

Université Lille 2 Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille
Année universitaire 2016-2017

**MÉMOIRE
POUR LE DIPLÔME D'ÉTUDES SPECIALISÉES
DE BIOLOGIE MÉDICALE**

**Soutenu publiquement le 14 octobre 2016
Par M. Gauthier Decool**

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

THÈSE EN VUE DU DIPLÔME D'ÉTAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

**Apport de la cytogénétique moléculaire
dans la prise en charge
des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques
de l'enfant et de l'adulte jeune**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Aline Renneville

Assesseurs : Monsieur le Professeur Yves Bertrand
Madame le Docteur Marina Lafage
Madame le Docteur Brigitte Nelken

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

Université Lille 2 – Droit et Santé

Président : Professeur Xavier VANDENDRIESSCHE

Vice-présidents : Professeur Alain DUROCHER
Professeur Régis BORDET
Professeur Eric BOULANGER
Professeur Frédéric LOBEZ
Professeur Murielle GARCIN
Professeur Annabelle DERAM
Professeur Muriel UBEDA SAILLARD
Monsieur Ghislain CORNILLON
Monsieur Pierre RAVAUX
Monsieur Larbi AIT-HENNANI
Madame Nathalie ETHUIN
Madame Ilona LEMAITRE

Directeur Général des Services : Monsieur Pierre-Marie ROBERT

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Doyen : Professeur Damien CUNY
Vice-Doyen, 1^{er} assesseur : Professeur Bertrand DECAUDIN
Assesseur en charge de la pédagogie Dr. Annie STANDAERT
Assesseur en charge de la recherche Pr. Patricia MELNYK
Assesseur délégué à la scolarité Dr. Christophe BOCHU
Assesseur délégué en charge des relations internationales Pr. Philippe CHAVATTE
Assesseur délégué en charge de la vie étudiante 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
M.	DECAUDIN	Bertrand	Pharmacie Galénique
M.	DEPREUX	Patrick	ICPAL
M.	DINE	Thierry	Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie

M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie
M.	LUYCKX	Michel	Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Pharmacie Galénique
Mme	RENNEVILLE	Aline	Hématologie
M.	STAELS	Bart	Biologie Cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	EI Moukhtar	Parasitologie
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Physique
M.	BERTHELOT	Pascal	Onco et Neurochimie
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie – Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	ICPAL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences végétales et fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Physique
M.	DEPREZ	Benoît	Laboratoire de Médicaments et Molécules
Mme	DEPREZ	Rebecca	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences végétales et fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNE	Benoît	Bactériologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie Industrielle
M.	GOOSSENS	Jean François	Chimie Analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie Cellulaire
M.	LUC	Gerald	Physiologie
Mme	MELNYK	Patricia	Onco et Neurochimie
M.	MILLET	Régis	ICPAL
Mme	MUHR – TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PAUMELLE-LESTRELIN	Réjane	Biologie Cellulaire
Mme	PERROY	Anne Catherine	Législation
Mme	ROMOND	Marie Bénédicte	Bactériologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Eric	Législation
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie Industrielle
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie Industrielle
M	TARTAR	André	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WILLAND	Nicolas	Laboratoire de Médicaments et Molécules

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
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacie Galénique

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	ALIOUAT	Cécile Marie	Parasitologie
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.	BOSC	Damien	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
Mme	CACHERA	Claude	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie
Mme	CHARTON	Julie	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M	CHEVALIER	Dany	Toxicologie
M.	COCHELARD	Dominique	Biomathématiques
Mme	DANEL	Cécile	Chimie Analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
Mme	DUTOUT-AGOURIDAS	Laurence	Onco et Neurochimie
M.	EL BAKALI	Jamal	Onco et Neurochimie
M.	FARCE	Amaury	ICPAL
Mme	FLIPO	Marion	Laboratoire de Médicaments et Molécules

Mme	FOULON	Catherine	Chimie Analytique
M.	FURMAN	Christophe	ICPAL
M.	GELEZ	Philippe	Biomathématiques
Mme	GENAY	Stéphanie	Pharmacie Galénique
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	ICPAL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie
Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
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	Onco et Neurochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie Analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation
Mme	LELEU-CHAVAIN	Natascha	ICPAL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie Analytique
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre Arthur	Sciences végétales et fongiques
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques
Mme	RAVEZ	Séverine	Onco et Neurochimie
Mme	RIVIERE	Céline	Pharmacognosie
Mme	ROGER	Nadine	Immunologie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie (80%)
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Laboratoire de Médicaments et Molécules
M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques
M.	YOUS	Saïd	Onco et Neurochimie
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Agrégés

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
Mme	MAYES	Martine	Anglais
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation

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 ASSOCIÉS - mi-temps

Civ.	NOM	Prénom	Laboratoire
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacie Clinique
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacie Clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques
M.	BRICOTEAU	Didier	Biomathématiques

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

À ma présidente de jury

Madame le Professeur Aline RENNEVILLE

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie Moléculaire
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Merci pour l'honneur que tu me fais de juger cette thèse pour ta première présidence. Merci pour tous les échanges toujours très intéressants que nous partageons, tes précieux conseils ainsi que pour ton écoute et ta disponibilité.

Aux membres de mon jury

Monsieur le Professeur Yves BERTRAND

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Responsable de l'Institut d'Hématologie et Oncologie Pédiatrique
Centre Hospitalier Universitaire de Lyon*

Veillez trouver l'expression de mon profond respect pour l'honneur que vous me faites d'accepter de juger ce travail.

Madame le Docteur Marina LAFAGE

*Praticien Hospitalier
Département de Génétique Médicale
Hôpital de la Timone de Marseille*

Veillez trouver l'expression de ma gratitude pour l'intérêt que vous portez à ce travail et l'honneur que vous me faites de participer à mon jury de thèse.

Madame le Docteur Brigitte NELKEN

*Praticien Hospitalier
Unité d'Hématologie Pédiatrique
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Veillez trouver l'expression de mes plus sincères remerciements pour votre enthousiasme et l'honneur que vous me faites d'accepter d'évaluer cette thèse.

À mon directeur de thèse

Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME

*Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Responsable de l'Institut d'Hématologie-Transfusion
Chef de service du Laboratoire d'Hématologie Cellulaire
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Merci de l'honneur que vous m'avez fait en me confiant et en encadrant cette thèse. Vous avez accepté de m'accompagner et de me soutenir dans mon parcours et je vous en suis profondément reconnaissant. Veuillez retrouver l'expression de mon plus grand respect pour votre travail exceptionnel et votre bienveillance.

Je tiens également à remercier,

L'ensemble du personnel du laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille
En particulier Nicolas, pour m'avoir aidé, conseillé et soutenu presque quotidiennement depuis mes débuts au laboratoire d'Hématologie. Tes connaissances et ton intérêt pour la discipline sont très enrichissants !
Nathalie, pour m'avoir fait découvrir la Biologie Moléculaire, pour tes conseils et nos contacts toujours chaleureux.
Olivier, Thomas, Christophe, Florent, et l'ensemble des biologistes pour le partage de votre passion pour l'Hématologie et pour notre fructueuse collaboration.
Et toute l'équipe des ingénieurs et des techniciens du laboratoire pour votre disponibilité, votre aide et votre bonne humeur tout au long de ce travail et de mes stages.

Enfin, je souhaite dédier cette thèse :

À mes très chers parents

Il paraît qu'on choisit ses amis mais pas sa famille. J'ai une chance inouïe car j'ai hérité des parents les plus formidables qui soient. Vous m'avez toujours été d'un soutien indéfectible et d'un amour inconditionnel. Ma vie s'est écrite et continue de s'écrire grâce à vous. Merci pour tout ce que vous m'apportez.

À ma sœur

Je suis extrêmement heureux d'être ton petit frère. Nous savons que nous pouvons compter l'un sur l'autre. Tu m'as toujours inspiré et été d'un soutien sans faille. Michaël te permet de t'épanouir, je vous souhaite à tous les deux le meilleur, vous le méritez.

À ma famille

En particulier à mes grand-parents et mes tantes, pour m'avoir toujours soutenu et encouragé.

À Lison

Pour l'immense bonheur que me procure le partage de nos vies, le soutien que tu me donnes dans mes projets et l'amour que tu m'apportes au quotidien.

Aux familles Davoine et Gervais

Pour toute la bienveillance que vous nous apportez.

À mes amis

Zozo et Beubeu, aux côtés desquels les stages passent trop vite, avec qui j'ai pu partager ma passion pour l'hématologie et de franches rigolades.

Mes coininternes, compagnons de stages et de sorties Lilloises : Vassana, Guillaume x2, Alex, Madou, Flo, Dada, Stéphanie (merci pour cette belle relecture !), Imen, Joséphine, Elise, Claire x2, Quentin, Max, Tonio, JLM, Marie x2, Rébecca, Audrey, Nico, Malicka, Caro, Fanny, Réna, Loïc, Guillemette... et j'en passe ! Merci pour tous ces bons moments de partage, de goûter, de sport, de soirées et de discussions enflammées. J'aime ma vie à Lille aussi en partie grâce à vous !

Mes amis des bancs de la fac : Camille, Nico, Nady, Pierre, Mél (assieds toi faut que je te parle), Caro, Fanny, Marie... Nous avons finalement choisi des voies professionnelles différentes mais ces quelques années nous ont permis de partager d'excellents moments, nous avons pu y développer une amitié sincère qui se poursuit au fil du temps !

Mes très vieux amis de lycée et d'avant : Guillaume, Lucile, Aline, Thomas, Aurélie, Marie... Toujours présents ! Qu'il est bon de vous retrouver malgré la distance et les années qui passent !

Je dédie également ce travail à tous ceux qui sont touchés de près ou de loin par cette maladie : patients, familles, personnel soignant.

À tous ceux que j'ai omis et qui me sont chers.

À tous mes maîtres et professeurs avec mon éternelle reconnaissance.

Abréviations et Acronymes

ABL1 : *Abelson proto oncogene 1*
ADN : *Acide désoxyribonucléique*
AFF1 : *AF4/FMR2 Family Member 1*
ARN : *Acide ribonucléique*
BCR : *Breakpoint cluster regions*
BTG1 : *B-Cell Translocation Gene 1*
BTLA : *B And T Lymphocyte Associated*
CAALL-F : *French Protocol for the treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia in Children and Adolescents*
CD : *Cluster de différentiation*
CDKN2A/B : *Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*
CEBPA : *CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha*
CGH : *Hybridation génomique comparative*
ChAS : *Chromosome Analysis Suite*
CLCG : *Children's Leukemia Cooperative Group*
CLP: *Progéniteur Lymphoïde Commun*
CMF : *Cytométrie en flux*
CMP : *Progéniteur Myéloïde Commun*
CN : *Copy number*
CNA : *Anomalie du nombre de copies*
CRLF2 : *Cytokine Receptor-Like Factor 2*
CSH : *Cellule Souche Hématopoïétique*
CSL : *Cellule souche leucémique*
DGV : *Database of Genomic Variants*
DNMT3A : *DNA Cytosine-5-Methyltransferase 3 Alpha*
EBF1 : *Early B-Cell Factor 1*
EGIL : *European Group for Immunological characterization of Leukemias*
ELF1 : *E74 Like ETS Transcription Factor 1*
EORTC: *European Organisation for Research and Treatment of Cancer*
EPOR : *Erythropoietin Receptor*
ERG: *ets related gene*
ERK : *Extracellular signal-Regulated Kinases*
ETP : *Early T precursor*
ETV6: *ets variant 6*
FAB : *Franco-américano-britannique*
FBXW7 : *F-Box And WD Repeat Domain Containing 7*
FISH: *Fluorescence in situ hybridization*
FRALLE : *French Acute Lymphoblastic Leukaemia Study Group*
FT : *Facteur de transcription*
GATA1 : *GATA Binding Protein 1*
HLF : *Hepatic Leukemia Factor*
HOX11 : *Homeo Box 11*

HOX11L2 : *Homeo Box 11-L2*
iAMP21 : Amplification intrachromosomique du chromosome 21
IGH : *Immunoglobulin heavy*
IKZF1 : *IKAROS Family Zinc Finger 1*
IKZF2 : *IKAROS Family Zinc Finger 2*
IL : Interleukine
ITK : Inhibiteurs de tyrosine kinase
JAK2 : *Janus kinase 2*
KMT2A : *Lysine Methyltransferase 2A*
LA : Leucémie aiguë
LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique
LAM : Leucémie aiguë myéloïde
LEF1 : *Lymphoid enhancer-binding factor-1*
LMMP : Progéniteur lymphomyeloïde restreint
LMO2 : *LIM Domain Only 2*
LT-HSC : *Long term – Hematoipoietic Stem Cell*
MAPD : *Median Absolute Pairwise Difference*
MLL : *Mixed-lineage leukemia*
MLPA : Amplification de sondes dépendante d'une ligation
MRD : Maladie résiduelle (*minimal residual disease*)
MYB : *MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor*
NR3C1 : *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1*
NR3C2 : *Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2*
NUP214 : *Nucleoporin 214kDa*
OMS : Organisation mondiale de la santé
OR : *Odds Ratio*
OS : *Overall survival*
PAX5 : *Paired box 5*
PBX1 : *Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1*
PCR : *Polymerase chain reaction*
PDGFRB : *Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta*
PHF6 : *Plant homeodomain finger protein 6*
PTEN : *Phosphatase And Tensin Homolog*
RB1 : *Retinoblastoma 1*
RC : Rémission complète
RT-PCR : *Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*
RUNX1 : *Runt-related transcription factor 1*
RUNX1T1 : *Runt-related transcription factor 1 translocated to 1*
SCL : *Stem Cell Leukemia*
SH2B3 : *SH2B Adaptor Protein 3*
SIL : *SCL/TAL1 Interrupting Locus*
SMD : Syndrome Myélodysplasique
SNP : *Single Nucleotid Polymorphism*
SNPQC : *Single Nucleotid Polymorphism Quality Control*

ST-HSC : *Short term – Hematopoietic Stem Cell*
STAT : *Signal Transducers and Activators of Transcription*
TAL : *T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia*
TBL1XR1 : *Transducin (Beta)-Like 1 X-Linked Receptor 1*
TCF3 : *Transcription Factor 3*
TCR : *T cell receptor*
TdT : *Terminal deoxynucleotidyl transferase*
TLX1 : *T-Cell Leukemia Homeobox 1*
TLX3 : *T-Cell Leukemia Homeobox 3*
TOX : *Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box*
UCSC : *University of California Santa Cruz*
UPD : *Disomie uniparentale*
VPREB1 : *Pre-B Lymphocyte*
WNT : *Wingless-typ*
WT1 : *Wilms Tumor 1*

Sommaire

Abréviations et Acronymes	11
I) Hématopoïèse.....	18
A) Hématopoïèse physiologique	18
B) Hématopoïèse leucémique.....	21
II) Leucémies aiguës lymphoblastiques.....	22
A) Épidémiologie.....	22
B) Diagnostic.....	23
1) Signes cliniques	23
2) Examens biologiques	23
C) Classification	26
1) Étude cytologique.....	26
2) Étude immunologique.....	27
3) Étude moléculaire et cytogénétique.....	29
D) Facteurs pronostiques	30
1) Facteurs pré-thérapeutiques	30
2) Réponse au traitement	31
E) Traitement	33
III) Anomalies génétiques retrouvées dans les LAL.....	35
A) Biomarqueurs de classification dans les LAL-B.....	36
1) Biomarqueurs génétiques de bon pronostic	37
2) Biomarqueurs génétiques de mauvais pronostic.....	37
3) Biomarqueurs génétiques de pronostic intermédiaire.....	40
4) Autres biomarqueurs génétiques émergents des LAL-B	40
B) Biomarqueurs de classification dans les LAL-T.....	43
C) Délétions récurrentes dans les LAL.....	44
IV) Objectifs.....	50
V) Matériel et Méthodes.....	51
A) Patients	51
B) Isollements cellulaires	51
C) Extraction de l'ADN	52
D) Dosage de l'ADN.....	52
E) Cytoscan® HD Affymetrix.....	53

1)	Principe du SNP-array et caractéristique de la puce Cytoscan® HD	53
2)	Technique Affymetrix®	53
3)	Paramètres de qualité	63
F)	Logiciel ChAS Chromosome Analysis Suite	64
1)	Interprétation des anomalies du nombre de copies (CNA)	66
2)	Interprétation des disomies uniparentales (UPDs)	70
VI)	Résultats	72
A)	Anomalies du nombre de copies détectées	72
B)	Disomies uniparentales détectées	73
C)	Caryogrammes	74
1)	Caryogramme regroupant tous les patients de l'étude	74
2)	Caryogramme des patients hyperdiploïdes	75
3)	Caryogramme des patients non hyperdiploïdes	76
D)	Comparaisons	77
1)	Avec le caryotype conventionnel	77
2)	Avec la biologie moléculaire	78
E)	Classification des patients	79
1)	Classification avant Cytoscan® HD	79
2)	Apport du Cytoscan® HD dans la classification	80
3)	Classification après Cytoscan® HD	86
F)	Paysage génétique	87
1)	Patients hyperdiploïdes	87
2)	Patients non hyperdiploïdes	88
G)	Pronostic	90
VII)	Discussion	92
VIII)	Conclusion	96
IX)	Bibliographie	97
X)	Annexe	111

