à elle pourrait détecter directement les réarrangements impliquant ces kinases (*ABL1*, *PDGFR β* , *CSF1R*, *JAK2*, *CRLF2*) lorsque les exons correspondants sont présents dans le mix.

Un des points importants à éclaircir reste la validation totale des différents transcrits, pour cela la standardisation et l'utilisation dans plusieurs centres de la RT-MLPA avec une centralisation des résultats permettrait de valider un nombre important d'anomalies, notamment car certains transcrits de fusion sont très rares (parfois quelques cas dans le monde comme pour *cMYB-GATA1* (98)) ce qui permet d'élargir la cohorte.

Toutefois, chaque série de RT-MLPA devra être accompagnée d'un contrôle positif, c'est-à-dire un échantillon passé dans une série précédente et présentant un transcrit détecté par RT-MLPA, et un contrôle négatif. Ceci permettra de valider les résultats de la série.

Il est également important de revalider chaque nouveau mix de sondes oligonucléotidiques après modification de celui-ci (diminution ou augmentation du nombre de sondes).

Au final, il est essentiel de s'interroger sur la place en routine de la RT-MLPA dans un laboratoire d'Hématologie spécialisé tel que celui du CHRU de Lille.

Nous allons comparer la RT-MLPA aux autres techniques actuellement utilisées en termes de temps, coût et délai de rendu des résultats. Il faut savoir que la RT-MLPA utilise un volume de 6,25µL de cDNA, elle nécessite donc une étape de rétro-transcription qui est déjà réalisée en routine. Une technique complète de RT-MLPA peut être effectuée en deux ou trois jours selon le nombre de patients.

Au niveau du nombre d'analyses réalisées au diagnostic des LAM, 7 analyses spécifiques sont réalisées pour détecter 7 anomalies différentes. En comparant avec nos résultats sur la RT-MLPA, qui ne nécessite qu'une seule analyse, la sensibilité pour la détection des duplications de *MLL* est très fiable puisque 100% des anomalies ont été retrouvées. Pour les mutations de *NPM1*, c'est un peu plus controversé puisque la RT-MLPA ne détecte que les mutations de type A, B, D, J et ne détecte pas les autres variants rares. Par ailleurs des cas de *NPM1* muté D en RT-MLPA révélaient en Sanger une mutation *NPM1* de type 4.

Pour le groupe des CBF, la technique est particulièrement fiable. Elle permet la détection du transcrite *AML1-ETO* et des transcrits *CBFβ-MYH11* dans 100% des cas. De plus, la RT-MLPA permet de déterminer directement la forme A, D ou E du transcrite, contrairement aux techniques actuelles qui nécessitent de tester différentes formes de transcrite successivement.

La détection de *MLL-AF9* reste liée aux exons fusionnés qui doivent être présents dans le mix oligonucléotidique afin d'être détectés, cependant la technique de RQ-PCR ne détecte pas tous les exons pouvant être impliqués.

Concernant les transcrits *DEK-CAN* et *PML-RARα*, ils ont été détectés par RT-MLPA dans 100% des cas.

Pour les LAL B, 4 analyses sont réalisées au diagnostic en routine pour détecter 4 anomalies différentes. Les résultats de notre étude ont montré pour *BCR-ABL* et *E2A-PBX1* une détection dans 100% des cas.

Concernant *MLL-AF4*, la détection était fiable mais la variabilité des exons fusionnés reste le principal problème dans la RT-MLPA.

Le transcrite *TEL-AML1* a été détecté avec succès et a, par ailleurs été retrouvé dans sa forme *TEL* exon4-*AML1* exon 2 qui ne peut pas être détecté par PCR. La RT-MLPA a donc permis de détecter un transcrite *TEL-AML1* qui n'avait pas été retrouvé par technique classique de routine.

Pour les LAL T, 3 analyses sont réalisées au diagnostic en routine pour détecter

3 anomalies différentes. Le transcrit *BCR-ABL*, comme dit précédemment, est retrouvé dans 100% des cas.

Nous n'avons pas, dans notre étude, retrouvé de transcrit *SIL-TAL* cependant il a été validé dans le laboratoire d'Hématologie du CHRU de Rouen par le Docteur Philippe Ruminy qui utilise le même mix de sondes oligonucléotidiques.

Le transcrit *NUP214-ABL* a été détecté alors que la technique classique utilisée en routine (RQ-PCR) n'avait pas permis sa mise en évidence, l'exon 32 de *NUP214* n'étant pas couvert par la RQ-PCR classique.

D'après cette comparaison, nous pouvons affirmer que la RT-MLPA aurait sa place dans la stratégie de routine au diagnostic de leucémies aiguës aussi bien dans les LAM que dans les LAL. En effet, elle permettrait de remplacer les analyses précédemment citées en une seule analyse de RT-MLPA et de détecter avec une grande fiabilité les anomalies recherchées. Seule la recherche des mutations de *NPM1* concernant les variants rares ne peut être remplacée, toutefois nous rappellerons que les mutations de *NPM1* (mutée A, B, D ou J) ont bien été retrouvées en RT-MLPA.