Table des illustrations

Tableau 1. Aspect morphologique des LAL - Classification FAB.....	27
Tableau 2. Classification EGIL des LAL-B.	28
Tableau 3. Classification EGIL des LAL-T.....	28
Tableau 4. Facteurs pronostiques utilisés en clinique adulte et pédiatrique adapté de Stock (35).	30
Tableau 5. Composants du kit Affymetrix®.....	54
Tableau 6. Comparaison des résultats du caryotype conventionnel et du Cytoscan® HD.	77
Tableau 7. Comparaison des résultats de MLPA et du Cytoscan® HD.	78
Tableau 8. Cas des délétions retrouvées en MLPA et pas en Cytoscan® HD.	78
Tableau 9. Classification par Cytoscan® HD des patients auparavant en échec.	80
Tableau 10. Paysage génétique des patients hyperdiploïdes.	87
Tableau 11. Paysage génétique des patients non hyperdiploïdes.	88
Tableau 12 Patients ayant rechuté et leurs facteurs pronostiques associés.....	90
Tableau 13. Étude des rechutes en fonction des translocations KMT2A.....	90
Tableau 14. Étude des rechutes en fonction des délétions de PAX5.	91
Tableau 15. Étude des rechutes en fonction des délétions d'IKZF1.....	91
Tableau 16. Étude des rechutes en fonction de la MRD1.	91
Tableau 17. Étude des rechutes en fonction de la MRD2.	91
Tableau 18. Données des patients de l'étude.	111
Figure 1. Les cellules sanguines matures.	18
Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse classiquement admise (6).	19
Figure 3. Schémas des derniers modèles de l'hématopoïèse (7).....	20
Figure 4. May Grünwald Giemsa (MGG)	22
Figure 5. Étude du matériel génétique.....	25
Figure 6. Courbes de survie estimée à 10 ans de 2852 enfants (43).	33
Figure 7. Fréquence des anomalies chromosomiques primaires.....	36
Figure 8. Gènes impliqués dans des anomalies récurrentes au sein des LAL	44
Figure 9. Répartition géographique des patients de l'étude.....	51
Figure 10. Étapes de la technique Cytoscan® HD Affymetrix.....	55
Figure 11. Workflow du Cytoscan® HD.	56
Figure 12. Électrophorèse permettant d'évaluer l'amplification et la ligation.	58
Figure 13. Électrophorèse permettant d'évaluer la fragmentation.....	59
Figure 14. Schéma de la réaction de marquage.....	60
Figure 15. Puce à ADN Cytoscan® HD Affymetrix.....	61
Figure 16. GeneChip Hybridization®.....	61
Figure 17. GeneChip® Fluidic Station 450.	61
Figure 18. Automate de scannage des biopuces.....	62
Figure 19. Interprétation des CNA et SNP.....	65
Figure 20. Représentation schématique des différents types de pertes d'hétérozygotie.....	66
Figure 21. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une situation normale.....	67
Figure 22. Représentation par le logiciel ChAS d'une zone sans anomalie du nombre de copies.....	67

Figure 23. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une délétion hémizygote. ...	68
Figure 24. Représentation par le logiciel ChAS d'une délétion hémizygote.	68
Figure 25. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'un gain d'une copie.	69
Figure 26. Représentation par le logiciel ChAS d'un gain d'une copie (ici en mosaïque).	69
Figure 27. Représentation schématique des différents types de pertes d'hétérozygotie.	70
Figure 28. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copies.	71
Figure 29. Représentation par le logiciel ChAS d'une perte d'hétérozygotie.	71
Figure 30. Répartition des anomalies du nombre de copies.	72
Figure 31. Fréquence des altérations d'intérêts les plus fréquemment retrouvées.	73
Figure 32. Caryogramme de tous les patients de l'étude.	74
Figure 33. Caryogramme des patients hyperdiploïdes.	75
Figure 34. Caryogramme représentant les altérations du nombre de copies des gènes des patients non hyperdiploïdes.	76
Figure 35. Classification des patients de l'étude avant l'utilisation du Cytocan® HD.	79
Figure 36. Gain de matériel génétique incluant RUNX1 et délétion télomérique.	81
Figure 37. Perte de matériel génétique observée par SNP-array.	82
Figure 38. Transcrits de fusion BCR-ABL1-like retrouvés parmi les patients de l'étude.	82
Figure 39. Délétion de matériel chromosomique entre PDGFRB et EBF1.	83
Figure 40. Gain de matériel chromosomique au niveau de JAK2 et de PAX5.	84
Figure 41. Gain de matériel chromosomique au niveau d'ABL1.	84
Figure 42. Délétion de matériel chromosomique entre CRLF2 et P2RY8.	85
Figure 43. Classification des patients de l'étude suite à l'utilisation du Cytoscan® HD.	86

I) Hématopoïèse

A) Hématopoïèse physiologique

L'hématopoïèse est un ensemble de phénomènes qui concourent à la fabrication et au remplacement continu et régulé des cellules sanguines.

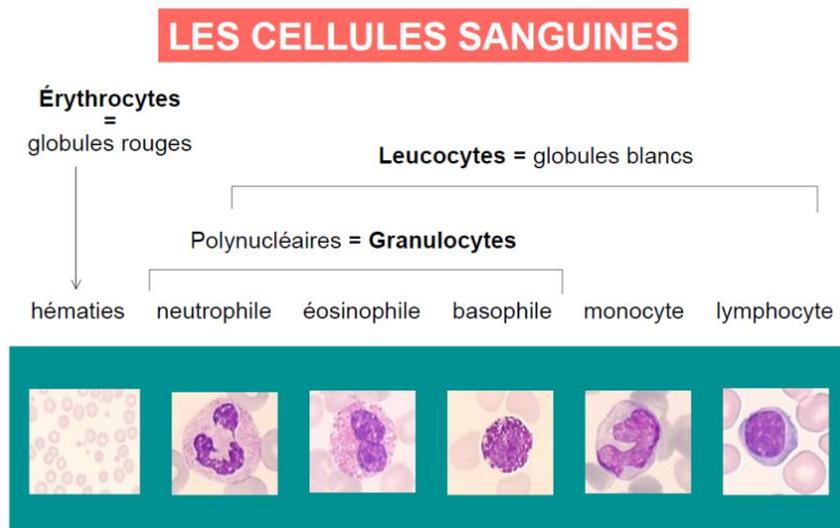


Figure 1. Les cellules sanguines matures.

Toutes les cellules du sang dérivent de la cellule souche hématopoïétique (CSH) localisée dans la moelle osseuse. Les cellules souches possèdent à la fois un potentiel d'auto-renouvellement, un potentiel de prolifération et un potentiel de différenciation (1) qui leur permettent de générer des cellules sanguines matures telles que représentées ci dessus (Figure 1). Les CSH possèdent également des capacités de migration et de dormance (2–4).

Le fonctionnement normal correspond à un équilibre entre production et destruction des cellules.

Les CSH représentent 0.05% des cellules de la moelle osseuse et sont divisées en trois compartiments distincts (5) :

- Les CSH avec renouvellement à long terme (LT-HSC), qui s'auto-renouvellent de façon illimitée tout au long de la vie de l'individu, reconstituant et pérennisant l'hématopoïèse physiologique.
- Les CSH avec renouvellement à court terme (ST-HSC) capables d'auto-renouvellement mais pour une durée limitée d'environ 8 semaines.
- Les progéniteurs multipotents (MPP), qui ont perdu leur potentiel d'auto-renouvellement, mais qui possèdent des capacités mitotiques et de différenciation élevées.

Selon le modèle stochastique le plus couramment admis, les LT-HSC se différencient en ST-HSC qui elles-mêmes donnent naissance aux MPP. Les MPP vont se différencier en progéniteurs myéloïdes communs (CMP) et en progéniteurs lymphoïdes communs (CLP), qui vont eux même se différencier pour aboutir aux cellules matures.

La différenciation et la maturation des CLP conduisent à la production des différents types de cellules lymphoïdes, à savoir les lymphocytes B et T et les *natural killer* (NK). Dans le cas des CMP, les granulocytes/monocytes, les plaquettes et les érythrocytes sont formés (2). Ces différentes étapes sont représentées ci-dessous (Figure 2) :

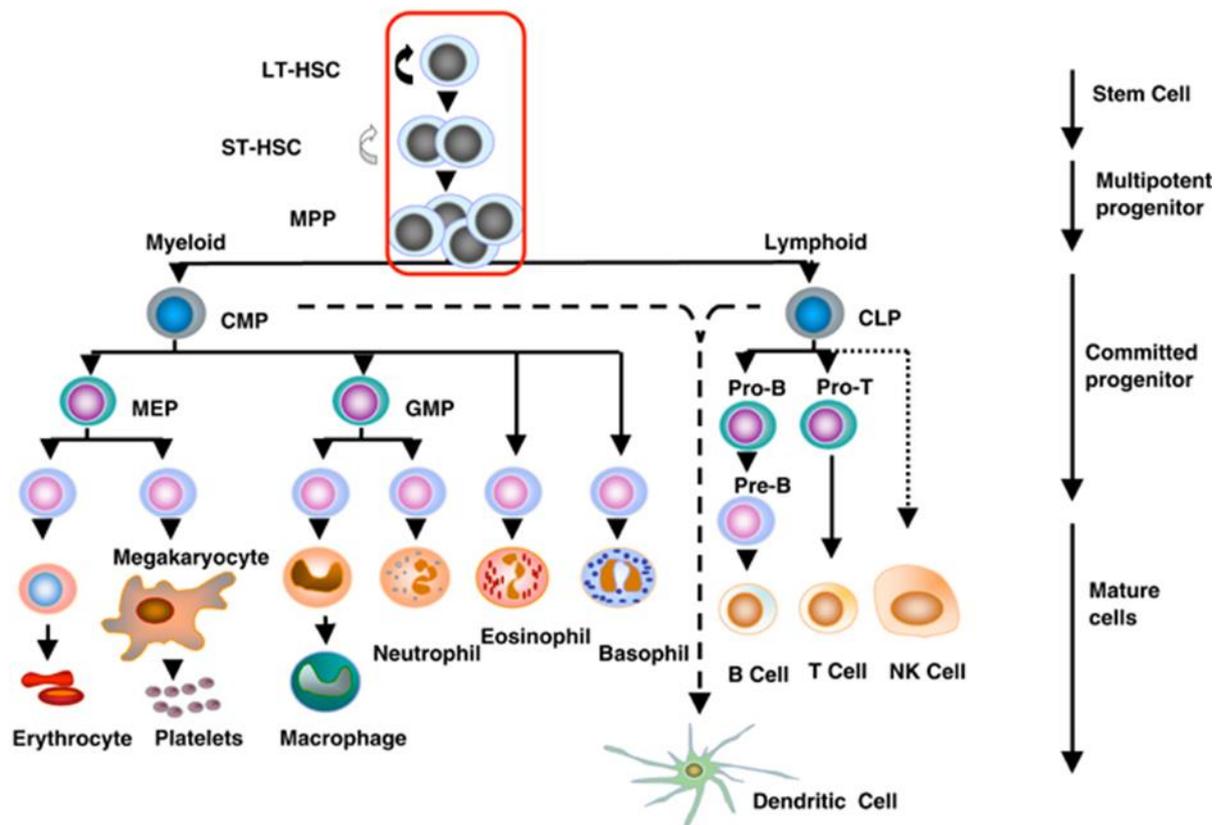


Figure 2. Schéma de l'hématopoïèse classiquement admise (6).

Cependant, ce modèle a été dernièrement remis en cause par la présence d'un progéniteur lymphomyéloïde restreint (LMMP), dans un modèle alternatif où ce LMMP serait situé à une place équivalente des CMP dans la hiérarchie des différentes lignées, ou encore dans le modèle du contournement où la lignée mégacaryocytaire pourrait se différencier indépendamment des CMP (7,8), comme l'illustre le schéma ci-après (Figure 3) :

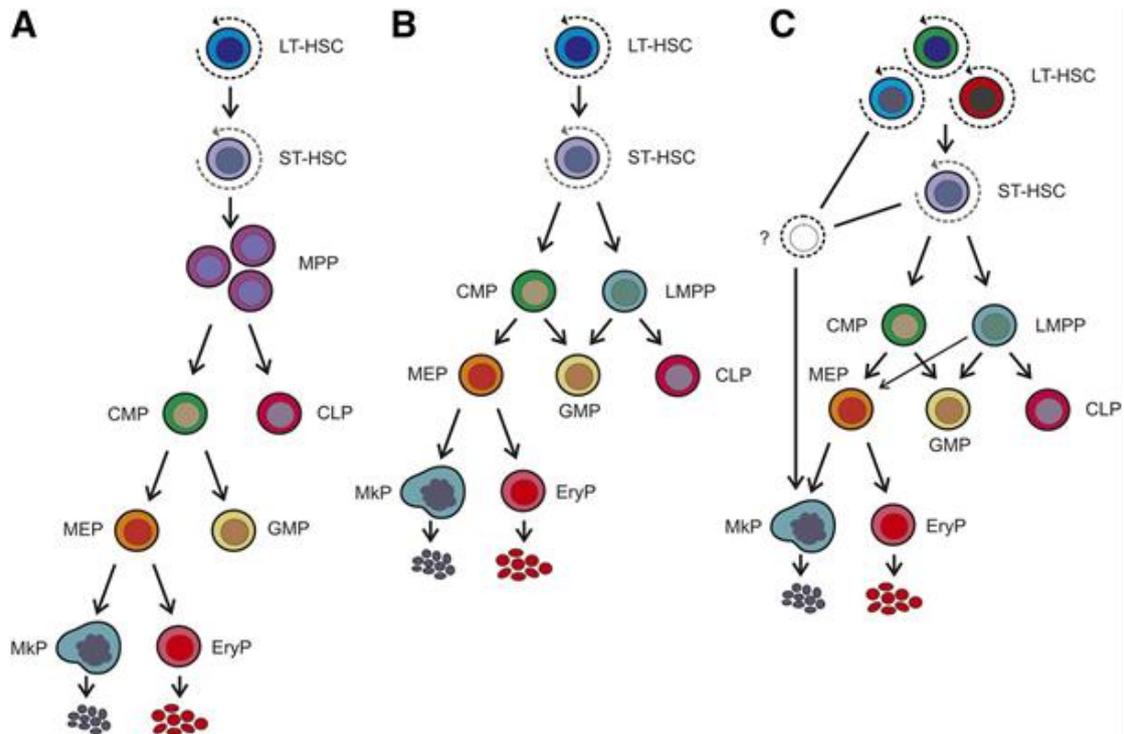


Figure 3. Schémas des derniers modèles de l'hématopoïèse (7).

A : Schéma classique de l'hématopoïèse.

B : Schéma alternatif de l'hématopoïèse.

C : Modèle du contournement de l'hématopoïèse.

La régulation de l'hématopoïèse résulte d'une part d'une composante extrinsèque par le micro-environnement médullaire : les cellules stromales (fibroblastes, cellules endothéliales et adipocytes), les cytokines et les facteurs de croissance (FC). Certaines molécules agissent sur la CSH durant les premières étapes de l'hématopoïèse telles que l'IL-1 (interleukin-1), l'IL-3 (interleukin-3), l'IL-6 (interleukin-6), l'IL-11 (interleukin-11). D'autres sont plus spécifiques de lignée tels que l'IL-5 (éosinophiles, lymphocytes B), l'EPO (érythropoïétine), le M-CSF (macrophage-colony stimulating factor) et le GM-CSF (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor).

D'autre part, la régulation intrinsèque est assurée par les facteurs de transcription (FTs). Ce niveau de régulation regroupe des protéines de liaison à l'ADN dont un grand nombre est impliqué dans des translocations chromosomiques ou des mutations somatiques dans les hémopathies malignes. Alors que certains de ces FTs sont importants dans la formation et le fonctionnement de la CSH, d'autres sont primordiaux dans la différenciation en une lignée spécifique (9).

Parmi les gènes importants pour la formation et le fonctionnement de l'ensemble des CSH, on retrouve les gènes *KMT2A* (*Lysine Methyltransferase 2A*, aussi connu sous le nom de *MLL Mixed-lineage leukemia*), *RUNX1* (*Runt-related transcription factor 1*), *ETV6* (*ets variant 6*) ou encore *LMO2* (*LIM Domain Only 2*) (10).

D'autre part, des gènes tels que *CEBPA* (*CCAAT/Enhancer Binding Protein Alpha*) ou *GATA1* (*GATA Binding Protein 1*) sont importants dans la différenciation. Les facteurs spécifiques de lignée favorisent la différenciation en une lignée spécifique tout en réprimant des facteurs d'autres lignées. Un exemple de telles protéines antagonistes est *GATA1* et *PU.1* qui favorisent la différenciation des érythrocytes/mégacaryocytes et des éléments de la lignée myéloïde respectivement (11).

B) Hématopoïèse leucémique

Le « two-hit model » de leucémogénèse de Gilliland (12) considère que les leucémies résultent de la coopération entre une anomalie au niveau des facteurs de transcription hématopoïétiques qui inhibe la différenciation et une anomalie activatrice qui favorise la prolifération. D'autres mécanismes supplémentaires interviennent en réalité, notamment des facteurs épigénétiques par l'acétylation d'histones ou par méthylation (13,14), et les microARNs (15).

Les leucémies résultent d'un ensemble de processus hématopoïétiques aberrants prenant origine dans des cellules souches leucémiques (CSL) rares ayant accumulé des mutations et/ou des modifications épigénétiques. Ces altérations permettent à la cellule, dénommée blaste, de maintenir ou de réacquérir la capacité d'auto-renouvellement et de prolifération clonale indéfinie (16).

Les altérations génétiques retrouvées dans les leucémies affectent de nombreux gènes codant pour des protéines jouant des rôles clés dans le développement lymphoïde tels que les gènes *PAX5* (*Paired box 5*), *IKZF1* (*IKAROS Family Zinc Finger 1*), *EBF1* (*Early B-Cell Factor 1*) et *LMO2*, dans la régulation du cycle cellulaire comme les gènes *CDKN2A/B* (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B*), *PTEN* (*Phosphatase And Tensin Homolog*) et *RB1* (*Retinoblastoma 1*), dans la signalisation lymphocytaire, ainsi que dans la régulation transcriptionnelle tels que *TBL1XR1* (*Transducin (Beta)-Like 1 X-Linked Receptor 1*), *ETV6* et *ERG* (*ets related gene*) (17,18).

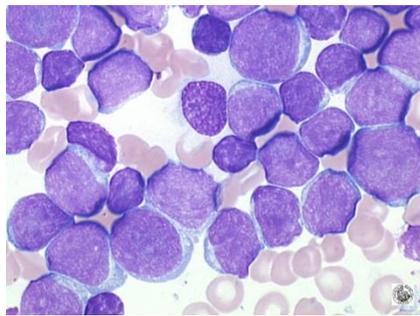
L'origine de la CSL est discutée :

- Une première hypothèse propose que la CSL soit une CSH ayant accumulé des mutations lui conférant un caractère leucémique. En effet, certaines CSH possèdent déjà le caractère d'auto-renouvellement, et ont une durée de vie qui permet l'accumulation de mutations.
- Une deuxième hypothèse postule que la CSL dériverait de progéniteurs engagés ou même différenciés : elle accumulerait des mutations suite à la réacquisition de la capacité d'auto-renouvellement. Certains oncogènes auraient donc la capacité de conférer à la cellule mature un potentiel d'auto-renouvellement.

II) Leucémies aiguës lymphoblastiques

Les leucémies aiguës (LA) constituent une variété d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale de blastes, cellules bloquées à un stade précoce de leur différenciation, au niveau de la moelle osseuse, du sang périphérique et éventuellement d'autres tissus (système nerveux central, ganglions, rate, foie).

Parmi elles, les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) résultent d'une prolifération clonale développée à partir d'une cellule lymphoïde immature.



**Figure 4. May Grünwald Giemsa (MGG)
Gx50 : blastes d'une LAL-B.**

A) Épidémiologie

L'incidence standardisée des LAL sur la population mondiale est de 1,9 pour 100 000 personnes-années chez l'homme et de 1,2 pour 100 000 chez la femme, soit un rapport hommes/femmes de 1,6.

Cette pathologie touche principalement l'enfant. Compte tenu de la répartition de cette hémopathie maligne, très dépendante de l'âge, le taux d'incidence spécifique par âge chez le garçon de moins de 15 ans est de 3,8 pour 100 000 personnes-années et 2,5 pour 100 000 chez la fille de même âge.

Chaque année, près de 500 cas incidents chez l'enfant de moins de 15 ans (44% des cas) sont dénombrés en France (19). Les leucémies aiguës lymphoblastiques représente le cancer le plus fréquent chez l'enfant : un tiers des cancers et 80% des LA (20).

Plus spécifiquement, environ deux tiers des cas surviennent entre 2 et 6 ans, avec un pic d'incidence entre 3 et 4 ans.

80% des LAL sont des LAL-B et 20% des LAL-T. Les LAL-T sont plus fréquentes chez l'adulte et l'adolescent que chez le jeune enfant (21).

L'incidence globale des LAL chez l'enfant peut varier d'un facteur 5 selon les pays. Comparé à celui des populations caucasiennes, le risque est plus faible dans les

populations noires (Odds Ratio (OR) : 0,39) et plus élevé dans les populations hispaniques (OR : 1,06) et natives d'Amérique (OR : 1,63) (22).

L'étiologie des LA reste inconnue dans la majorité des cas. Des facteurs génétiques et environnementaux ont été identifiés comme associés à un risque accru de développer une leucémie.

Ainsi, bien que les maladies génétiques représentent une faible proportion des LAL, certaines maladies héréditaires sont associées à un risque plus élevé de développer ces leucémies, ce qui est en faveur d'une prédisposition génétique pour les LAL. L'anémie de Fanconi (23), l'ataxie telangiectasie (24) ou encore le syndrome de Down (25) en sont des exemples.

De même les radiations ionisantes (26), des infections (27) ou l'exposition à des produits chimiques tels que les pesticides et les hydrocarbures (28) sont des facteurs incriminés.

B) Diagnostic

1) Signes cliniques

La présentation clinique est généralement aiguë. Les circonstances de découvertes sont variées :

- altération de l'état général
- insuffisance médullaire :
 - syndrome anémique (pâleur, asthénie, dyspnée)
 - infection
 - syndrome hémorragique (purpura pétéchial, ecchymoses, épistaxis, gingivorragies...)
- syndrome tumoral (polyadénopathies, hépatomégalie, splénomégalie...)
- douleurs osseuses et articulaires
- atteinte neurologique
- leucostase dans les formes très hyperleucocytaires (pulmonaire, cérébrale...)
- infiltration testiculaire rare

2) Examens biologiques

a) L'hémogramme

L'hémogramme est l'examen d'orientation de première intention. Les trois lignées peuvent être atteintes.

Une anémie est rencontrée dans 90% des cas, elle est typiquement normochrome normocytaire arégénérative.

Une thrombopénie est fréquemment retrouvée.

La leucocytose est très variable, les formes pouvant aller d'un statut hyperleucocytaire (>50G/L) à leucopénique (<4G/L). La neutropénie (<1,5G/L), quant à elle, est fréquente.

De même, sur frottis sanguins colorés au MGG, on observe le plus souvent la présence de cellules blastiques circulantes.

b) Le myélogramme

Le myélogramme est un examen indispensable pour établir le diagnostic. Il consiste en une analyse cytologique de la moelle osseuse, suite à une aspiration au niveau sternal ou iliaque.

Cytologie et cytochimie

L'examen cytologique de la moelle permet d'affirmer la LA par la présence d'au moins 20% de cellules blastiques (29). Le prélèvement permet une analyse morphologique effectuée après coloration au MGG complétée par une étude cytochimique (myéloperoxydase négative évocatrice) afin d'orienter vers le caractère possiblement lymphoïde des blastes.

Immunophénotypage

Par la suite, des analyses par cytométrie en flux (CMF) sont indispensables afin de confirmer la nature lymphoïde des blastes, caractériser l'appartenance à la lignée T ou B, et affiner la classification en fonction du degré de maturation des blastes (Classification EGIL).

De même, cet examen peut permettre de mettre en évidence des marqueurs aberrants (LAIP : *leukemia aberrant immunophenotype*) utiles pour le suivi de l'évolution du clone leucémique, la maladie résiduelle (MRD) Cf II-D-2-c.

Cytogénétique conventionnelle

Caryotype médullaire

Les examens de cytogénétique conventionnelle correspondent à une étude des chromosomes par division cellulaire. L'étude des cellules blastiques est systématiquement réalisée car elle est à la base de la classification OMS 2016 pour les LAL-B (21). La valeur pronostique de certaines anomalies caryotypiques est reconnue et prise en compte dans les indications thérapeutiques.

Un caryotype est réalisé sur les cellules blastiques médullaires, permettant de rechercher des anomalies quantitatives et qualitatives des chromosomes.

Le caryotype est établi par culture cellulaire d'une durée de 24h, blocage des mitoses en métaphases par la colchicine, choc hypotonique, fixation, étalement sur lames, dénaturation et marquage en bande. Enfin, le caryotype est analysé par lecture microscopique.

Au diagnostic, il est nécessaire :

- en l'absence d'anomalie détectée, d'analyser (comptage et identification des chromosomes) au moins 20 mitoses.

- en cas d'anomalies, d'avoir des critères de clonalité sur :
 - o 2 cellules au moins pour affirmer un même chromosome surnuméraire ou une même anomalie de structure.
 - o 3 cellules au moins pour affirmer la perte d'un même chromosome.

Cytogénétique moléculaire

Hybridation de sondes fluorescentes (FISH)

Cette technique d'hybridation ciblée est possible sur tous les gènes cibles impliqués dans des translocations récurrentes.

Elle permet la recherche d'un réarrangement de *KMT2A* (*MLL*) sur noyaux interphasiques avec des sondes *break-apart* car ce gène peut subir des réarrangements avec de nombreux partenaires.

Il est également possible d'utiliser des sondes de fusion de type *BCR-ABL1*, *ETV6-RUNX1* (*TEL-AML1*) et *TCF3-PBX1* (*Transcription Factor 3 - Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1*, aussi connu sous le nom *E2A-PBX1*).

Par ailleurs, des sondes de type *RUNX1-RUNX1T1* (*Runt-related transcription factor 1 translocated to 1*) peuvent permettre de détecter des amplifications intrachromosomiques du chromosome 21 (iAMP21).

La FISH peut également confirmer un caryotype de type hyperdiploïde par fixation de sondes au niveau des centromères.

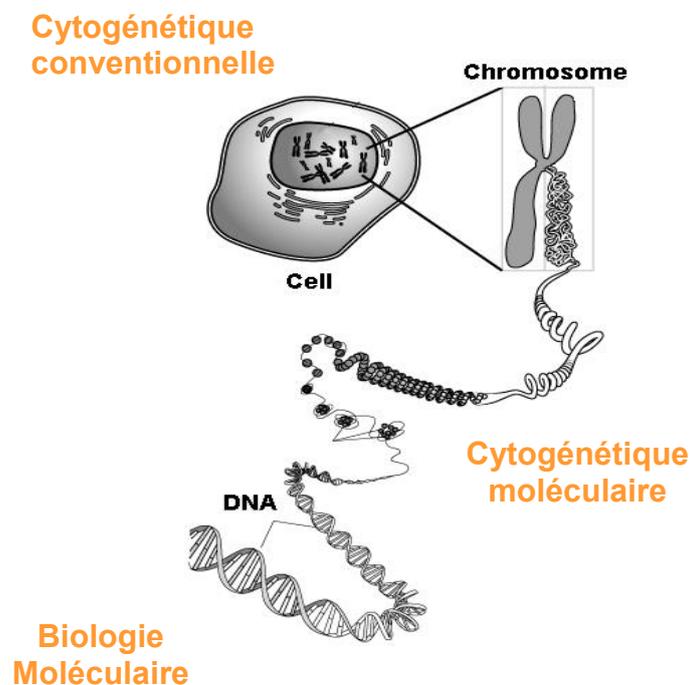


Figure 5. Étude du matériel génétique.

Biologie moléculaire

La biologie moléculaire permet la détection de transcrits de fusion, équivalents moléculaires des translocations chromosomiques, grâce aux techniques de RT-PCR (*Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction*), en complément des analyses de cytogénétique.

Dans les LAL-B, les transcrits de fusion recherchés sont *BCR-ABL1*, *AFF1-KMT2A* (*AF4/FMR2 Family Member 1*, aussi connu sous le nom *AF4*), *ETV6-RUNX1* et *TCF3-PBX1*.

Par ailleurs, la MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) et la PCR *Multiplex* permettent de rechercher des amplifications ou des délétions de régions codantes de l'ADN. Dans les LAL-B les délétions focales d'*IKZF1* sont recherchées.

Dans le cadre des LAL-T les transcrits recherchés sont *BCR-ABL1*, *NUP214-ABL1* (*Nucleoporin 214kDa-Abelson proto oncogene 1*), *SIL-TAL1* (*SCL/TAL1 Interrupting Locus- T-Cell Acute Lymphocytic Leukemia*) et des surexpressions de *TLX1* (*T-Cell Leukemia Homeobox 1*, aussi connu sous le nom *HOX11*, *Homeo Box 11*) et *TLX3* (*T-Cell Leukemia Homeobox 3* également appelé *HOX11L2*, *Homeo Box 11-L2*).

De plus, au sein des LAL-T, de nombreux patients présentent des mutations de *NOTCH1*, *FBXW7*, *NRAS*, *KRAS* et *PTEN* (30). Ces mutations sont recherchées par NGS (Séquençage de Nouvelle Génération).

En outre, la clonalité des cellules leucémiques retrouve un réarrangement soit des gènes codant pour le récepteur de l'antigène TCR (lignée T), soit de ceux codants pour la synthèse des immunoglobulines (lignées B, à partir du stade II de maturation).

Après *design* d'amorces spécifiques de ces réarrangements, le suivi de la MRD pourra s'effectuer grâce à la détection de la clonalité, avec une sensibilité excellente de l'ordre de 10^{-5} .

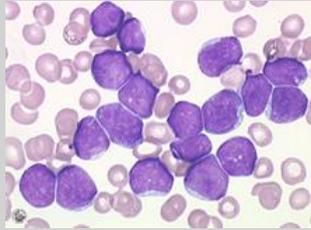
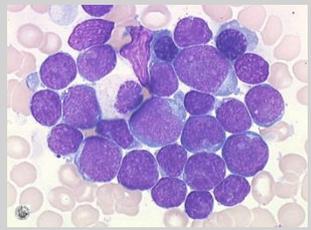
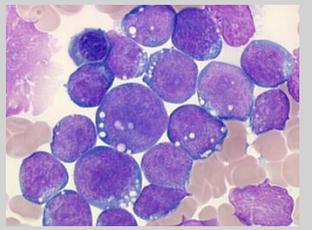
C) Classification

1) Étude cytologique

L'analyse du type cytologique des cellules blastiques permet de distinguer les deux grandes variétés de LA que sont les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) et les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL).

Le caractère lymphoïde de la leucémie est suggéré par l'absence de granulations cytoplasmiques et par l'analyse cytochimique retrouvant une négativité de la réaction des peroxydases dans le cytoplasme (caractérisant la lignée myéloïde hormis LAM0). La classification internationale FAB (franco-américano-britannique) distingue 3 variétés cytologiques de LAL en fonction des caractéristiques morphologiques (Tableau 1) (31).

Tableau 1. Aspect morphologique des LAL - Classification FAB.

	<u>Petits lymphoblastes</u> LI	<u>Grands lymphoblastes</u> LII	<u>Lymphome de Burkitt disséminé</u> LIII
Taille des blastes	< 2 diamètres lymphocytaires	> 2 diamètres lymphocytaires (hétérogène)	Grande, homogène
Chromatine	+/- Fine	Fine	Mottes ; aspect dense
Nucléole	Non visible	1 ou plus (>25% Blastes)	2 à 5
Rapport Nucléo/Cytoplasmique	>0,9	0,7-0,9 (hétérogène)	0,8-0,9
Contour noyau	Irrégulier	Irrégulier	Régulier
Basophilie cytoplasmique	Modérée	Variable	Intense
Vacuoles cytoplasmiques	Non	Non (ou rares)	Nombreuses
Commentaires	Surtout enfant	Surtout adulte	Rare (<5% des LAL)
Morphologie			

Désormais, la classification FAB, dépourvue d'impact pronostique, est abandonnée au profit de l'immunophénotypage et de la cytogénétique.

2) Étude immunologique

L'expression variable, par les cellules leucémiques, d'antigènes membranaires ou intracytoplasmiques regroupés en « CD » (cluster de différenciation) permet de déterminer si les lymphoblastes appartiennent à la lignée B ou T et préciser leur stade de différenciation. Cette caractérisation se fait en cytométrie en flux à l'aide d'anticorps monoclonaux, chaque anticorps utilisé étant spécifique d'un antigène donné.

L'immunophénotype est défini par l'ensemble des CD exprimés par les cellules leucémiques (32).

a) Leucémie aiguë lymphoblastique de type B

Les LAL de la lignée B représentent 80 à 85% des cas de LAL chez l'enfant. Elles sont caractérisées par la présence du CD19 qui est spécifique de la lignée B.

La distinction des 4 stades de maturation des LAL-B s'effectue en fonction de marqueurs antigéniques (Tableau 2).

Les formes les plus fréquentes correspondent au stade II de maturation, dites pré-pré-B ou B communes (55 à 60%) ; les cellules blastiques expriment le CD10 (antigène commun des LAL CALLA).

Les formes dites pré-B représentent 15 à 20% des cas et sont caractérisées par la présence d'une chaîne lourde d'immunoglobuline intracytoplasmique (c μ). Les LAL-B matures, ou leucémies de Burkitt, sont rares (1 à 2%) ; les cellules blastiques expriment des immunoglobulines de surface (slg). Les formes les plus immatures (CALLA négatif) sont également rares.

Tableau 2. Classification EGIL des LAL-B.

<i>LAL de type B</i>	<u>CD19, CD22 (s/c), cCD79a</u>	<u>CD10</u>	<u>cμ</u>	<u>slg</u>
B-I (Pro-B)	+	-	-	-
B-II (B commune ou Pré Pré-B)	+	+	-	-
B-III (Pré-B)	+	±	+	-
B-IV (Mature B)	+	±	±	+

b) Leucémie aiguë lymphoblastique de type T

Les LAL de la lignée T représentent 15 à 20% des LAL de l'enfant. L'appartenance à la lignée T est établie par la positivité du CD3. De même que pour la lignée B, la distinction des 4 stades de maturation des LAL-T s'opère en fonction de marqueurs antigéniques (Tableau 3).

Tableau 3. Classification EGIL des LAL-T.

<i>LAL de type T</i>	<u>cCD3, CD7</u>	<u>CD2, CD5, CD4 et/ou CD8</u>	<u>CD1a</u>	<u>sCD3</u>
T-I (Pro-T)	+	-	-	-
T-II (Pre-T)	+	+	-	-
T-III (Corticale)	+	+	+	+/-
T-IV (Mature T)	+	+	-	+

3) Étude moléculaire et cytogénétique

L'examen cytogénétique reste la base de la nouvelle classification OMS 2016 (21). Il constitue un élément fondamental de la prise en charge des LAL, contribuant à en démontrer l'hétérogénéité.

a) *Leucémie aiguë lymphoblastique de type B*

Selon la classification de l'OMS (21,29), les LAL-B sont divisées en 2 groupes :

- Les LAL-B associées à des anomalies génétiques récurrentes.
- Les LAL-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes.

Dans le premier groupe, on retrouve les anomalies suivantes :

- t(9;22)(q34;q11.2) conduisant à la formation du gène de fusion *BCR-ABL1*
- les translocations impliquant un réarrangement de *KMT2A* (11q23) : t(v;11q23) principalement les t(4;11)(q21;q23) et t(11;19)(q23;p13.3)
- t(12;21)(p13;q22) conduisant à la fusion *ETV6-RUNX1*
- l'hyperploïdie, soit un nombre de chromosomes compris entre 51 et 65
- l'hypoploïdie, soit un nombre de chromosomes inférieur à 45
- t(5;14)(q31;q32) IL3-IGH conduisant à la surexpression d'IL3
- t(1;19)(q23;p13.3) entraînant la fusion *TCF3-PBX1*

Depuis 2016, la classification OMS intègre 2 nouvelles entités provisoires :

- l'amplification intrachromosomique sur le chromosome 21
- les translocations *BCR-ABL1-like*

Le deuxième groupe rassemble les LAL-B non associées à des anomalies génétiques récurrentes : LAL-B « others ».

b) *Leucémie aiguë lymphoblastique de type T*

Selon la classification de l'OMS de 2016, les LAL-T ne sont pas divisées selon les facteurs génétiques car ceux-ci ne sont pas clairement associés à des caractéristiques biologiques uniques des LAL-T.

L'absence de différence clinico-biologique a amené l'OMS à ne pas les subdiviser. Seules les LAL *Early T precursor* (ETP ALL), qui possèdent une biologie unique sont reconnus comme une entité à part entière (21).