La mise en place de la RT-MLPA en routine au laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille permettrait de détecter un plus grand nombre d'anomalies au diagnostic des LA tout en diminuant le nombre de PCR nécessaires.

CONCLUSION

La RT-MLPA ou LD-RT-PCR est une technique simple, rapide et présentant un coût faible. L'apport de cette technique pourrait permettre de détecter des transcrits rares amenant à modifier la thérapeutique en cas d'échec du traitement de première intention. Cette technique évolutive permet de screener un maximum de transcrits en une seule analyse et notamment la mise en évidence de réarrangements provenant de translocations cryptiques non détectées par la cytogénétique conventionnelle. Il s'agit donc de réarrangements équilibrés (non détectés par SNP-Array) et déséquilibrés. Toutefois, du fait de la non exhaustivité, le screening par FISH des réarrangements de *MLL*, *NUP98* et la recherche des mutations de *NPM1* en biologie moléculaire restent indispensables.

La RT-MLPA est limitée à la recherche de transcrits de fusion et à certaines mutations telles que *NPM1*. Elle n'est pas adaptée à la recherche des transcrits de type FIP1L1 ne présentant pas des points de cassure récurrents. C'est une technique ciblée nécessitant la connaissance des gènes et des points de cassures. Sa sensibilité ne permet pas la réalisation de maladie résiduelle réservée à la RQ-PCR. Les principales difficultés pouvant être rencontrées lors de la RT-MLPA sont une faible infiltration tumorale (faible quantité d'ARN), une qualité médiocre de l'ARN et la présence possible mais rare d'une double altération moléculaire entraînant des difficultés pour la lecture de la séquence.

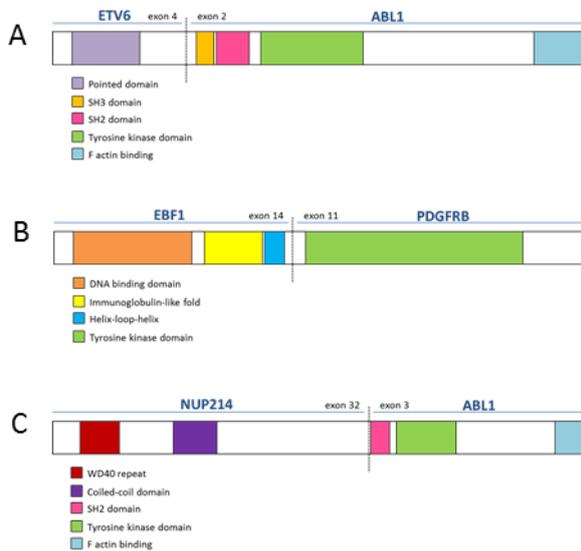
L'ensemble des études réalisées nous a permis de montrer une réelle plus-value de la RT-MLPA dans la prise en charge des leucémies aiguës au diagnostic, aussi bien d'origine myéloïde que lymphoïde, puisque la place occupée par les LAL-Phi like est de plus en plus importante (99). En effet, les acteurs de la voie *ABL* et *JAK2* mis en évidence sont de plus en plus nombreux d'après Moorman et al. (95) et la stratégie thérapeutique est alors modifiée.

En conclusion, la RT-MLPA est une technique qui présente un réel intérêt dans la prise en charge des leucémies aiguës au diagnostic et sa mise en place en routine au laboratoire d'Hématologie de Lille est imminente dans le but de remplacer les différentes techniques.

Annexe 1 : Patients positifs pour un transcrit *BCR-ABL1-like* (5 observations)

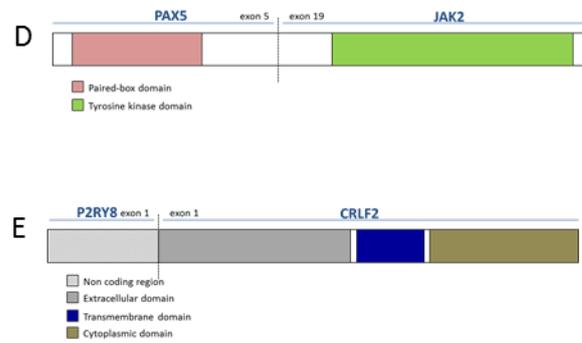
ABL class fusions

Inhibitors : imatinib, dasatinib



JAK class fusions

Inhibitors : ruxolitinib



Transcrits de fusion *BCR-ABL1* like retrouvés en routine. Les transcrits A à C et D à E sont associés à une sensibilité aux inhibiteurs de tyrosine kinase et aux inhibiteurs de *JAK2* (données *in vitro* ± *in vivo* (78)).

Patient 20 : F, 15 ans, fusion *NUP214-ABL1* (97)

Il s'agit d'une patiente de 15 ans diagnostiquée en février 2013 pour une LAL-BIII hyperleucocytaire ($260\ 000/\text{mm}^3$ dont 95% de blastes) sans envahissement méningé. Le caryotype était normal et la recherche des transcrits de fusion classiques était négative. La patiente était traitée selon le protocole EORTC 58081 groupe VHR. La phase d'induction comportait daunorubicine, vincristine, cyclophosphamide, asparaginase et corticoïdes. La maladie était corticorésistante et chimiorésistante. Une allogreffe de CSH était réalisée en octobre 2013 mais la patiente rechutait en avril 2014. Un traitement par le protocole BOREALL comportant bortézomib, vincristine et corticoïdes était initié mais s'avérait inefficace. A ce stade, la patiente était considérée en soins palliatifs devant l'absence d'efficacité des thérapies. Son traitement reposait sur une chimiothérapie orale par méthotrexate et purinéthol. En mars 2015, devant une nouvelle hospitalisation au décours d'un sepsis sévère, une analyse SNP-array était réalisée retrouvant les délétions des gènes *IKZF1* (exons 4 à 8), *TBL1XR1*, *LEF1*, *CDKN2A/B*, *SERP2*, *SLX4IP*, *RUNX1* et *VPREB1* ainsi qu'une amplification de la région 9q34 bornée par les gènes *ABL1* et *NUP214*. La recherche d'un transcrit *NUP214-ABL1* était positive en LD-RTPCR

(exons différents de ceux impliqués dans les LAL-T). Considérant l'implication d'*ABL1*, la patiente était traitée par dasatinib (Sprycel®) associé à la vincristine et aux corticoïdes permettant l'obtention d'une RC. Malheureusement, la patiente rechutait en octobre 2015. Elle recevait alors un traitement par anti-CD22 (inotuzumab) permettant l'obtention d'une nouvelle RC. Devant une nouvelle rechute, la patiente était incluse pour un essai utilisant des *Chimeric Antigen Receptor* (CAR)-T cells en mars 2016.

Patient 21 : F, 12 ans, fusion *EBF1-PDGFRB* (96) (100)

La patiente est une jeune fille de 12 ans adressée pour anémie et thrombopénie associées à une hyperleucocytose majeure (648 000/mm³) composée de 97% de blastes. Il n'existait pas d'atteinte neurologique. Le myélogramme et l'immunophénotypage posaient le diagnostic de LAL-BIII. Le caryotype était un échec (x3). La MLPA retrouvait une délétion d'*IKZF1* (exons 4 à 7). L'étude SNP-array retrouvait également des délétions des gènes *CDKN2A/B*, *PAX5* et *LEF1* ainsi qu'une délétion du bras long du chromosome 5 localisée entre les gènes *PDGFRB* et *EBF1*. La LD-RTPCR confirmait la présence d'un transcrit de fusion *EBF1-PDGFRB*. La patiente était traitée selon le protocole EORTC 58081 groupe VHR. La maladie était corticorésistante mais chimiosensible. La phase intermédiaire du traitement était marquée par une très importante toxicité au méthotrexate (hémiplégie, pancytopénie prolongée) obligeant une diminution des doses puis un arrêt total du médicament. Une radiothérapie neuroméningée était alors réalisée en remplacement. L'imatinib (Glivec®) était associé au traitement d'entretien. La patiente est toujours en RC à 14 mois du diagnostic initial.

Patient 22 : M, 3 ans, fusion *P2RY8-CRLF2*

Le patient est un jeune garçon de 3 ans hospitalisé pour un diagnostic de LAL-BIII. Sa numération montrait une leucocytose à 69 000/mm³ (dont 68% de blastes). Il n'y avait pas d'envahissement méningé. L'étude génétique montrait un caryotype normal et une délétion du gène *IKZF1* (exons 4 à 7). L'étude SNP-array confirmait la délétion d'*IKZF1* associée aux délétions des gènes *CDKN2A/B*, *PAX5* et *VPREB1*. La région pseudoautosomale du chromosome X était caractérisée par une délétion suggérant une fusion *P2RY8-CRLF2* confirmée par LD-RTPCR. Le séquençage du gène *JAK2*, proposé dans ce contexte d'anomalie de *CRLF2*, permettait d'identifier une mutation activatrice *JAK2* R683G au niveau de l'exon 16. Le patient était traité selon le protocole EORTC 58081 bras AR1 sans modification thérapeutique. La maladie était corticosensible et chimiosensible.

Patient 25 : F, 4 ans, fusion *PAX5-JAK2*

Il s'agit d'un diagnostic de LAL-BIII chez une petite fille de 4 ans se présentant avec une leucocytose à 120 000/mm³ (dont 84% de blastes) associée à une atteinte méningée. L'étude génétique initiale montrait un caryotype 46,XX,add(19)(p13) sans délétion du gène *IKZF1*. L'étude par SNP-array montrait notamment un gain du bras long du chromosome X (vraisemblablement à l'origine de l'anomalie observée sur le caryotype) ainsi que des gains partiels des gènes *PAX5* et *JAK2*. Ces anomalies faisaient suspecter un transcrite *PAX5-JAK2*, confirmé par LD-RTPCR. La patiente était finalement traitée selon le protocole EORTC 58081 bras AR2 sans modification thérapeutique. La maladie était corticosensible et chimiosensible. La patiente est toujours en RC à 17 mois du diagnostic initial.