D) Facteurs pronostiques

En 1993, le « *Cancer Therapy Evaluation Program* » du *National Cancer Institute* (NCI) définissait des facteurs pronostiques uniformes pouvant être utilisés dans des études futures (33). L'analyse rétrospective des données cliniques, cytologiques, immunologiques et cytogénétiques a permis de compléter ces facteurs pronostiques, permettant d'adapter l'intensité des traitements sur des bases rationnelles. Ces nombreux facteurs sont souvent associés entre eux. L'intensité du traitement efface cependant certains facteurs pronostiques.

1) Facteurs pré-thérapeutiques

De nombreux facteurs de mauvais pronostic ont à ce jour été identifiés tels que l'âge, l'hyperleucocytose, l'envahissement blastique du système nerveux central (SNC), ou la génétique (34).

Alors que les LAL pédiatriques sont réparties en deux groupes de pronostic favorable et défavorable, on ne retrouve pas de groupe considéré comme favorable au sein des LAL de l'adulte (Tableau 4) (35).

Tableau 4. Facteurs pronostiques utilisés en clinique adulte et pédiatrique adapté de Stock (35).

FACTEURS PRONOSTIQUES	STANDARD	DEFAVORABLE
Adultes		
Age (années)	< 35	> 60
Leucocytose au diagnostic (G/L)	< 30	> 30
Immunophénotype	T III	ETP, T IV
Génotype	/	BCR-ABL1
		AFF1-KMT2A / autres KMT2A
		Hypodiploïdie < 44 chromosomes
		Complexe (≥ 5 anomalies)
Maladie résiduelle après induction	< 0,01%	> 0,01%
	FAVORABLE	DEFAVORABLE
Pédiatriques		
Age (années)	1 à 9 ans	< 1 an ou ≥ 10ans
Leucocytose au diagnostic (G/L)	< 50	> 50
Immunophénotype	B I à B III	ETP
Génotype	Hyperdiploïdie > 50 chromosomes	BCR-ABL1
	ETV6-RUNX1	AFF1-KMT2A / autres KMT2A
		Hypodiploïdie < 44 chromosomes
Maladie résiduelle après induction	< 0,01%	≥ 1%

a) Âge

L'âge est un facteur pronostic majeur, tant en matière de taux de rémission qu'en durée de rémission complète. Chez l'adulte, plus l'âge au diagnostic est élevé, moins le pronostic est favorable. En effet, les patients de plus de 50 ans ont un taux de survie à 3 ans de 20% (36). Chez l'enfant, les LAL survenant avant l'âge de 1 an ont un pronostic défavorable. On considère que les LAL sont de pronostic plus favorable entre 1 et 10 ans. A noter que l'âge de survenue d'une LAL est étroitement corrélé aux anomalies cytogénétiques ; en effet, les réarrangements de *KMT2A* (défavorables) sont essentiellement retrouvés avant 1 an, la fusion *BCR-ABL1* (défavorable) représente plus de 30% des LAL de l'adulte (3% chez l'enfant) et les anomalies de bon pronostic (fusion *RUNX1-ETV6* et hyperdiploïdie) sont pour la plupart retrouvées entre 1 et 10 ans.

b) L'hyperleucocytose

L'hyperleucocytose supérieure à 50 000/mm³ chez l'enfant et supérieure à 30 000/mm³ chez l'adulte est associée à un mauvais pronostic (37).

c) L'envahissement du SNC

La ponction lombaire au diagnostic permet la recherche de cellules blastiques dans le liquide céphalo-rachidien (LCR). On définit l'atteinte méningée par l'existence de plus de 5 éléments/mm³ avec présence de blastes, quel que soit le taux de ces derniers (Protocole FRALLE 2000) (38).

d) Immunophénotypage

Les LAL-T sont plus à risque de rechute que les LAL-B, et la survie est moindre.

Au sein des LAL-T, les ETP-ALL semblaient de moins bon pronostic mais les nouvelles études ne corroborent pas cette observation (39).

e) Génétique

Le pronostic est étroitement lié aux altérations génétiques. Un point complet concernant les connaissances des anomalies génétiques au sein des LAL sera développé au chapitre III).

2) Réponse au traitement

La réponse initiale au traitement est un facteur pronostique important.

a) Corticorésistance

La corticorésistance n'est évaluable que si la blastose sanguine au diagnostic est supérieure ou égale à 1 000/mm³.

La corticosensibilité est définie par un nombre de blastes inférieur à 1 000/mm³ sur le frottis sanguin de J8 après 8 jours de corticoïdes et une injection de méthotrexate intrathécale. A l'inverse, la corticorésistance, de mauvais pronostic, est définie par un nombre de blastes supérieur à 1 000/mm³ à J8.

b) Chimiorésistance

La chimiosensibilité est définie par un taux de blastes inférieur à 5% au myélogramme de J21 (moelle dite M1) suite à la chimiothérapie initiale.

La chimiorésistance est définie par un taux de blastes supérieur à 5% à J21. On distinguera :

- les moelles dites "M2" : 6 à 25% de blastes
- les moelles dites "M3" : supérieur à 25% de blastes

Néanmoins, l'examen du myélogramme en sortie d'aplasie est peu sensible et parfois difficile d'interprétation (présence de blastes de régénération, moelle de richesse variable).

c) Maladie résiduelle

La maladie résiduelle permet d'évaluer quantitativement à J35 et J70, après la mise en route du traitement, l'ensemble des cellules malignes persistant dans l'organisme et non détectables par les techniques morphologiques classiques.

Dans ce contexte, le développement des techniques de PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR) sur ADN et ARN, ainsi que de la cytométrie en flux, permettent d'évaluer de façon plus sensible et plus précise la réponse thérapeutique à l'échelle individuelle.

Ainsi, la mesure de la MRD prend désormais pleinement sa place comme outil décisionnel prospectif (40,41), en permettant de proposer une intensification et éventuellement une allogreffe de CSH aux patients présentant un risque génétique favorable ou intermédiaire mais néanmoins une MRD positive après une cure de consolidation (42).

E) Traitement

Depuis plus de 50 ans, le grand nombre d'études protocolaires successives a bouleversé les taux de guérison des enfants atteints de LAL. Entre 1960 et 2007, les chances de survie à 10 ans d'un patient pédiatrique sont passées de 10 à 90% environ (Figure 6) (43).

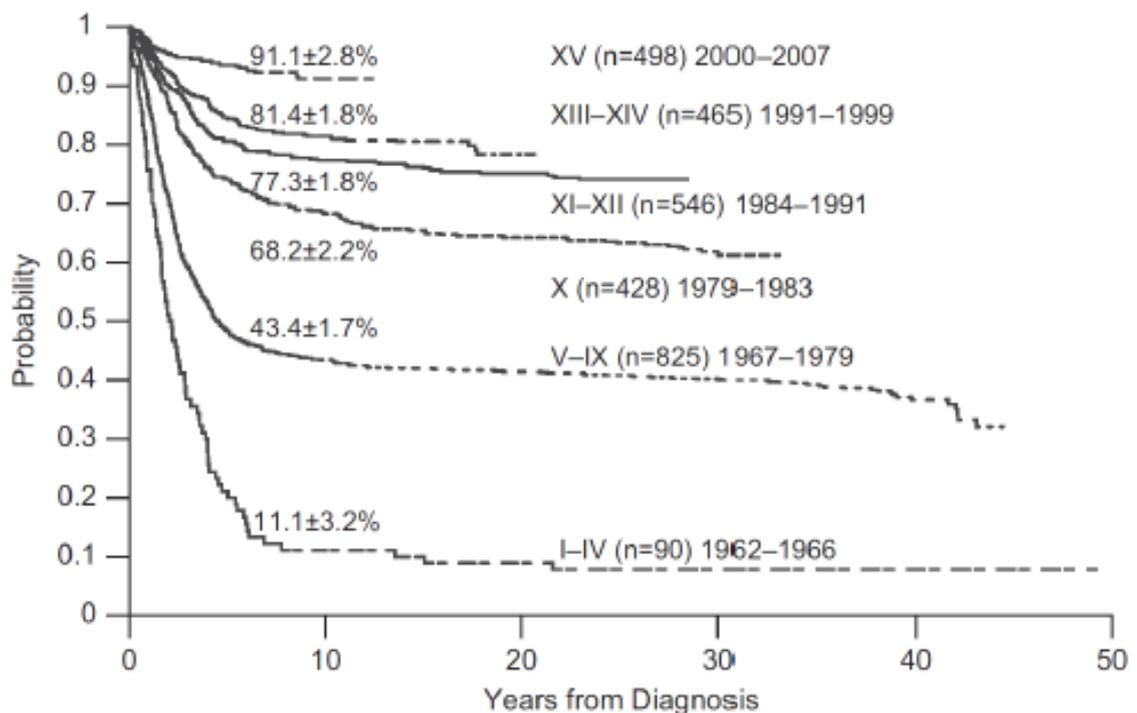


Figure 6. Courbes de survie estimée à 10 ans de 2852 enfants (43).

Désormais, l'amélioration de la survie des patients pose le problème des effets secondaires et des séquelles des traitements lourds administrés.

La connaissance des mécanismes de résistance et du profil d'expression génique des cellules leucémiques permet d'affiner le choix des traitements en fonction du type et du stade évolutif de la maladie.

Le schéma du traitement des LAL de l'enfant comprend cinq phases majeures :

- une préphase par administration à forte dose de corticoïdes, médicaments responsables de multiples effets secondaires tels que des désordres hydro-électrolytiques, un hypercorticisme, une immunodépression

- une phase d'induction, visant à obtenir une rémission complète initiale. Cette phase dure 4 semaines, dans laquelle sont administrés :

- une anthracycline, tel que la daunorubicine, à forte toxicité cardiaque
- un alcaloïde de la pervenche, vincristine ou vindésine, à forte toxicité neurologique
- de la L-asparaginase, avec risque de pancréatite
- un corticoïde,

- une phase de consolidation de 2 à 3 mois, où sont introduits d'autres agents de chimiothérapie, afin d'éviter la sélection d'un clone résistant (44). Les cycles de chimiothérapie alternent de fortes doses :
 - de méthotrexate, à forte toxicité hématopoïétique
 - de cytarabine, également à forte toxicité hématopoïétique
 - de L-asparaginase
- deux phases d'intensification retardées, qui correspondent à une 2^{ème} induction, 2 semaines après la fin de la consolidation.
- un traitement d'entretien, qui a pour buts de limiter la reprise évolutive et de détruire les clones leucémiques persistants (45). Il doit être continu et repose sur l'association orale de 6-mercaptopurine (6-MP) quotidienne et de méthotrexate hebdomadaire, à laquelle peuvent s'associer des cures de chimiothérapie intermittentes de vincristine et de corticoïdes.

Parallèlement, un traitement prophylactique des atteintes méningées est entrepris du fait de l'existence de la barrière hématoencéphalique s'opposant à la pénétration des drogues de chimiothérapies.

Par ailleurs, ces traitements peuvent éventuellement être complétés d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques selon le pronostic de la maladie, l'évaluation de la maladie résiduelle et la capacité du patient à en supporter la forte toxicité.

Ces dernières années, la mise en évidence d'anomalies chromosomiques impliquant des gènes de tyrosines kinases, *BCR-ABL1* ou *BCR-ABL1-like*, permet de traiter les patients réfractaires, jusqu'alors difficiles à soigner. Le traitement repose sur l'administration de thérapies ciblées telles que des inhibiteurs de tyrosine kinases : l'imatinib ou le dasatinib en cas de transcrite type *ABL1* ou le ruxolitinib en cas de transcrite de type *JAK2*, en association à la chimiothérapie (46,47).

En France, deux groupes coopérateurs pour le traitement des leucémies aiguës lymphoblastiques pédiatriques étaient en place : le groupe FRALLE et l'EORTC CLCG. Désormais, les nouveaux protocoles sont regroupés par le CAALL-F01.

III) Anomalies génétiques retrouvées dans les LAL

Des anomalies primaires sont responsables de l'initiation d'un clone pré-leucémique qui, lors de l'acquisition de modifications génétiques secondaires complémentaires, progresse en une véritable LAL.

Les anomalies primaires sont présentes dans toutes les cellules y compris le clone leucémique. Elles correspondent souvent à des translocations entraînant des gènes de fusion chimériques, ou des aneuploïdies (gain ou perte de plusieurs chromosomes entiers) (48).

Les anomalies secondaires ne sont présentes quant à elle que dans un sous-ensemble des cellules leucémiques. Elles donnent lieu à des ramifications sous-clonales complexes, dont l'architecture correspond généralement à des anomalies du nombre de copies (CNA) (souvent des microdélétions) et des mutations ponctuelles (49). Le profil génétique complet des patients présentant une LAL permet d'identifier des biomarqueurs pronostiques et prédictifs importants qui peuvent être utilisés pour adapter la thérapie (Figure 7) (50). Nous détaillerons ici les biomarqueurs pouvant être retrouvés au sein des LAL de l'enfant et de l'adulte jeune.

A) Biomarqueurs de classification dans les LAL-B

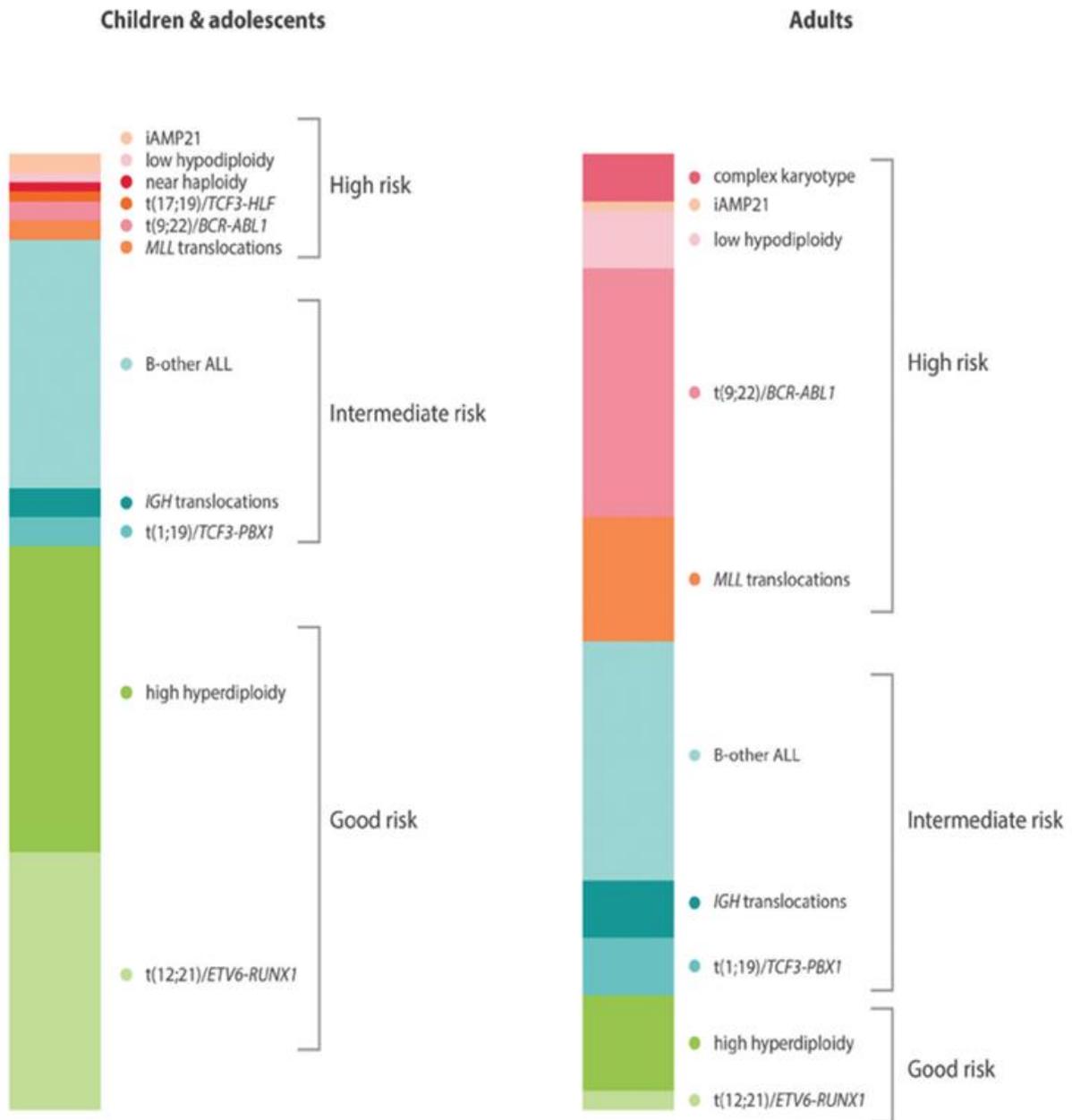


Figure 7. Fréquence des anomalies chromosomiques primaires chez les enfants et les adultes atteints de LAL-B (50).

1) Biomarqueurs génétiques de bon pronostic

Chez les enfants et adolescents, les marqueurs génétiques de bon pronostic représentent 50% des cas de LAL (Figure 7).

Ces patients présentent soit une translocation *ETV6-RUNX1*, soit une hyperdiploïdie. De nombreuses études ont examiné la pertinence pronostique des anomalies secondaires mais aucun biomarqueur supplémentaire fiable n'a vu le jour jusqu'à présent. Compte tenu de l'excellente survie des patients présentant ces anomalies cytogénétiques, il est difficile d'envisager des biomarqueurs émergents réalisables cliniquement à partir de ce groupe de risque.

- **t(12;21)(p13;q22) / ETV6-RUNX1**

Les translocations *ETV6-RUNX1* représentent 25 % des LAL-B de l'enfant.

Elles sont associées à une survie à 5 ans très favorable de 96% (51).

Il s'agit typiquement de LAL-B communes (BII selon l'EGIL) avec des marqueurs myéloïdes CD13 et/ou CD33 fréquemment associés.

Le résultat de la translocation chromosomique t(12;21)(p13;q22) est cytogénétiquement cryptique : la FISH ou la RT-PCR sont donc indispensables pour détecter cette anomalie.

- **Hyperdiploïdies (51 à 65 chromosomes)**

La fréquence des LAL-B hyperdiploïdes chez l'enfant est de 25%.

Le pronostic est très favorable avec une survie globale (OS) à 6 ans de 96% (52).

Les hyperdiploïdies sont caractérisées par des trisomies non aléatoires touchant essentiellement les chromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21 qui représentent plus de 75 % des gains (47–50).

Elles sont détectées communément par le caryotype, mais un index d'ADN supérieur à 1,16 en CMF est un argument orientant vers ce type d'anomalie.

2) Biomarqueurs génétiques de mauvais pronostic

Certaines anomalies chromosomiques sont reconnues comme biomarqueurs pronostiques de haut risque de rechute à tout âge (57).

La fréquence de ces aberrations génétiques de haut risque est 4 fois plus élevée chez les adultes que chez les enfants et les adolescents ce qui explique, en partie, la forte corrélation entre l'âge et le pronostic (50).

Les patients atteints d'une de ces anomalies sont classés à risque élevé dans les protocoles et traités avec des thérapies plus intensives. S'ils sont traités comme un risque standard, les patients atteints d'une de ces aberrations ont un risque de rechute et/ou de décès environ 3 fois supérieur par rapport aux patients à risque intermédiaire.

Les translocations impliquant *KMT2A*, *BCR-ABL1* ou *TCF3-HLF* (*Hepatic Leukemia Factor*) sont aisément détectables par cytogénétique, FISH et RT-PCR.

- **KMT2A (MLL)**

Lysine Methyltransferase 2A 11q23.3

Les translocations *KMT2A* ont une prévalence forte aux âges extrêmes de la vie : chez les adultes > 70 ans mais surtout dans les LAL du nourrisson < 1 an où elles représentent près de 80% des cas (58).

Le gène *KMT2A*, situé au niveau 11q23, subit des réarrangements avec de très nombreux gènes partenaires. Notamment, *AFF1 (AF4)*, *MLLT1 (ENL)*, *MLLT4 (AF6)*, *MLLT3 (AF9)* et *MLLT10 (AF10)* représentent plus de 85% des cas dans les LAL.

La FISH du locus 11q23 avec une sonde *break-apart* est la méthode de détection la plus appropriée (59).

Le plus fréquemment, les LAL présentant cette anomalie sont hyperleucocytaires et de type pro-B (BI selon l'EGIL).

Chez le nourrisson, elles sont de mauvais pronostic avec une fréquence importante d'invasion neuro-méningée et une survie à 5 ans < 30%.

- **t(9;22)(q34;q11) / BCR-ABL1**

La translocation *BCR-ABL1* est rare chez l'enfant avec une prévalence inférieure à 3% (mais il s'agit de l'anomalie la plus fréquente chez les adultes où elle représente 30% des cas).

Généralement ce sont des LAL-B communes (BII selon l'EGIL) avec expression d'un ou plusieurs marqueurs myéloïdes en CMF.

Cette translocation constitue un biomarqueur prédictif primordial car elle peut permettre la mise en place d'une thérapie ciblée avec un inhibiteur de tyrosine kinase, tel que l'imatinib ou le dasatinib (60). En effet, les inhibiteurs de tyrosine kinases inhibent directement l'effet leucémogène de l'oncoprotéine *BCR-ABL1* en combinaison avec la chimiothérapie standard. Cette stratégie produit des résultats significativement supérieurs à la chimiothérapie seule chez les patients de tout âge (61,62).

- **t(17;19)(q22;p13.3) / TCF3-HLF**

La translocation *TCF3-HLF* est exceptionnellement retrouvée, avec une estimation à 0,1% des cas.

Cette translocation est associée à une hypercalcémie et à des coagulopathies. Elle est de très mauvais pronostic avec des rechutes et décès presque constants (63,64).

- **Hypodiploïdie**

L'entité des hypodiploïdies contient deux sous-groupes qui montrent une propension à subir une duplication chromosomique, créant ainsi un dilemme diagnostique lorsque le sous clone hypodiploïde est dupliqué, ce qui peut amener à le confondre avec une LAL hyperdiploïde.

Les LAL « near haploidy » tout comme les « low hypodiploidy » montrent une activation des voies de signalisation *Ras* et de la phosphoinositide 3 - kinase (PI3K). Sensibles aux inhibiteurs de la PI3K, ces médicaments devraient être explorés comme une nouvelle stratégie thérapeutique pour cette forme agressive de leucémie.

Toutefois, ces deux sous-groupes sont généralement distingués les uns des autres. Le motif chromosomique perte/gain y est distinct.

« Near haploidy » : moins de 30 chromosomes

L'haploïdie proche est présente dans environ 1% des LAL de l'enfant <15 ans mais jamais retrouvée chez le nourrisson ou l'adulte.

Elle est définie par une perte chromosomique massive résultant en un nombre modal de moins de 30 chromosomes (65). Les chromosomes sexuel X/Y et les chromosomes 10, 14, 18, et 21 sont le plus souvent conservés.

Fréquemment des mutations activatrices de *Ras* sont retrouvées ainsi que des altérations d'*IKZF1*.

« Low hypodiploidy » : 30-39 chromosomes

Les faibles hypodiploïdies sont définies par une perte chromosomique résultant en un nombre modal compris entre 30-39 chromosomes (65). Les clones sont typiquement monosomiques pour les chromosomes 3, 7, 15, 16 et 17 tandis que les chromosomes 1, 6, 11 et 18 sont volontiers diploïdes (57).

On y retrouve des altérations de *TP53* (*Tumor Protein P53*), *CDKN2A/B* et *RB1*, et des mutations/délétions de *IKZF2* (*IKAROS Family Zinc Finger 2*).

- **t(5;14)(q31;q32) / IL3-IGH**

Parmi les translocations d'IGH (*Immunoglobulin heavy*), les translocations IL3-IGH sont majoritaires.

Leur fréquence est faible parmi les enfants de moins de 10 ans (<3%) alors qu'elle est beaucoup plus élevée (10%) parmi les adolescents et les adultes jeunes (15-24 ans).

Ces LAL sont associées à une hyperéosinophilie du fait de l'hyperexpression de l'IL3.

La translocation IgH est de mauvais pronostic avec une survie faible (66).

3) **Biomarqueurs génétiques de pronostic intermédiaire**

- **t(1;19)(q23;p13) / TCF3-PBX1**

La fréquence des t(1;19)(q23;p13) est proche de 5% des LAL-B de l'enfant et 3% chez l'adulte.

Le plus souvent ce sont des LAL pré-B (BIII selon l'EGIL).

L'anomalie correspond à une fusion de gènes codant pour des facteurs de transcription, facilement identifiée par FISH, RT-PCR et cytogénétique car elle apparaît souvent déséquilibrée au caryotype.

Le pronostic associé à cette anomalie est encore mal défini, mais des études récentes à partir de protocoles de chimiothérapie intensive ont rapporté une issue favorable dans plus de 80% des cas (51,67,68).

4) **Autres biomarqueurs génétiques émergents des LAL-B**

- **LAL-B « others »**

Environ un quart des LAL-B regroupées sous le terme de « B others » ne sont concernées par aucune des anomalies mentionnées ci-dessus.

Néanmoins, une multitude de microdélétions touchant des gènes clés dans la pathogénèse ont été découvertes par SNP-array (*Single Nucleotide Polymorphism*, puces pour polymorphisme des nucléotides) dans les LAL, alors qu'elles ne l'étaient pas par cytogénétique conventionnelle. Ces microdélétions résultant de l'activité aberrante du système de la recombinaison, correspondent aux altérations génétiques les plus fréquentes au sein des LAL (69).

Le profil des anomalies du nombre de copies (CNA) est un biomarqueur pronostique. La quasi-totalité de ces CNA sont des aberrations secondaires, sous-clonales, et pouvant être acquises, perdues ou enrichies entre le diagnostic et la rechute (64–66).

Le profil d'expression génique est utilisé pour définir des sous-groupes cytogénétiques et en même temps identifier de nouveaux sous-groupes de patients, tels que les fusions *BCR-ABL 1 like* (67–69). Plusieurs réarrangements de ce type ont ainsi été identifiés, constituant de nouvelles cibles thérapeutiques (76).

- **Amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21)**

La caractéristique constante de tous les cas d'iAMP21 est l'amplification du locus situé en *RUNX1* 21q22.12, qui fournit la base pour une détection appropriée par FISH en utilisant des sondes spécifiques de locus.

La définition acceptée internationalement de l'iAMP21 est la présence de trois copies supplémentaires du gène *RUNX1* sur un seul chromosome 21 anormal, ce qui correspond à au moins 5 signaux par cellule.

Les patients avec une iAMP21 présentent le plus fréquemment un immunophénotype de type LAL-B commune (BII selon l'EGIL) ou pré-B (BIII), sont plus âgés (âge

médian de 9 ans) mais l'iAMP21 est rare chez l'adulte. La fréquence rapportée de présentation de cette anomalie est de 2% chez les enfants. Ces patients ont une leucocytose médiane au diagnostic de 3,9 G/L, inférieure à celle des autres enfants atteints de LAL (77). Les patients traités comme ceux présentant une LAL de risque standard ont un taux très élevé de rechute (supérieur à 80%), mais qui est significativement réduit (inférieur à 20%) lorsque les patients sont traités intensivement (78).

- **Délétion d'*IKZF1***

IKAROS Family Zinc Finger 1 7p12.2

Les délétions d'*IKZF1* se produisent dans 15% des cas pédiatriques et 30% des cas adultes, mais elles sont plus fréquentes chez les patients avec transcrite *BCR-ABL1* (supérieur à 60%) (73–75).

Le motif de suppression varie entre les patients, mais les deux types de délétions les plus courants sont d'une part la perte des exons 4 à 7 chez 37 % des patients, associée à une activité oncogénique, et d'autre part la perte des exons 2 à 7 chez 20 % des patients qui résulte en une transcription aberrante empêchant la traduction de débiter (82).

Elles sont associées, le plus souvent, à un âge plus élevé, une hyperleucocytose, une MRD positive (83,84).

Les études initiales suggéraient que les patients porteurs d'une délétion *IKZF1* avaient de manière significative un pronostic plus péjoratif, ce qui impliquait qu'il était un marqueur pronostique fiable (85).

Plus récemment, des études ont montré que la présence d'une délétion d'*IKZF1* ne supprime pas le pronostic associé à d'autres anomalies génétiques de risque favorable tels que *ETV6-RUNX1* et les délétions de *ERG* (80–83).

De même, plusieurs études ont rapporté que les délétions d'*IKZF1* ne sont pas pronostiques chez les patients qui répondent rapidement à leur traitement. L'effet pronostique est ainsi limité aux patients avec des niveaux de maladie résiduelle plus élevés après chimiothérapie initiale (90,91).

En outre, les délétions d'*IKZF1* sont plus fréquentes après rechute indiquant ainsi un rôle possible dans les récurrences. Les cellules correspondant au clone de rechute sont souvent présentes comme sous-populations minoritaires au moment du diagnostic ce qui suggère que les cellules responsables de la rechute sont ancestrales aux cellules leucémiques primaires. Les anomalies génomiques qui contribuent aux rechutes des LAL seraient ainsi sélectionnées pendant le traitement (72).

- **Délétion d'ERG**

Ets related gene 21q22.2

Certaines LAL-B exposent une délétion focale de *ERG*, qui code pour un facteur de transcription contenant un domaine ETS.

Plusieurs études ont maintenant identifié un sous-groupe distinct de patients atteints de LAL-B pédiatriques caractérisé par une délétion monoallélique du gène *ERG* (75,87,88).

La fréquence est de 10% à 15% des LAL-B « *others* », ce qui équivaut à 3% à 5% des LAL pédiatriques globales. Fait intéressant, ces patients présentent un excellent pronostic avec plus de 90% de survie à 5 ans en dépit d'une incidence très élevée des délétions d'*IKZF1* (environ 40 %) (87,88,92).

Même si la présence d'une délétion de *ERG* semble définir un sous-groupe distinct parmi les LAL-B « *others* », cette anomalie semble être un événement sous-clonal qui peut être perdu ou acquis entre le diagnostic et la rechute (50).

- **BCR-ABL1-like (Ph-like)**

L'entité des translocations *BCR-ABL1-like* a été identifiée en utilisant différentes approches permettant de déterminer l'expression génique globale (85,93).

Les LAL *Ph-like* sont *BCR-ABL1* négative mais ont un profil d'expression génique similaire aux LAL *BCR-ABL1*. Elles possèdent une altération des gènes codant pour des facteurs de transcription de la lignée lymphoïdes B, le plus communément *IKZF1*.

Bien que ces patients n'expriment pas le gène de fusion *BCR-ABL1*, ils partagent le même mauvais pronostic.

Ce sous-groupe, appelé *BCR-ABL1-like* ou *Ph-like* représente environ 50% des cas de LAL-B « *others* ». Des différences significatives existent dans la génétique de ces sous-groupes ; notamment en ce qui concerne la prévalence des délétions *IKZF1*, des réarrangements *CRLF2* et des mutations *JAK2* (85,93).

Les LAL *Ph-like* représentent 10 à 15% des LAL-B standard et de haut risque, avec une prévalence qui augmente avec l'âge (94).

Le séquençage transcriptomique (RNA-seq) de 15 cas de réarrangements identifiés de kinase et de gènes de récepteur de cytokines, incluant *ABL1*, *EPOR* (*Erythropoietin Receptor*), *JAK2* (*Janus kinase 2*) et *PDGFRB* (*Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta*) (95) suggère que les réarrangements activant des kinases sont la marque des LAL *Ph-like* et que ces altérations peuvent être soumises à une inhibition par des inhibiteurs de Tyrosines Kinases (ITK).

La première catégorie est la classe des réarrangements *ABL1*.

La seconde est celle des réarrangements *JAK2/EPOR*.

La troisième est celle des réarrangements *CRLF2* (Cytokine Receptor-Like Factor 2), souvent associés à des mutations de *JAK1*, ou *JAK2* (exon 16 R683G) (96).

B) Biomarqueurs de classification dans les LAL-T

Les anomalies les plus récurrentes dans ce groupe sont les translocations impliquant les loci α et δ des récepteurs des cellules T (TCR) en 14q11.2, le locus β en 7q35 et le locus γ en 7p14-15 avec une liste étendue de partenaires (29). Ces translocations entraînent la surexpression des gènes partenaires, majoritairement des facteurs de transcription ; celle de *TLX1 (HOX11)* est de bon pronostic tandis que celle de *TLX3 (HOX11L2)* est corrélée à un mauvais pronostic.

Des translocations peuvent amener à des dérégulations de *TAL1* ou *LMO2* avec un pronostic favorable (97).

Sont également retrouvées des mutations de séquence et des délétions qui impliquent des gènes régulant le développement des cellules T, des gènes suppresseurs de tumeurs tels que *NOTCH1*, *PTEN*, *RB1*, et des gènes dont la fonction est encore mal connue tels que *PHF6 (Plant homeodomain finger protein 6)* et *WT1 (Wilms Tumor 1)* (94).

Les mutations de *NOTCH1*, *FBXW7 (F-Box And WD Repeat Domain Containing 7)*, semblent être de bon pronostic, tandis que leur absence ou des mutations de *NRAS* et *KRAS*, et/ou une mutation ou une délétion de *PTEN* semblent associées à un risque de rechute plus élevé (30). Leur impact pronostique chez les enfants est en cours de démonstration.

Les délétions 5q interstitielles et terminales, qui représentent respectivement 2,5% et 9% des cas, sont des délétions génomiques récurrentes permettant d'identifier des sous-types distincts au sein des LAL-T. Les délétions interstitielles 1-5q définissent un sous groupe de LAL-T immatures et semblent de mauvais pronostic avec une expression proche des ETP-LAL. Les délétions terminales T-5q forment, quant à elles, un sous groupe génétique *HOXA* positif (98).

Early Thymic Cell Precursor (ETP)

L'entité des ETP est la seule véritablement caractérisée au sein de la classification OMS 2016 pour les LAL-T (21).

Par définition, les blastes des ETP-LAL expriment le CD7, au moins un marqueur myéloïde ou de cellule souche mais ni le CD1a ni le CD8 (99).

Elles représentent 12 à 15% des LAL-T de l'enfant (100).

Une association avec les mutations de gènes myéloïdes tels que *FLT3 (Fms Related Tyrosine Kinase 3)* (35%) (101), *NRAS/KRAS*, *DNMT3A (DNA Cytosine-5-Methyltransferase 3 Alpha)* (16%) (102), *IDH1* et *IDH2* a été rapportée avec une fréquence élevée, tandis que les mutations les plus typiquement rencontrées dans les LAL-T telles que celles concernant le gène *NOTCH1* sont peu retrouvées (21).

Alors que de petites séries initiales d'ETP-LAL suggéraient un très mauvais pronostic (99,103), une grande étude plus récente avec un traitement plus efficace a montré une petite différence pronostique mais statistiquement non significative dans les résultats (39), tandis que dans la plus grande série à ce jour, aucune signification pronostique n'a été retrouvée (104).

C) Délétions récurrentes dans les LAL

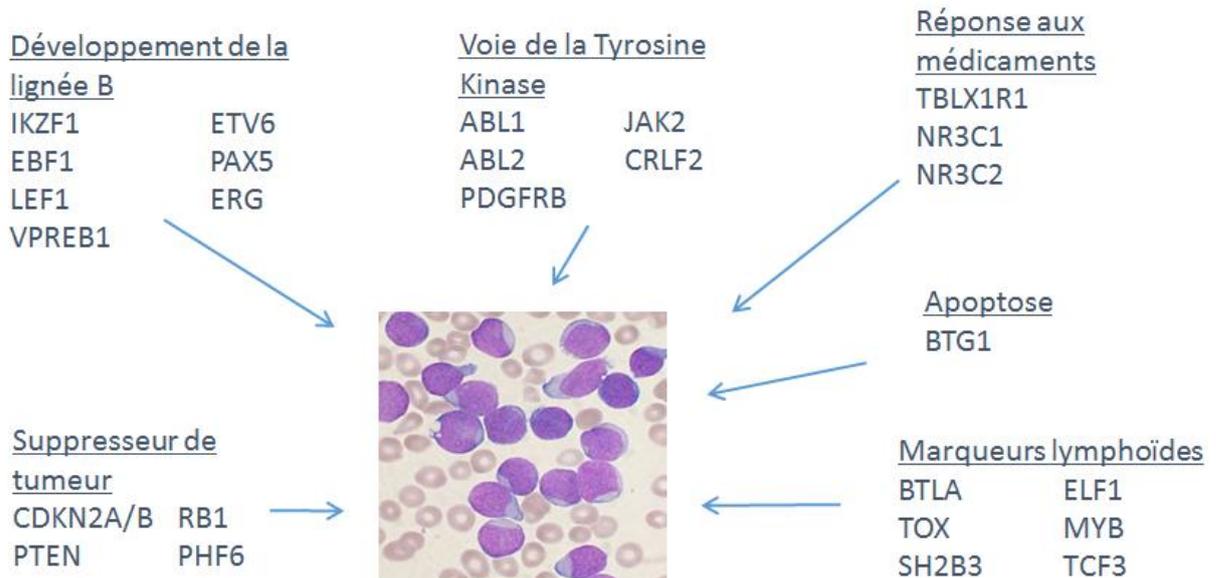


Figure 8. Gènes impliqués dans des anomalies récurrentes au sein des LAL (particulièrement LAL-B).

Les différentes études de cytogénétique moléculaire sur de larges cohortes de LAL ont ainsi permis d'identifier plus d'une cinquantaine d'altérations récurrentes, principalement des microdélétions (105,106). Elles sont généralement focales et touchent peu de gènes.

Ces altérations génétiques récurrentes ciblent généralement les gènes et les voies jouant un rôle clé dans la croissance cellulaire et la tumorigenèse, tels que les gènes régulateurs de transcription de développement lymphoïde ou les gènes suppresseurs de tumeurs (Figure 8).

Ci-dessous voici la liste des principaux gènes retrouvés au sein des LAL-B :

- *BTG1, B-Cell Translocation Gene 1* 12q21.33

BTG1 a une fonction antiproliférative avec une action régulatrice sur la croissance et la différenciation cellulaire.

Ces délétions sont retrouvées avec une fréquence de 9% (107).

Il n'existe pas de corrélation clinique rapportée.

- *BTLA, B And T Lymphocyte Associated* 3q13.2

BTLA code pour une molécule de signalisation lymphoïde.

La protéine codée contient une immunoglobuline (Ig) dont le domaine est un récepteur qui relaie des signaux inhibiteurs pour supprimer la réponse immunitaire.

La fréquence de sa délétion est proche de 5% et associée à une survie sans événement à 8 ans diminuée (70% versus 83%)

Génétiquement, les délétions *BTLA* sont fortement associées à des leucémies *ETV6-RUNX1* positif mais sont également identifiées chez les patients B « *others* » (108).

- *CDKN2A/B, Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A/B* 9p21.3

CDKN2A/B agit comme un suppresseur de tumeur car il est capable d'induire l'arrêt du cycle cellulaire.

Sa fréquence de délétion est élevée, autour de 34% des cas dans les LAL (109).

Les délétions de *CDKN2A/B* sont associées à un risque de rechute plus élevé et une survie globale plus faible (110).

- *CRLF2, Cytokine Receptor-Like Factor 2* Xp22.33

CRLF2 code pour un membre de la famille des récepteurs de cytokines de type I, récepteur de la lymphopoïétine stromale thymique (TSLP).

Les réarrangements de *CRLF2* avec surexpression apparaissent dans près de 5% des LAL-B, mais avec une fréquence plus élevée dans les B « *others* » (30%) et les patients avec un syndrome de Down (50%) (84).

La délétion interstitielle dans la région pseudoautosomale *PAR1* des chromosomes X et Y entraîne une dérégulation de *CRLF2*, *via* une juxtaposition de ce gène avec le promoteur de *P2RY8*. La surexpression de *CRLF2* peut également survenir par une translocation d'*IGH* et plus rarement par mutation activatrice (111).

Les réarrangements impliquant *CRLF2* sont associés à une activation des voies JAK, STAT (*Signal Transducers and Activators of Transcription*), ERK (*Extracellular signal-regulated kinases*) et mTor/PI3K. Ces réarrangements présentent une mutation de *JAK2* dans environ 50% des cas (112).

L'inhibition des voies JAK et PI3K représente une stratégie thérapeutique potentielle par thérapie ciblée (95).

Le pronostic de cette anomalie est discuté, certains estimant que c'est un biomarqueur de mauvais pronostic (113) tandis que d'autres estiment que cette anomalie n'est pas significative par rapport aux autres facteurs de risque (89).

- *EBF1, Early B-Cell Factor 1* 5q33.3

EBF1 code pour un facteur de transcription et possède un rôle dans l'engagement dans la lymphopoïèse B.

Sa fréquence de délétion est de l'ordre de 3%.

Les délétions d'*EBF1* sont de mauvais pronostic, avec des niveaux élevés de maladie résiduelle à J29 (Odds Ratio à 9) (85).

Elles sont présentes à fréquence plus élevée suite à une rechute indiquant leur rôle dans les récurrences de maladie (72).

- ELF1, E74 Like ETS Transcription Factor 1 13q13

ELF1 code pour un facteur de transcription exprimé dans les cellules lymphoïdes. Il est le principal activateur transcriptionnel du gène *TdT* (*Terminal-deoxynucleotidyl Transférase*, codant pour une ADN polymérase qui insère des nucléotides aux jonctions D-J, V-D ou V-J et augmente ainsi la diversité des répertoires des Ig) (114).

- ETV6, ETS Variant 6 12p13.2

ETV6 code pour un facteur de transcription habituellement impliqué dans les translocations des LAL-B et autres leucémies.

Des délétions sont également documentées, avec une fréquence de l'ordre de 13% des cas (85) sans relation retrouvée avec la survie (109).

Ces délétions sont fortement associées aux transcrits *ETV6-RUNX1*, où elles sont présentes dans 60% des cas (115).

- LEF1, Lymphoid enhancer-binding factor-1 4q25

LEF1 code pour un médiateur central de la voie de signalisation WNT (*Wingless-tyr*). Cette protéine peut se lier à un site fonctionnel important dans la cellule T.

L'expression faible de *LEF1* est associée à des taux de rémission complète (RC) et de survie globale (OS) à 5 ans diminuée à 73% contre 92% dans le cas d'une expression de *LEF1* élevée (116).

- MYB, MYB Proto-Oncogene, Transcription Factor 6q23.3

MYB un activateur transcriptionnel.

Son amplification est cause de malignité au sein des cellules T par transformation accélérée et prolifération cellulaire (117).

- NR3C1, Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 1 5q31.3

NR3C1 code pour un récepteur aux glucocorticoïdes. Il agit à la fois comme facteur de transcription qui se lie à des éléments de réponse aux glucocorticoïdes, et comme régulateur des autres facteurs de transcription.

Sa fréquence de délétion est de 2% (107).

Elle est plus fréquente à la rechute, particulièrement dans les t(12 ;21).

- NR3C2, Nuclear Receptor Subfamily 3 Group C Member 2 4q31.23

NR3C2 code pour un récepteur aux minéralocorticoïdes.

Les fonctions de la protéine en tant que facteur de transcription dépendent du ligand qui se lie aux éléments de réponse aux minéralocorticoïdes afin de transactiver les gènes cibles.

- PAX5, Paired Box domain 5 9p13.2

PAX5 est un déterminant important de l'engagement vers la lignée B par activation des gènes spécifiques de la lignée B et répression des gènes d'autres programmes de différenciation. La délétion de *PAX5* conduit au développement de cellules B peu différenciées.

Sa fréquence de délétion est de 31%.

Sa délétion isolée semble être de bon pronostic (118) mais elle est fréquemment associée à d'autres anomalies (85).

- PDGFRB, Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta 5q32

PDGFRB code pour un récepteur aux tyrosines kinases à la surface cellulaire qui peut être impliqué dans les transcrits des LAL *Ph-like* (119).

- PHF6, Plant homeodomain finger protein 6 Xq26.2

PHF6 possède un rôle potentiel dans la régulation transcriptionnelle.

C'est un gène suppresseur de tumeur spécifique de lignée qui s'oppose au développement des cellules hématopoïétiques malignes (120).

- PTEN, Phosphatase And Tensin Homolog 10q23.31

PTEN est un gène suppresseur de tumeur, muté dans un grand nombre de cancers à haute fréquence.

Les délétions de *PTEN* sont rares dans les LAL-B mais sont présentes dans 5% des cas de LAL-T (30).

Elles sont significativement associées à un échec thérapeutique précoce (121).

- RB1, Retinoblastoma 1 13q14.2

RB1 est un gène suppresseur de tumeur et régulateur négatif du cycle cellulaire

Il est délété dans 9% des cas de LAL-B.

Sa délétion isolée est de mauvais pronostic (109).

- *SH2B3, SH2B Adaptor Protein 3* 12q24.12

SH2B3 est un régulateur négatif de la signalisation des cytokines et joue un rôle essentiel dans l'hématopoïèse.

Une délétion de *SH2B3* associée à une surexpression du récepteur à l'IL7 distingue un sous-ensemble de risque élevé au sein des LAL-B. Cette anomalie est associée à une anomalie d'*IKZF1* (122).

Par ailleurs, les mutations de *SH2B3* semblent plus fréquentes au sein des LAL *Ph-like* (76).

- *TBL1XR1, Transducin (Beta)-Like 1 X-Linked Receptor 1* 3q26.31

TBL1XR1 code pour une F-box, protéine responsable de la régulation de l'hormone nucléaire répresseur 1.

La fréquence de la délétion de *TBL1XR1* est de 3% dans les LAL-B (123), augmentée lors des rechutes à 11% des cas. Le plus fréquemment ces délétions de *TBL1XR1* sont observées en cas de t(12;21) (15% des cas) (124).

Cette délétion aboutit à une diminution du recrutement du N-CoR (*nuclear receptor corepressor*) et de la sensibilité des gènes des glucocorticoïdes, ce qui résulte finalement à une diminution de la signalisation des glucocorticoïdes provoquée par l'augmentation des niveaux de l'hormone nucléaire répresseur 1 et de l'histone déacétylase 3 (HDAC 3).

La réduction de la signalisation des glucocorticoïdes dans les lignées *TBL1XR1* appauvries donne lieu à une résistance à des agonistes des glucocorticoïdes, mais pas à d'autres agents chimiothérapeutiques.

Un traitement par SAHA (*Suberoylanilide Hydroxamic Acid*), inhibiteur d'HDAC, restaure la sensibilité à la prednisolone dans les cellules déplétées *TBL1XR1* (125).

- *TCF3, Transcription Factor 3* 19p13.3

Le gène *TCF3* code pour une protéine E jouant un rôle crucial dans la lymphopoïèse. Cette protéine est requise pour le développement des lymphocytes B et T.

Sa délétion est le plus fréquemment retrouvée dans le cadre des t(1;19)(q23;p13)/*TCF3-PBX1* ou des exceptionnelles t(17;19)/*TCF3-HLF*.

- *TOX, Thymocyte Selection Associated High Mobility Group Box* 8q12.1

TOX régule le développement des lymphocytes T (126).

Ce gène est délété plus fréquemment suite à une rechute (70,107).

- *VPREB1, Pre-B Lymphocyte 1* 22q11.22

VPREB1 est un gène impliqué dans le développement de la cellule B au stade précoce. Ce gène code pour une chaîne polypeptidique associée à la chaîne Ig μ pour former un complexe moléculaire exprimé sur la surface des cellules pré-B. Les délétions de *VPREB1* sont retrouvées dans environ 26% des LAL-B et sont associées à un groupe de haut risque *BCR-ABL1* (40%) (127) et *BCR-ABL1*-like (34%) (93,128), mais aussi au sous groupe *ETV6-RUNX1* (43–68%).

IV) Objectifs

Les techniques conventionnelles de cytogénétique et de biologie moléculaire ne retrouvent aucune anomalie chez près de 25% des patients atteints de leucémies aiguës lymphoblastiques. La caractérisation du caryotype par division cellulaire est délicate, tandis que les techniques de recherche de transcrits par RT-PCR ou de délétions focales d'*IKZF1* par MLPA sont des techniques ciblées.

Une classification optimale des patients permet de délivrer un traitement de plus en plus personnalisé afin de diminuer complications, rechutes et décès.

Nous étudierons donc l'apport de l'analyse SNP-array dans la prise en charge de ces patients :

- d'une part en comparant les résultats obtenus par cette approche en regard des résultats retrouvés par les analyses conventionnelles,
- d'autre part en analysant les informations supplémentaires identifiées grâce à cette technique pangénomique de puce à ADN.

Par ailleurs, nous étudierons la corrélation des anomalies observées avec différents paramètres pronostiques, biologiques et cliniques.

V) Matériel et Méthodes

A) Patients

L'étude présentée porte sur 151 patients (124 LAL-B et 27 LAL-T) dont le diagnostic de LAL a été établi entre janvier 2014 et décembre 2015.

L'âge des patients au diagnostic est compris entre 1 et 28 ans et l'âge médian est de 6 ans. Le ratio garçon/fille est de 1,29.

Ces patients étaient suivis à l'Hôpital Jeanne de Flandre du CHRU de Lille (n=69/151), aux Hospices Civils de Lyon au CHU de Lyon (n=45/151) et à l'Hôpital de la Timone de l'Assistance Publique des Hôpitaux de Marseille (n=37/151) (Figure 9).

Le travail réalisé s'est effectué à partir d'échantillons de moelle osseuse et de sang, recueillis sur tube EDTA et analysés par le laboratoire au moment du diagnostic.

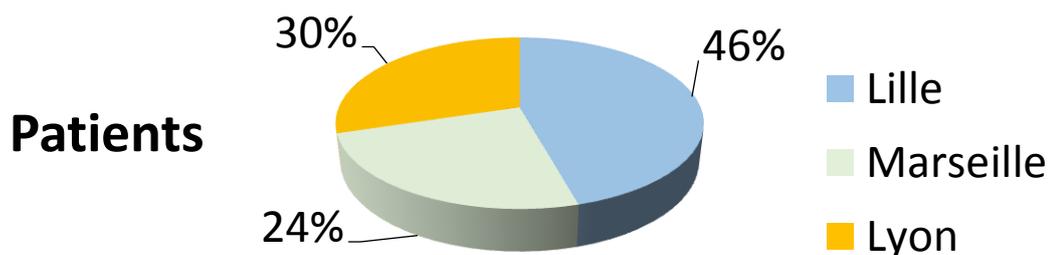


Figure 9. Répartition géographique des patients de l'étude.

B) Isolements cellulaires

Afin de préparer les culots cellulaires en vue d'en extraire l'ADN, les leucocytes sont isolés grâce à un milieu de séparation Ficoll[®], polyfluorocarbène liquide dont la densité $d=1,077$ est supérieure à celle du plasma ($d=1,006$). L'échantillon déposé au dessus du Ficoll[®] est centrifugé 5 minutes à 600G. L'anneau de leucocytes et le surnageant sont transvasés dans un tube Falcon[®] de 50 mL dans lequel un tampon de lyse est ensuite ajouté en quantité suffisante pour 40 mL. Après une incubation de 10 minutes à température ambiante, la suspension est centrifugée à 1 200G à 4°C pendant 10 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot repris dans une solution de lavage. Après une nouvelle centrifugation de 10 minutes à 4°C à 1 200G, le surnageant est de nouveau éliminé et le culot est remis en suspension dans 10mL de solution de lavage. Après passage au vortex, un aliquot de 200µL est prélevé pour la numération automatisée des leucocytes par le Pentra[®] Horiba. La suspension est centrifugée 10 minutes à 4°C à 1 200G puis le surnageant est éliminé. La quantité de solution de lavage nécessaire est ajoutée à la préparation des culots de

manière à obtenir 5 millions de cellules par tube. On obtient ainsi une suspension de volume connu contenant un nombre déterminé de cellules. Cette suspension est aliquotée dans des tubes Eppendorf® de 2 mL. Enfin, les tubes Eppendorf® sont centrifugés 4 minutes à 4°C à 4 800G. Le surnageant est de nouveau rejeté alors que les culots secs sont conservés à -80°C.

C) Extraction de l'ADN

L'extraction a été réalisée sur colonne QIAGEN® (*QIAmp® DNA mini*). Cette méthode permet de purifier rapidement l'ADN sans le détériorer et d'obtenir des fragments d'ADN d'une taille allant jusqu'à 50 kb (essentiellement des fragments de 20-30 kb). La solution d'ADN obtenue est ensuite utilisable pour les techniques de PCR.

Cette extraction est constituée de plusieurs étapes successives :

- La lyse des cellules : Les échantillons sont lysés dans des conditions dénaturantes, à 56°C pendant 30 minutes. Chaque culot sec est d'abord repris dans 180 µl de tampon ATL. La lyse est ensuite réalisée en présence de 20 µl de Protéinase K et de 200 µl de tampon de lyse (AL).
- La précipitation de l'ADN : Un volume de 200 µl d'éthanol absolu à froid sont ajoutés afin d'optimiser la fixation de l'ADN à la membrane de la colonne. La suspension obtenue est alors placée dans une colonne et centrifugée à température ambiante 1 minute à 6000G. L'ADN est adsorbé sur la membrane de silice alors que le lysat passe à travers la membrane sous l'effet de la force centrifuge.
- Le lavage de l'ADN : Le filtrat est jeté et la colonne est lavée une première fois par 500 µl de tampon AW1 et centrifugée à température ambiante 1 minute à 6000G, puis une deuxième fois par 500 µl de tampon AW2 et centrifugée à température ambiante 3 minutes à 20000G.
- L'élution : Enfin, la colonne est placée dans un tube Eppendorf® et éluée en deux fois avec du tampon AE préalablement chauffé à 70°C puis centrifugée à température ambiante 1 minute à 6000G. Cette dernière étape d'élution permet d'obtenir 200 µl d'une solution d'ADN.

D) Dosage de l'ADN

La concentration en ADN de la solution est dosée par spectrophotométrie au Nanodrop® ou au DropSense® à une longueur d'onde $\lambda = 260$ nm.

Après homogénéisation au vortex et centrifugation, 2 µL d'échantillon par puits dans le Dropsense® sont introduits puis dosés.

La quantité d'ADN des échantillons doit ensuite être normalisée à 50 ng/µL.

La solution ainsi obtenue est conservée à -20°C jusqu'à utilisation pour la technique Cytoscan® HD.

E) Cytoscan® HD Affymetrix

1) Principe du SNP-array et caractéristique de la puce Cytoscan® HD

Le Cytoscan® HD est une méthode de *SNP-array* développée par Affymetrix®. Elle consiste en une analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA), également appelée « caryotype moléculaire », permettant ainsi d'étudier le génome dans sa globalité.