Patient 27 : M, 19 ans, fusion *ETV6-ABL1*

Le patient est un jeune homme de 19 ans présentant une LAL-BI hyperleucocytaire à caryotype complexe (> 3 anomalies avec notamment un réarrangement complexe du bras court du chromosome 9) sans envahissement méningé. Il n'existait pas de délétion d'*IKZF1*. L'étude SNP-array retrouvait le réarrangement 9q conduisant notamment à une délétion des gènes *CDKN2A/B* et *PAX5*. Il existait également un gain focal en 9q34 impliquant le gène *ABL1* et faisant suspecter un transcrite de fusion impliquant ce gène. Cependant il n'existait pas d'argument pour l'identification du gène partenaire en SNP-array. La LD-RTPCR permettait d'identifier une fusion *ETV6-ABL1*. Le patient était traité selon le protocole GRAALL 2005. La maladie était corticorésistante et chimiorésistante. Il existait une indication d'allogreffe de CSH. Le patient rechutait à 4 mois du diagnostic et recevait un traitement de rattrapage par imatinib (Glivec®) et protocole VANDA. L'imatinib était arrêté en raison d'une hépatotoxicité. Le patient recevait une greffe de CSH mais rechutait malheureusement peu de temps après.

Bibliographie

1. Ema H, Morita Y, Suda T. Heterogeneity and hierarchy of hematopoietic stem cells. *Exp Hematol*. févr 2014;42(2):74-82.e2.
2. Challen GA, Boles N, Lin KK, Goodell MA. Mouse Hematopoietic Stem Cell Identification And Analysis. *Cytom Part J Int Soc Anal Cytol*. janv 2009;75(1):14-24.
3. Bellantuono I. Haemopoietic stem cells. *Int J Biochem Cell Biol*. avr 2004;36(4):607-20.
4. Benveniste P, Frelin C, Janmohamed S, Barbara M, Herrington R, Hyam D, et al. Intermediate-Term Hematopoietic Stem Cells with Extended but Time-Limited Reconstitution Potential. *Cell Stem Cell*. 8 janv 2010;6(1):48-58.
5. Majeti R, Park CY, Weissman IL. Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell*. 13 déc 2007;1(6):635-45.
6. Govindan R, Kumar V, Sisodia S, Mallick PJ. Molecular interactions in stem cell homing and bone marrow transplantation therapy. *Int J Pharm*. 2012;3(4):210–3.
7. Moreb JS, Ucar D, Han S, Amory JK, Goldstein AS, Ostmark B, et al. The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance. *Chem Biol Interact*. 5 janv 2012;195(1):52-60.
8. Christianson SW, Greiner DL, Hesselton RA, Leif JH, Wagar EJ, Schweitzer IB, et al. Enhanced human CD4+ T cell engraftment in beta2-microglobulin-deficient NOD-scid mice. *J Immunol Baltim Md 1950*. 15 avr 1997;158(8):3578-86.
9. Ito M, Hiramatsu H, Kobayashi K, Suzue K, Kawahata M, Hioki K, et al. NOD/SCID/gamma(c)(null) mouse: an excellent recipient mouse model for engraftment of human cells. *Blood*. 1 nov 2002;100(9):3175-82.
10. Copsel S, Bruzzone A, May M, Beyrath J, Wargon V, Cany J, et al. Multidrug resistance protein 4/ ATP binding cassette transporter 4: a new potential therapeutic target for acute myeloid leukemia. *Oncotarget*. 2 sept 2014;5(19):9308-21.
11. Mosaad YM. Hematopoietic stem cells: An overview. *Transfus Apher Sci Off J World Apher Assoc Off J Eur Soc Haemapheresis*. déc 2014;51(3):68-82.

12. Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat Rev Immunol.* févr 2006;6(2):93-106.
13. Bottardi S, Mavoungou L, Pak H, Daou S, Bourgoïn V, Lakehal YA, et al. The IKAROS Interaction with a Complex Including Chromatin Remodeling and Transcription Elongation Activities Is Required for Hematopoiesis. *PLoS Genet.* déc 2014;10(12):e1004827.
14. D'Alò F, Di Ruscio A, Guidi F, Fabiani E, Greco M, Rumi C, et al. PU.1 and CEBPA expression in acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* sept 2008;32(9):1448-53.
15. Raaphorst FM. Self-renewal of hematopoietic and leukemic stem cells: a central role for the Polycomb-group gene Bmi-1. *Trends Immunol.* oct 2003;24(10):522-4.
16. Zhang P, Iwasaki-Arai J, Iwasaki H, Fenyus ML, Dayaram T, Owens BM, et al. Enhancement of hematopoietic stem cell repopulating capacity and self-renewal in the absence of the transcription factor C/EBP alpha. *Immunity.* déc 2004;21(6):853-63.
17. Cortegano I, Melgar-Rojas P, Luna-Zurita L, Siguero-Álvarez M, Marcos MA, Gaspar ML, et al. Notch1 regulates progenitor cell proliferation and differentiation during mouse yolk sac hematopoiesis. *Cell Death Differ.* juill 2014;21(7):1081-94.
18. Schreck C, Bock F, Grziwok S, Oostendorp RAJ, Istvánffy R. Regulation of hematopoiesis by activators and inhibitors of Wnt signaling from the niche. *Ann N Y Acad Sci.* 2014;1310(1):32-43.
19. Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nat Biotechnol.* juin 2014;32(6):554-61.
20. Bhardwaj G, Murdoch B, Wu D, Baker DP, Williams KP, Chadwick K, et al. Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat Immunol.* févr 2001;2(2):172-80.
21. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* juill 1997;3(7):730-7.
22. Taussig DC, Pearce DJ, Simpson C, Rohatiner AZ, Lister TA, Kelly G, et al. Hematopoietic stem cells express multiple myeloid markers: implications for the origin and targeted therapy of acute myeloid leukemia. *Blood.* 15 déc 2005;106(13):4086-92.
23. Van Rhenen A, van Dongen GAMS, Kelder A, Rombouts EJ, Feller N, Moshaver B, et al. The novel AML stem cell associated antigen CLL-1 aids in discrimination between normal and leukemic stem cells. *Blood.* 1 oct 2007;110(7):2659-66.

24. Hosen N, Park CY, Tatsumi N, Oji Y, Sugiyama H, Gramatzki M, et al. CD96 is a leukemic stem cell-specific marker in human acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 26 juin 2007;104(26):11008-13.
25. Saito Y, Kitamura H, Hijikata A, Tomizawa-Murasawa M, Tanaka S, Takagi S, et al. Identification of therapeutic targets for quiescent, chemotherapy-resistant human leukemia stem cells. *Sci Transl Med*. 3 févr 2010;2(17):17ra9.
26. Jan M, Chao MP, Cha AC, Alizadeh AA, Gentles AJ, Weissman IL, et al. Prospective separation of normal and leukemic stem cells based on differential expression of TIM3, a human acute myeloid leukemia stem cell marker. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 22 mars 2011;108(12):5009-14.
27. Jin L, Hope KJ, Zhai Q, Smadja-Joffe F, Dick JE. Targeting of CD44 eradicates human acute myeloid leukemic stem cells. *Nat Med*. oct 2006;12(10):1167-74.
28. Stroopinsky D, Rosenblatt J, Ito K, Mills H, Yin L, Rajabi H, et al. MUC1 is a potential target for the treatment of acute myeloid leukemia stem cells. *Cancer Res*. 1 sept 2013;73(17):5569-79.
29. Zhi L, Wang M, Rao Q, Yu F, Mi Y, Wang J. Enrichment of N-Cadherin and Tie2-bearing CD34+/CD38-/CD123+ leukemic stem cells by chemotherapy-resistance. *Cancer Lett*. 1 oct 2010;296(1):65-73.
30. Fiegl M, Samudio I, Clise-Dwyer K, Burks JK, Mnjoyan Z, Andreeff M. CXCR4 expression and biologic activity in acute myeloid leukemia are dependent on oxygen partial pressure. *Blood*. 12 févr 2009;113(7):1504-12.
31. Chao MP, Jaiswal S, Weissman-Tsukamoto R, Alizadeh AA, Gentles AJ, Volkmer J, et al. Calreticulin is the dominant pro-phagocytic signal on multiple human cancers and is counterbalanced by CD47. *Sci Transl Med*. 22 déc 2010;2(63):63ra94.
32. Majeti R, Chao MP, Alizadeh AA, Pang WW, Jaiswal S, Gibbs KD, et al. CD47 is an adverse prognostic factor and therapeutic antibody target on human acute myeloid leukemia stem cells. *Cell*. 23 juill 2009;138(2):286-99.
33. De Moraes ACR, Maranhão CK, Rauber GS, Santos-Silva MC. Importance of detecting multidrug resistance proteins in acute leukemia prognosis and therapy. *J Clin Lab Anal*. janv 2013;27(1):62-71.
34. Look AT. Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*. 7 nov 1997;278(5340):1059-64.
35. Dalla-Favera R, Bregni M, Erikson J, Patterson D, Gallo RC, Croce CM. Human c-myc onc gene is located on the region of chromosome 8 that is translocated in Burkitt lymphoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. déc 1982;79(24):7824-7.