Son niveau de résolution, de l'ordre de quelques kb, est bien supérieur à celui du caryotype conventionnel qui est d'environ 5 à 10 Mb, pour la détection d'anomalies déséquilibrées.

Dans le cas des blastes de LAL pour lesquels il est parfois difficile d'obtenir des mitoses *in vitro*, cette technique se révèle être une aide précieuse dans l'interprétation afin de confirmer les gains et les pertes que le caryotype a parfois du mal à affirmer.

La puce Cytoscan® HD contient plus de 2,6 millions de marqueurs pour l'analyse du nombre de copies incluant 1 900 000 anomalies du nombre de copies (CNA) et 750 000 polymorphismes d'un seul nucléotide (SNP) ; ce qui recouvre donc la totalité du génotype avec plus de 99% de précision.

Le principe repose sur les homologies de séquence d'ADN permettant l'identification d'un déséquilibre, perte ou gain, d'une ou plusieurs régions génomiques.

À la différence de la *CGH-array* (Hybridation génomique comparative), basée sur l'hybridation génomique comparative entre deux prélèvements, le *SNP-array* permet l'analyse de polymorphismes des nucléotides à partir d'un unique prélèvement. De plus cette dernière technique permet également la détection de disomies uniparentales. Cette technologie ne permet cependant pas d'identifier les anomalies équilibrées (translocations ou inversions) ni les mutations ponctuelles.

Les techniques de *SNP-array* révolutionnent le domaine de la cytogénétique, et ouvrent la voie de la cytogénétique moléculaire grâce à une détection rapide et fiable des aberrations chromosomiques.

Cette technique présente de très bonnes spécificité, sensibilité et résolution, en dépassant les directives communautaires de cytogénétique (129).

2) Technique Affymetrix®

Après isolement, extraction et dosage, les échantillons d'ADN sont ensuite amplifiés avec le kit Affymetrix® selon les recommandations du fabricant.

Les composants du kit sont détaillés dans le tableau ci-après (Tableau 5) :

Tableau 5. Composants du kit Affymetrix®.

Component	Qty	Part Number	Label Information
Affymetrix® GeneChip® Restriction and Ligation Reagents	1	901803	
▪ Nsp I	1	901718	40 µL
▪ 10X Nsp I Buffer	1	901719	80 µL
▪ 100X BSA	1	901720	25 µL
▪ Low EDTA TE Buffer	1	901697	24 mL
▪ 10X T4 DNA Ligase Buffer	1	901722	140 µL
▪ T4 DNA Ligase	1	901723	110 µL
▪ Water, Nuclease-Free	1	901781	10 mL
Affymetrix® GeneChip® Ligation Adaptors and Fragmentation Reagents	1	901749	
▪ <i>Pouch 1: Store in the Pre-PCR Room</i>	1		
▪ Genomic DNA	1	900421	30 µL (50 ng/µL) ¹
▪ 50 µM Adaptor, Nsp I	1	900697	95 µL
▪ PCR Primer, 002	1	901016	1 mL
▪ <i>Pouch 2: Store in the Post-PCR Room</i>	1		
▪ GeneChip® Fragmentation Reagent	1	901010	45 µL
▪ 10X Fragmentation Buffer	4	900422	165 µL ¹
▪ TdT	1	901154	200 µL
▪ 5X TdT Buffer	1	900696	800 µL
▪ 30 mM DNA Labeling Reagent	1	900699	235 µL ¹
▪ Oligo Control Reagent 0100	1	900541	92 µL
Affymetrix® GeneChip® Hybridization Reagents	1	901804	
▪ Hyb Buffer Part 1	1	901725	7.6 mL
▪ Hyb Buffer Part 2	1	901726	691 µL
▪ Hyb Buffer Part 3	1	901727	323 µL
▪ Hyb Buffer Part 4	1	901728	46 µL
Affymetrix® GeneChip® Stain Reagents	1	901805	
▪ Stain Buffer 1	1	901751	20 mL
▪ Stain Buffer 2	1	901752	20 mL
▪ Affymetrix® GeneChip® Array Holding Buffer	1	901733	75 mL
▪ Purification Beads	1	901807	22.2 mL
Affymetrix® GeneChip® Purification Reagents	1	901826	
▪ Elution Buffer	1	901738	2 mL
▪ Water, Nuclease-Free	1	901781	10 mL
▪ Purification Wash Buffer	1	901372	N/A ²
Affymetrix® GeneChip® Wash A	2	901680	1 L
Affymetrix® GeneChip® Wash B	2	901681	1 L

Afin d'effectuer les analyses, de l'éthanol absolu et le CloneTech Titanium® Taq PCR kit sont également nécessaires.

Lors de chaque série, 2 plaques de 12 échantillons soit 24 échantillons au maximum peuvent être techniques.

L'obtention des résultats, à partir de 250 ng d'ADN (5 µL à 50 ng/µL), nécessite 4 jours de manipulation (Figure 10, Figure 11).

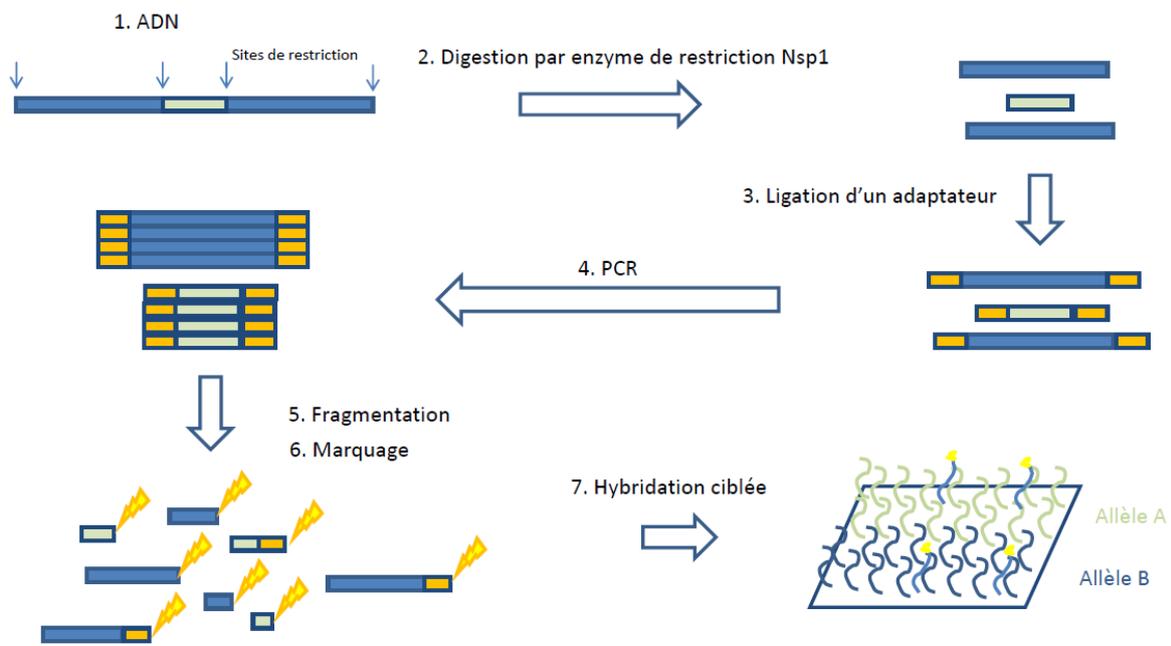


Figure 10. Étapes de la technique Cytoscan® HD Affymetrix.

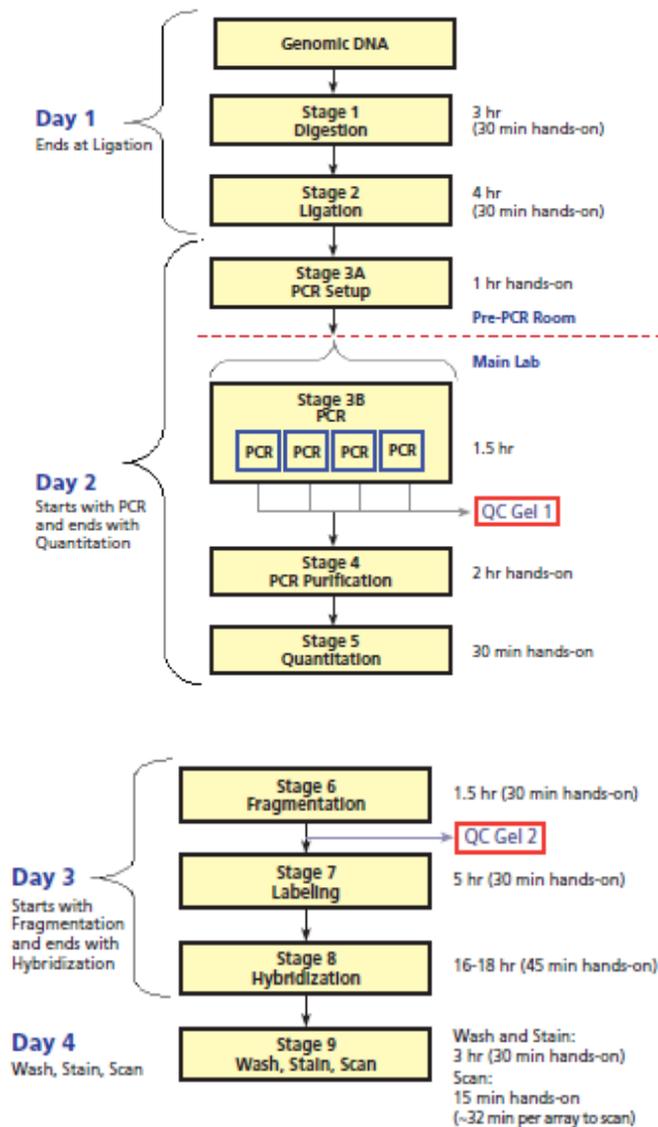


Figure 11. Workflow du Cytoscan[®] HD.

a) Jour 1

- Digestion par l'enzyme Nspl

Préparation du *mix* contenant 10 U (Unités) d'enzyme de restriction de type Nspl par puits.

Digestion de l'ADN des patients durant 2h30 avec le programme « CytoScan Digest » :

programme CytoScan Digest	
37°C	120 min
65°C	20 min
4°C	2 min
4°C	hold

- **Ligation**

Préparation du *mix* contenant 800U de DNA ligase et 750nL d'adaptateur Nspl 50µM pour chaque puits.

Ligation durant 3h30 avec le programme « CytoScan Ligate » :

programme CytoScan Ligate	
16°C	180 min
70°C	20 min
4°C	2 min
4°C	hold

- **PCR**

Les produits de ligation issus d'un échantillon de patients sont dilués puis déposés dans 4 puits, ce qui permet d'obtenir 4 réactions d'amplification par patient et ainsi augmenter la quantité d'ADN pour les étapes ultérieures.

Un seul couple d'amorces permet d'amplifier l'ensemble des fragments grâce à la séquence Nspl flanquée aux extrémités de chaque fragment.

La réaction d'amplification, d'une durée d'une heure, est contrôlée par 2 µL de *Titanium Taq DNA Polymerase 50X* avec le programme « Cytoscan PCR » :

programme	Cytoscan PCR	
94°C	3 min	
94°C	30 sec	30X
60°C	45 sec	
68°C	15 sec	
68°C	7 min	
4°C	2 min	
4°C	hold	

b) Jour 2

- **Pool des produits de PCR**

Les produits issus d'un même échantillon de patient et contenus au sein des 4 puits sont regroupés.

- **Électrophorèse des produits amplifiés**

La migration sur E-gel d'agarose 2% pendant 30 minutes permet de s'assurer des bonnes réactions d'amplification et de ligation (Figure 12).

Les produits doivent avoir une taille comprise entre 150 et 2000 pb.

Si on obtient des bandes continues (appelées smear), la ligation et l'amplification se sont effectuées correctement.

Si on obtient un barreau d'échelle, la ligation et/ou l'amplification n'ont pas fonctionné.

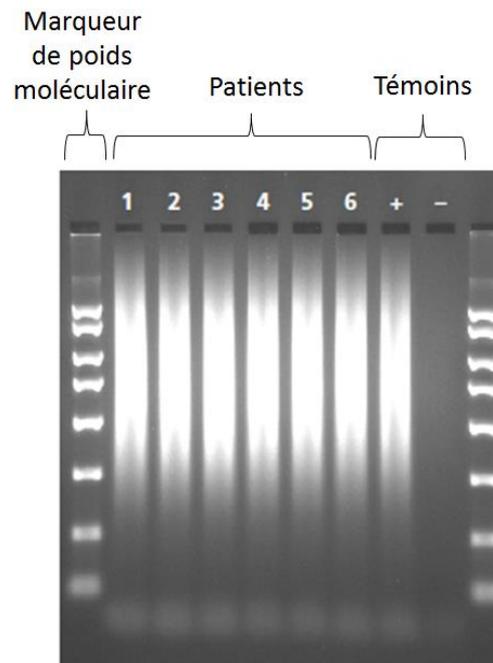


Figure 12. Électrophorèse permettant d'évaluer l'amplification et la ligation.

- **Purification des produits de PCR**

Ajout des billes dans chaque puit.

Des étapes de centrifugation, d'élution sur rack magnétique, de wash buffer permettent un lavage des amplicons d'ADN.

- **Dosage des produits de PCR**

Après dilution au $1/10^{\text{ème}}$ (1 μ l d'ADN amplifié dans chaque puits pour le dosage + 9 μ l Affymetrix® Nuclease-Free water), les concentrations en ADN sont dosées afin de déterminer si elles sont suffisantes pour pouvoir effectuer l'analyse.

Pour une analyse optimale, la concentration en ADN doit être supérieure à 3000ng/ μ l.

L'analyse ne pourra pas être effectuée correctement si la concentration en ADN est inférieure à 2500ng/ μ l.

c) Jour 3

- **Fragmentation**

La fragmentation s'effectue à chaud pendant 1h avec 0,5U de DNASE I et 4,30 µL de *Chilled Affymetrix® Nuclease-Free Water* avec le programme « Cytoscan-Frag » :

programme Cytoscan-Frag	
37°C	35 min
95°C	15 min
4°C	2 min
4°C	hold

- **Électrophorèse des produits fragmentés**

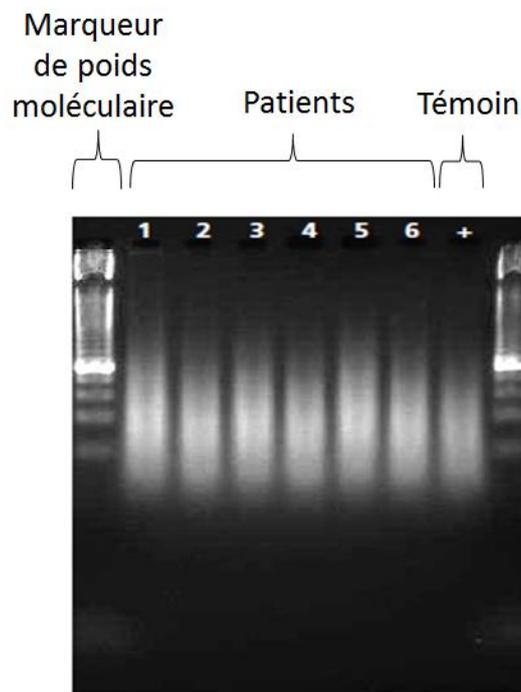


Figure 13. Électrophorèse permettant d'évaluer la fragmentation.

La fragmentation est vérifiée sur E-gel 4% après 15 minutes de migration (Figure 13).

Les produits de fragmentation doivent avoir une taille comprise entre 25 et 125 pb.

- **Marquage immunofluorescent**

L'ADN fragmenté est marqué par la biotine grâce à 105U de *terminal-déoxynucléotidyl transférase* (TdT).

Le marquage s'effectue à chaud pendant 4h30 avec le programme « Cytoscan-Lab » :

programme Cytoscan-Lab	
37°C	4h
95°C	15 min
4°C	2 min
4°C	hold

Principe du marquage (Figure 14) : la biotine est incorporée à des nucléotides contenus dans la sonde. La streptavidine marquée à la FITC se lie avec une grande avidité et une grande affinité à la biotine.

Une solution d'anticorps anti-streptavidine marqués à la biotine permet d'obtenir une réaction de liaison en chaîne conduisant à l'obtention un signal fluorescent important.

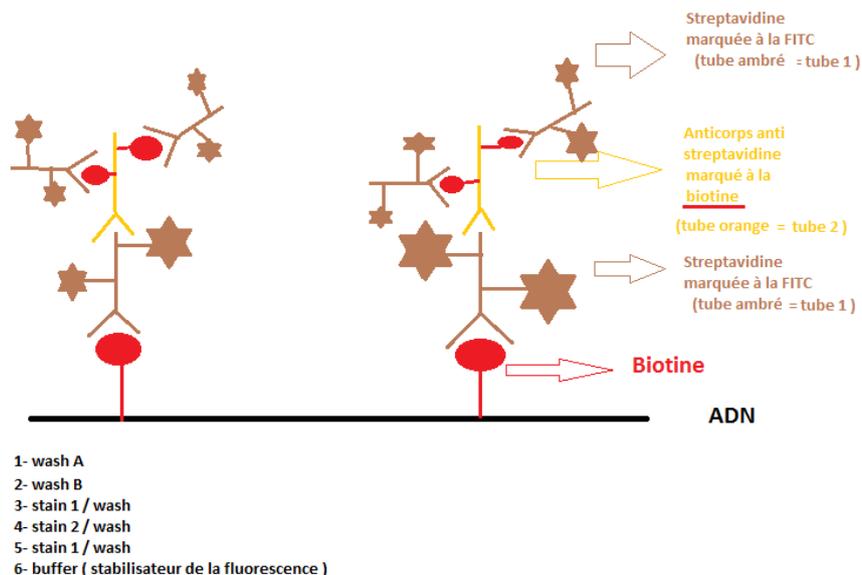


Figure 14. Schéma de la réaction de marquage.

- **Hybridation**

L'hybridation est basée sur le principe de complémentarité des acides nucléiques. Les puces sont hybridées dans un premier temps au sein des puits dans le thermocycleur pendant 12 minutes.