36. Heisterkamp N, Stephenson JR, Groffen J, Hansen PF, de Klein A, Bartram CR, et al. Localization of the c-ab1 oncogene adjacent to a translocation break point in chronic myelocytic leukaemia. *Nature*. 17 nov 1983;306(5940):239-42.
37. Scheijen B, Griffin JD. Tyrosine kinase oncogenes in normal hematopoiesis and hematological disease. *Oncogene*. 13 mai 2002;21(21):3314-33.
38. InfoCancer - ARCAGY - GINECO - Localisations - Cancers du sang - Hémopathies - Leucémie Aiguës (LA) - Maladie.
39. Cardis E, Vrijheid M, Blettner M, Gilbert E, Hakama M, Hill C, et al. Risk of cancer after low doses of ionising radiation: retrospective cohort study in 15 countries. *BMJ*. 9 juill 2005;331(7508):77.
40. Austin H, Delzell E, Cole P. Benzene and leukemia. A review of the literature and a risk assessment. *Am J Epidemiol*. mars 1988;127(3):419-39.
41. Savitz DA, Andrews KW. Review of epidemiologic evidence on benzene and lymphatic and hematopoietic cancers. *Am J Ind Med*. mars 1997;31(3):287-95.
42. Dowton SB, Beardsley D, Jamison D, Blattner S, Li FP. Studies of a familial platelet disorder. *Blood*. mars 1985;65(3):557-63.
43. Bene MC, Castoldi G, Knapp W, Ludwig WD, Matutes E, Orfao A, et al. Proposals for the immunological classification of acute leukemias. European Group for the Immunological Characterization of Leukemias (EGIL). *Leukemia*. oct 1995;9(10):1783-6.
44. Mertelsmann R, Engelhardt M and Berger DP: Précis d'Hématologie et d'Oncologie. 2008.
45. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
46. Cohen JL. Pharmacokinetic changes in aging. *Am J Med*. 16 mai 1986;80(5A):31-8.
47. Tiu RV, Gondek LP, O'Keefe CL, Huh J, Sekeres MA, Elson P, et al. New lesions detected by single nucleotide polymorphism array-based chromosomal analysis have important clinical impact in acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2009;27(31):5219-26.
48. Rowley JD, Alimena G, Garson OM, Hagemeijer A, Mitelman F, Prigogina EL. A collaborative study of the relationship of the morphological type of acute nonlymphocytic leukemia with patient age and karyotype. *Blood*. mai 1982;59(5):1013-22.

49. Hiddemann W, Kern W, Schoch C, Fonatsch C, Heinecke A, Wörmann B, et al. Management of acute myeloid leukemia in elderly patients. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. nov 1999;17(11):3569-76.
50. Röllig C, Bornhäuser M, Thiede C, Taube F, Kramer M, Mohr B, et al. Long-term prognosis of acute myeloid leukemia according to the new genetic risk classification of the European LeukemiaNet recommendations: evaluation of the proposed reporting system. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 juill 2011;29(20):2758-65.
51. Greenwood MJ, Seftel MD, Richardson C, Barbaric D, Barnett MJ, Bruyere H, et al. Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*. juill 2006;47(7):1245-52.
52. Appelbaum FR, Rowe JM, Radich J, Dick JE. Acute myeloid leukemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2001;62-86.
53. Grimwade D. The clinical significance of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. sept 2001;14(3):497-529.
54. Falini B, Martelli MP. Impact of genomics in the clinical management of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *Best Pract Res Clin Haematol*. sept 2015;28(2-3):90-7.
55. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1 oct 1998;92(7):2322-33.
56. Slovak ML, Kopecky KJ, Cassileth PA, Harrington DH, Theil KS, Mohamed A, et al. Karyotypic analysis predicts outcome of preremission and postremission therapy in adult acute myeloid leukemia: a Southwest Oncology Group/Eastern Cooperative Oncology Group Study. *Blood*. 15 déc 2000;96(13):4075-83.
57. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 1 mai 2008;358(18):1909-18.
58. Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, et al. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia*. mai 2008;22(5):915-31.
59. Verhaak RGW, Goudswaard CS, van Putten W, Bijl MA, Sanders MA, Hagens W, et al. Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance. *Blood*. 1 déc 2005;106(12):3747-54.

60. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 1 déc 2005;106(12):3740-6.
61. Ohlsson E, Schuster MB, Hasemann M, Porse BT. The multifaceted functions of C/EBP α in normal and malignant haematopoiesis. *Leukemia*. 25 nov 2015;
62. Leroy H, Roumier C, Huyghe P, Biggio V, Fenaux P, Preudhomme C. CEBPA point mutations in hematological malignancies. *Leukemia*. mars 2005;19(3):329-34.
63. Taskesen E, Bullinger L, Corbacioglu A, Sanders MA, Erpelinck CAJ, Wouters BJ, et al. Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity. *Blood*. 24 févr 2011;117(8):2469-75.
64. Preudhomme C, Sagot C, Boissel N, Cayuela J-M, Tigaud I, de Botton S, et al. Favorable prognostic significance of CEBPA mutations in patients with de novo acute myeloid leukemia: a study from the Acute Leukemia French Association (ALFA). *Blood*. 15 oct 2002;100(8):2717-23.
65. Ahn J-S, Kim J-Y, Kim H-J, Kim Y-K, Lee S-S, Jung S-H, et al. Normal karyotype acute myeloid leukemia patients with CEBPA double mutation have a favorable prognosis but no survival benefit from allogeneic stem cell transplant. *Ann Hematol*. janv 2016;95(2):301-10.
66. Van Dongen JJ, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. Report of the BIOMED-1 Concerted Action: investigation of minimal residual disease in acute leukemia. *Leukemia*. déc 1999;13(12):1901-28.
67. Schnittger S, Weissner M, Schoch C, Hiddemann W, Haferlach T, Kern W. New score predicting for prognosis in PML-RARA+, AML1-ETO+, or CBFMBYH11+ acute myeloid leukemia based on quantification of fusion transcripts. *Blood*. 15 oct 2003;102(8):2746-55.
68. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 août 2009;27(22):3650-8.
69. Polampalli S, Choughule A, Prabhash K, Amare P, Baisane C, Kabre S, et al. Role of RT-PCR and FISH in diagnosis and monitoring of acute promyelocytic leukemia. *Indian J Cancer*. mars 2011;48(1):60-7.

70. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 21 mars 2013;121(12):2213-23.
71. Willekens C, Blanchet O, Renneville A, Cornillet-Lefebvre P, Pautas C, Guieze R, et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica*. 3 déc 2015;
72. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, Dell'Oro MG, Gottardi E, Specchia G, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations. *Leukemia*. juin 2006;20(6):1103-8.
73. Burke MJ. Minimal Residual Disease in NPM1-Mutated AML. *N Engl J Med*. 20 janv 2016;
74. Cilloni D, Gottardi E, De Micheli D, Serra A, Volpe G, Messa F, et al. Quantitative assessment of WT1 expression by real time quantitative PCR may be a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute leukemia patients. *Leukemia*. oct 2002;16(10):2115-21.
75. Park JH, Qiao B, Panageas KS, Schymura MJ, Jurcic JG, Rosenblat TL, et al. Early death rate in acute promyelocytic leukemia remains high despite all-trans retinoic acid. *Blood*. 4 août 2011;118(5):1248-54.
76. Micol JB, Raffoux E, Boissel N, Lengliné E, Canet E, Daniel MT, et al. Management and treatment results in patients with acute promyelocytic leukaemia (APL) not enrolled in clinical trials. *Eur J Cancer Oxf Engl 1990*. avr 2014;50(6):1159-68.
77. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):453-74.
78. Castaigne S, Pautas C, Terré C, Raffoux E, Bordessoule D, Bastie J-N, et al. Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study. *Lancet Lond Engl*. 21 avr 2012;379(9825):1508-16.
79. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. mars 2016;30(3):757-60.

80. Hsuih TC, Park YN, Zaretsky C, Wu F, Tyagi S, Kramer FR, et al. Novel, ligation-dependent PCR assay for detection of hepatitis C in serum. *J Clin Microbiol.* mars 1996;34(3):501-7.
81. Creutzig U, van den Heuvel-Eibrink MM, Gibson B, Dworzak MN, Adachi S, de Bont E, et al. Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel. *Blood.* 18 oct 2012;120(16):3187-205.
82. Feng Z, Yao Y, Zhou C, Chen F, Wu F, Wei L, et al. Pharmacological inhibition of LSD1 for the treatment of MLL-rearranged leukemia. *J Hematol Oncol/J Hematol Oncol.* 2016;9:24.
83. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of « real-time » quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia.* déc 2003;17(12):2318-57.
84. Panagopoulos I, Micci F, Thorsen J, Haugom L, Tierens A, Ulvmoen A, et al. A novel TCF3-HLF fusion transcript in acute lymphoblastic leukemia with a t(17;19)(q22;p13). *Cancer Genet.* déc 2012;205(12):669-72.
85. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz H-J, et al. Genomics and drug profiling of fatal TCF3-HLF-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet.* sept 2015;47(9):1020-9.
86. Yang J, Zhou X, Wang B, Gao C, Zhang R, Li B. [Severe hypercalcemia complicated in acute lymphoblastic leukemia (ALL) with E2A-HLF fusion gene: report of two cases and literature review]. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi Zhonghua Xueyexue Zazhi.* sept 2009;30(9):615-8.
87. Hunger SP, Devaraj PE, Foroni L, Secker-Walker LM, Cleary ML. Two types of genomic rearrangements create alternative E2A-HLF fusion proteins in t(17;19)-ALL. *Blood.* 15 mai 1994;83(10):2970-7.
88. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* 2013 Jul;52(7):683-93.
89. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood.* 29 sept 2011;118(13):3645-56.

90. De Rooij JDE, Hollink IHIM, Arentsen-Peters STCJM, van Galen JF, Berna Beverloo H, Baruchel A, et al. NUP98/JARID1A is a novel recurrent abnormality in pediatric acute megakaryoblastic leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Leukemia*. déc 2013;27(12):2280-8.
91. De Lima M, Strom SS, Keating M, Kantarjian H, Pierce S, O'Brien S, et al. Implications of potential cure in acute myelogenous leukemia: development of subsequent cancer and return to work. *Blood*. 15 déc 1997;90(12):4719-24.
92. Estey EH. Acute myeloid leukemia: 2012 update on diagnosis, risk stratification, and management. *Am J Hematol*. janv 2012;87(1):89-99.
93. Den Boer ML, van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheek MH, Buijs-Gladdines JGCAM, Peters STCJM, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *Lancet Oncol*. févr 2009;10(2):125-34.
94. Roberts KG, Li Y, Payne-Turner D, Harvey RC, Yang Y-L, Pei D, et al. Targetable kinase-activating lesions in Ph-like acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 11 sept 2014;371(11):1005-15.
95. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. avr 2016;101(4):407-16.
96. Lengline E, Beldjord K, Dombret H, Soulier J, Boissel N, Clappier E. Successful tyrosine kinase inhibitor therapy in a refractory B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with EBF1-PDGFRB fusion. *Haematologica*. nov 2013;98(11):e146-148.
97. Duployez N, Grzych G, Ducourneau B, Fuentes MA, Grardel N, Boyer T, et al. NUP214-ABL1 fusion defines a rare subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia that could benefit from tyrosine kinase inhibitors. *Haematologica*. avr 2016;101(4):e133-134.
98. Quelen C, Lippert E, Struski S, Demur C, Soler G, Prade N, et al. Identification of a transforming MYB-GATA1 fusion gene in acute basophilic leukemia: a new entity in male infants. *Blood*. 26 mai 2011;117(21):5719-22.
99. Roberts KG, Mullighan CG. Genomics in acute lymphoblastic leukaemia: insights and treatment implications. *Nat Rev Clin Oncol*. juin 2015;12(6):344-57.
100. Schwab C, Ryan SL, Chilton L, Elliott A, Murray J, Richardson S, et al. EBF1-PDGFRB fusion in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL): genetic profile and clinical implications. *Blood*. 5 mai 2016;127(18):2214-8.