CytoScan Hyb	
95°C	10 min
49°C	2 min
49°C	hold



Figure 15. Puce à ADN Cytoscan® HD Affymetrix.

Après introduction des échantillons dans les biopuces (Figure 15), celles-ci sont placées au sein du GeneChip® Hybridization Four 645 (Figure 16). La réaction se déroule alors à 50°C durant 16 à 20 heures.



Figure 16. GeneChip Hybridization®.

d) Jour 4

- Rinçage

Les biopuces sont rincées dans l'appareil GeneChip® Fluidic Station 450 (Figure 17).



Figure 17. GeneChip® Fluidic Station 450.

- **Scannage**

Les puces sont scannées dans l'automate (Figure 18).



Figure 18. Automate de scannage des biopuces.

Le signal détecté est fonction de la fluorescence.

- **Création du fichier**

Après le scannage (30 minutes): on obtient pour chaque échantillon un fichier image « *.data* » de 820 Mb/ Patient.

A la sortie du scanner, un alignement automatique de la grille et une compression au format « *.cel* » permettent l'obtention d'un fichier de 67 Mb.

Enfin on récupère un fichier pour l'analyse dans ChAS (Chromosome Analysis Suite) (20 minutes) « *.cyhp* » de 122 Mb.

3) Paramètres de qualité

Le logiciel permet de visualiser 3 données concernant la qualité de l'analyse (130) :

- la MAPD (*Median Absolute Pairwise Difference*) mesure la différence des ratio logarithmiques de chaque paire de sondes adjacentes et la rapporte à la valeur médiane.

Elle est donc insensible aux occasionnelles variations de signal. En revanche, son augmentation est en faveur d'une mauvaise qualité de l'ADN utilisé, de problèmes d'hybridation ou de lecture de la biopuce.

Sa valeur cible est inférieure à 0.25.

- le Waviness SD (*Standard Deviation*) est une mesure globale de la fluctuation du signal. Contrairement au MAPD, il varie donc beaucoup en fonction des anomalies génétiques ponctuelles du prélèvement exploré. C'est donc un mauvais indicateur pour l'étude des cancers.

Sa valeur cible est inférieure à 0,12.

- Le SNPQC (*Single Nucleotid Polymorphism Quality Control*) mesure le degré de séparation des différents génotypes AA, AB ou BB. L'observation d'absence d'hétérozygotie est optimale lorsque sa valeur est élevée.

C'est un paramètre qui est sensible à la qualité de l'ADN, aux étapes d'hybridation et de lecture de la biopuce, mais également aux anomalies de grande taille de type hyperdiploidie par exemple et à la présence d'anomalies sous-clonales.

Désormais, avec une nouvelle version de logiciel, il est possible de modifier sa représentation afin de mieux visualiser les anomalies en cas de clone hyperdiploïde.

Sa valeur cible est supérieure à 15.

En pratique, la qualité est jugée satisfaisante si la valeur du SNPQC est supérieure à 15 et celle du MAPD est inférieure ou égale à 0,25.

F) Logiciel ChAS Chromosome Analysis Suite

Pour cette étude, le logiciel d'analyse d'une suite de chromosomes (ChAS) version 2.1 a été utilisé.

On obtient une analyse cytogénétique permettant de visualiser et résumer les aberrations chromosomiques retrouvées sur l'ensemble du génome.

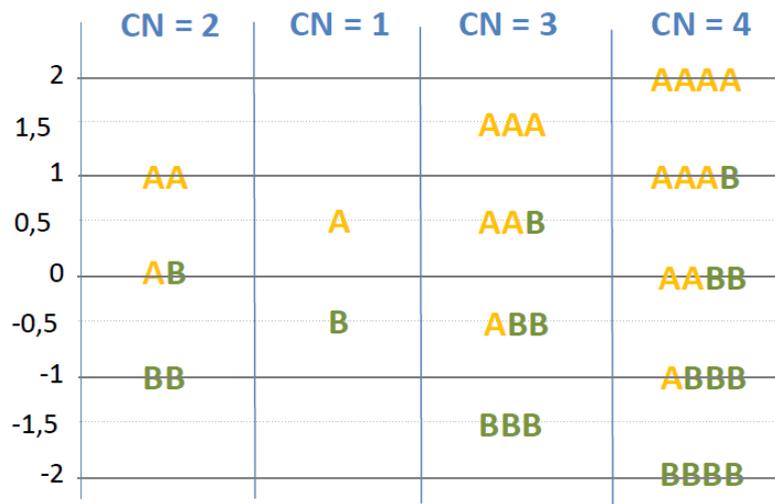
Le logiciel compare directement les anomalies ou variants observés à des bases de données externes publiques telles que la base DGV (*Database of Genomic Variants*) répertoriant des variants observés dans une population *a priori* non malade (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>).

Les données concernant les tailles des anomalies, leurs coordonnées ainsi que les gènes inclus dans ces anomalies ont été déterminées par l'*University of California Santa Cruz* (UCSC) *Genome Browser* hg19 et reprises par le logiciel ChAS.

Les aberrations étaient identifiées par une inspection visuelle du nombre de copies, du *log ratio* et de l'expression allélique.

Des aberrations chromosomiques peuvent inclure :

- une perte ou un gain du nombre de copies.
- des disomies uniparentales, correspondant à des situations dans lesquelles les deux chromosomes d'une même paire chromosomique sont hérités du même parent (par opposition à la situation habituelle où dans chaque paire, un chromosome est reçu du père et l'autre de la mère). Par conséquent, seuls les gènes transmis par ce parent peuvent s'exprimer. Ces régions sont des zones d'instabilité chromosomique.
- un mosaïcisme peut être détecté, correspondant à un état dans lequel deux ou plusieurs populations de cellules avec des génotypes différents coexistent chez l'individu.



$$A = + 0.5$$

$$B = - 0.5$$

Figure 19. Interprétation des CNA et SNP.

L'interprétation par *SNP-array* comporte deux étapes principales (Figure 19) :

- D'une part, l'évaluation du nombre de copies s'effectue grâce au copy number (CN) :

- En situation normale, 2 allèles sont présents pour chaque gène donc CN = 2.
- En situation pathologique, les CN vont varier (CNV que l'on appellera CNA en considérant qu'ils sont pathologiques):
 - o Si le nombre de copie est égal à 1, il s'agit d'une délétion hémizygotique c'est-à-dire ne touchant qu'un allèle.
 - o Si le nombre de copies est égal ou supérieur à 3, il s'agit d'un gain.

- D'autre part, l'« expression allélique » reflète la distribution des allèles présentée par une suite de gènes. Elle est calculée comme étant la différence entre l'allèle A et l'allèle B pour chaque SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*). Nous avons attribué la valeur de 0,5 pour le premier type d'allèle noté A, et -0,5 pour le second type d'allèle noté B. Pour un génome normal avec 2 allèles, les valeurs attendues pour chaque gène sont donc :

- AA = 1, en cas d'homozygotie A
- AB = 0, en cas d'hétérozygotie AB
- BB = -1, en cas d'homozygotie B

1) Interprétation des anomalies du nombre de copies (CNA)

Les microdélétions sont un mécanisme privilégié d'altérations géniques dans les LAL (131–133). Elles résultent majoritairement de recombinaisons illégitimes, conséquence d'erreurs du mécanisme normal de recombinaison V(D)J des gènes des immunoglobulines et du TCR (69).

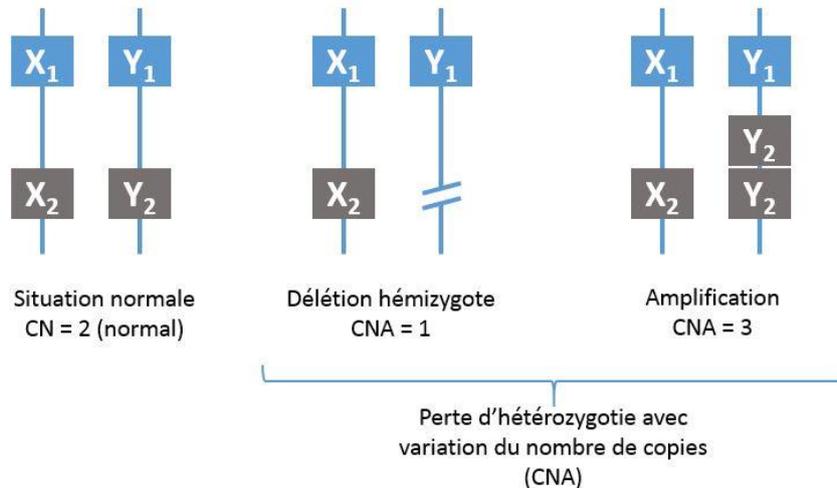


Figure 20. Représentation schématique des différents types de pertes d'hétérozygotie par anomalies du nombre de copies (CNA). Pour chaque position sont représentés l'allèle d'origine maternelle (X) et l'allèle d'origine paternelle (Y). L'anomalie décrite concerne la 2^{ème} position (noire).

Les CNA ont été retenues lorsqu'elles contiennent au moins 20 marqueurs et mesurent au moins 20 kb (107).

a) *Situation normale*

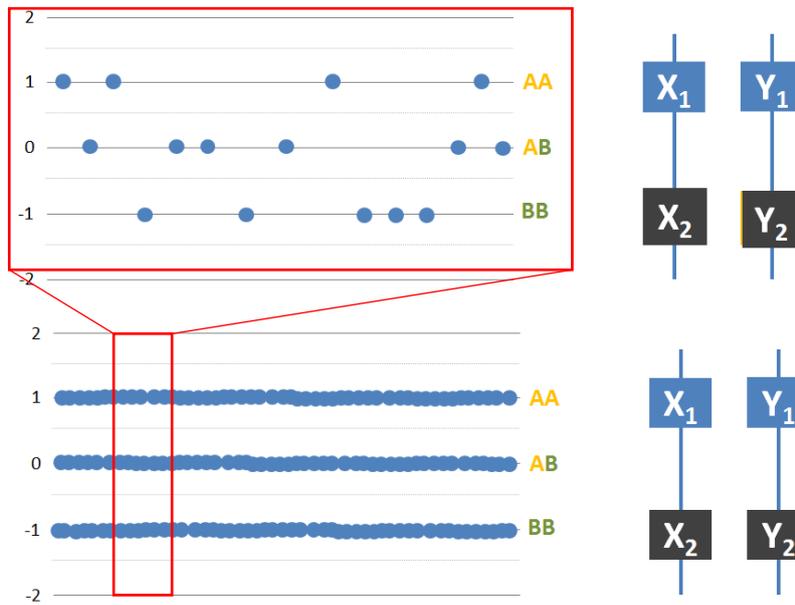


Figure 21. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une situation normale sans anomalie du nombre de copies ni perte d'hétérozygotie.

L'expression allélique est normale sans déséquilibre (Figure 21).

Le nombre de copies est stable et normal à 2 sur cette zone (CN = 2) (Figure 22).

La composante logarithmique du CN (qui permet d'évaluer rapidement une dérive) est de fait également bien linéaire.

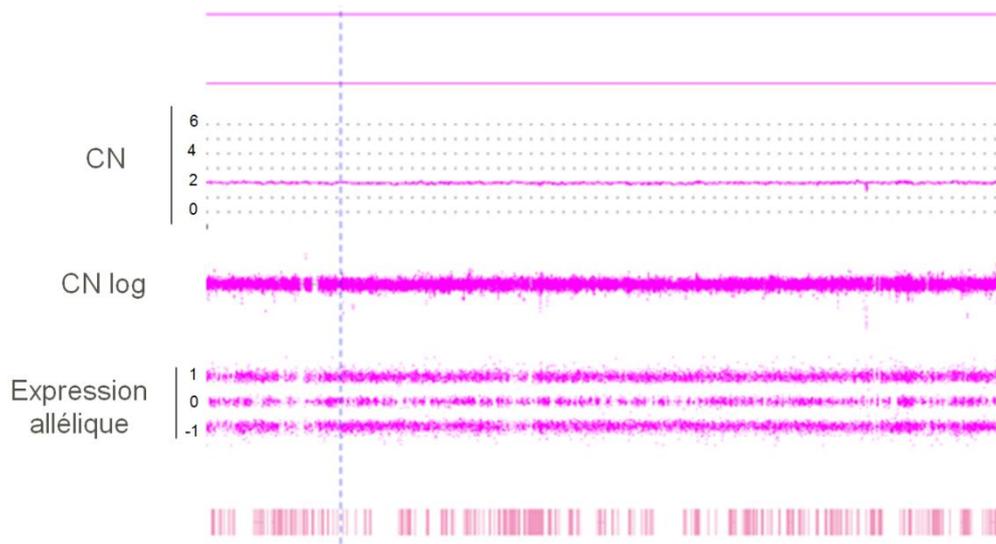


Figure 22. Représentation par le logiciel ChAS d'une zone sans anomalie du nombre de copies ni perte d'hétérozygotie.

b) Déletion

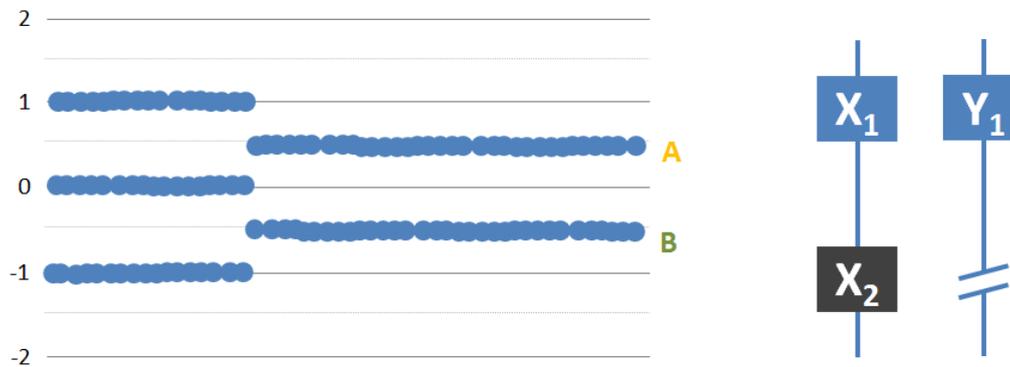


Figure 23. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une déletion hémizygote.

L'expression allélique est déséquilibrée car un seul allèle A ou B s'exprime (Figure 23).

Le nombre de copies est diminué à 1 sur cette zone (CNA = 1) (Figure 24).

La composante logarithmique du CN est de fait inférieure à la ligne de base.

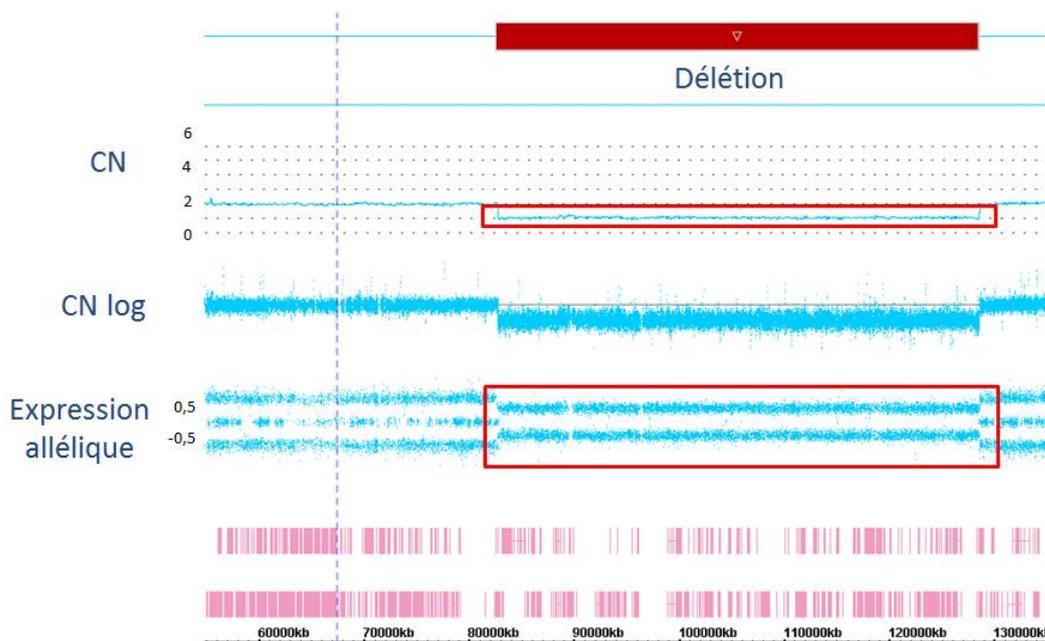


Figure 24. Représentation par le logiciel ChAS d'une déletion hémizygote.

c) **Gain**

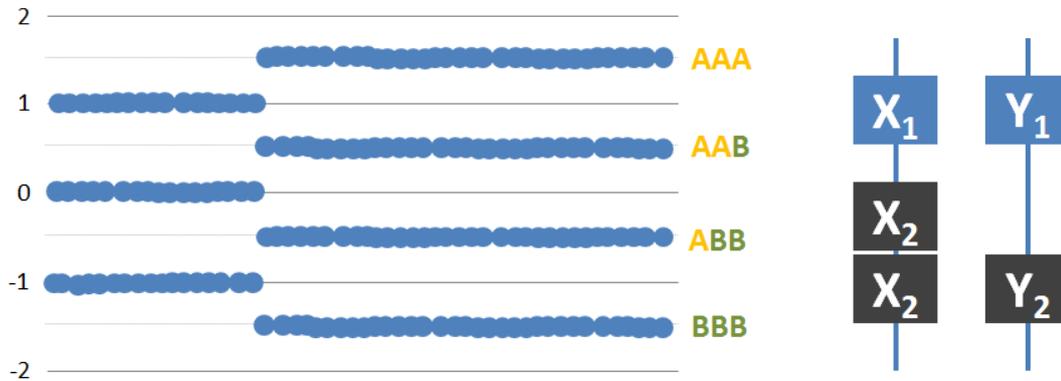


Figure 25. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'un gain d'une copie.

L'expression allélique est déséquilibrée, en effet 3 allèles s'expriment (Figure 25). Le nombre de copies est augmenté au nombre de 3 sur cette zone (CNA = 3) (Figure 26).

La composante logarithmique du CN est de fait supérieure à la ligne de base.