Faculté des sciences pharmaceutiques et biologiques

3, rue du Professeur Laguesse - B.P. 83 - 59006 LILLE Cedex
Tél. 03.20.96.40.40 - Fax 03.20.95.90.09

DECISION D'AUTORISATION DE SOUTENANCE

Le Doyen de la Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Vu le Décret n° 2012-172 du 03 février 2012 modifié relatif aux études spécialisées du troisième cycle de Pharmacie

Vu la décision du Président de l'Université en date du 14 mai 2012 relative aux délégations de signature :

DECIDE

Article 1er : **Monsieur DUCOURNEAU Benoît**

Est autorisé(e) à soutenir son mémoire en vue de l'obtention du D.E.S. de BIOLOGIE MEDICALE sur le sujet suivant :

APPORT DE LA RT-MLPA DANS LA PRISE EN CHARGE DES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES

Article 2 : Ce mémoire peut tenir lieu de thèse en vue de l'obtention du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie.

Article 3 : La soutenance aura lieu le
Judi 30 juin 2016 à 15 h 00 - Amphithéâtre Pauling

Article 4 : Le jury est composé ainsi qu'il suit :

Président :

Madame le Professeur Annabelle DUPONT, Faculté de Pharmacie de Lille

Assesseur(s) :

Monsieur le Professeur Claude PREUD'HOMME
Université Lille 2 - CHRU de Lille

Monsieur le Docteur Olivier NIBOUREL
CHRU de Lille

Monsieur le Professeur Vahid ASNAFI

Monsieur le Docteur Philippe RUMINY

Lille, le 17 mai 2016

Le Doyen

D. CUNY

Université de Lille 2
FACULTE DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES ET BIOLOGIQUES DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2015/2016

Nom : Ducourneau

Prénom : Benoît

Titre du mémoire / thèse : Apport de la RT-MLPA dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes

Mots-clés : Leucémies aiguës, transcrits de fusion, biologie moléculaire, RT-MLPA

Résumé : Les techniques de biologie moléculaire sont aujourd'hui incontournables dans le bilan initial d'une leucémie aiguë. Leur sensibilité élevée et la possibilité de les standardiser en ont fait des outils de choix dans l'évaluation diagnostique et pronostique des malades atteints de LA. De plus, 30 à 40% des LA présentent une translocation équilibrée induisant la fusion de deux gènes avec production d'un ARN chimérique. Ce transcrit est alors considéré comme un marqueur moléculaire. Dans ce travail, nous avons analysé les performances d'une nouvelle technique de biologie moléculaire : la RT-MLPA. Cette technique permet la détection de l'ensemble des transcrits chimériques et de certaines mutations telles que NPM1. La RT-MLPA est réalisée grâce au design de 220 oligonucléotides localisés sur 68 gènes. Après préparation de l'ADNc, celui-ci est hybridé avec le mélange suivi d'une ligation et enfin d'une amplification par PCR et du séquençage par pyroséquenceur. Nous avons testé au total 858 patients à partir des protocoles ALFA0701, ELAM02 et de la routine du laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille sur une période donnée. Les résultats retrouvés en RT-MLPA étaient concordants avec les techniques classiques pour 815 patients. Cependant, 11 résultats n'étaient pas retrouvés par RT-MLPA. Il s'agissait de mutations rares de NPM1 et de réarrangements de MLL dont les exons n'étaient pas présents dans le mix oligonucléotidique. La RT-MLPA a permis de mettre en évidence 32 anomalies non retrouvées par technique classique concernant les LAM mais également les LAL, notamment par la détection de transcrits LAL phi-like. En conclusion, la RT-MLPA est une technique simple, rapide, avec un coût faible qui présente un réel intérêt dans la prise en charge des leucémies aiguës au diagnostic car elle permet de screener un maximum de transcrit dans un minimum de temps. Toutefois, du fait de la non exhaustivité, le screening par FISH de MLL, NUP98 et la recherche des mutations de NPM1 restent indispensables. Sa mise en place en routine au laboratoire d'Hématologie de Lille est imminente dans le but de remplacer les différentes techniques.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle Dupont

Assesseurs : Monsieur le Professeur Vahid Asnafi
Monsieur le Docteur Olivier Nibourel
Monsieur le Docteur Philippe Ruminy

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme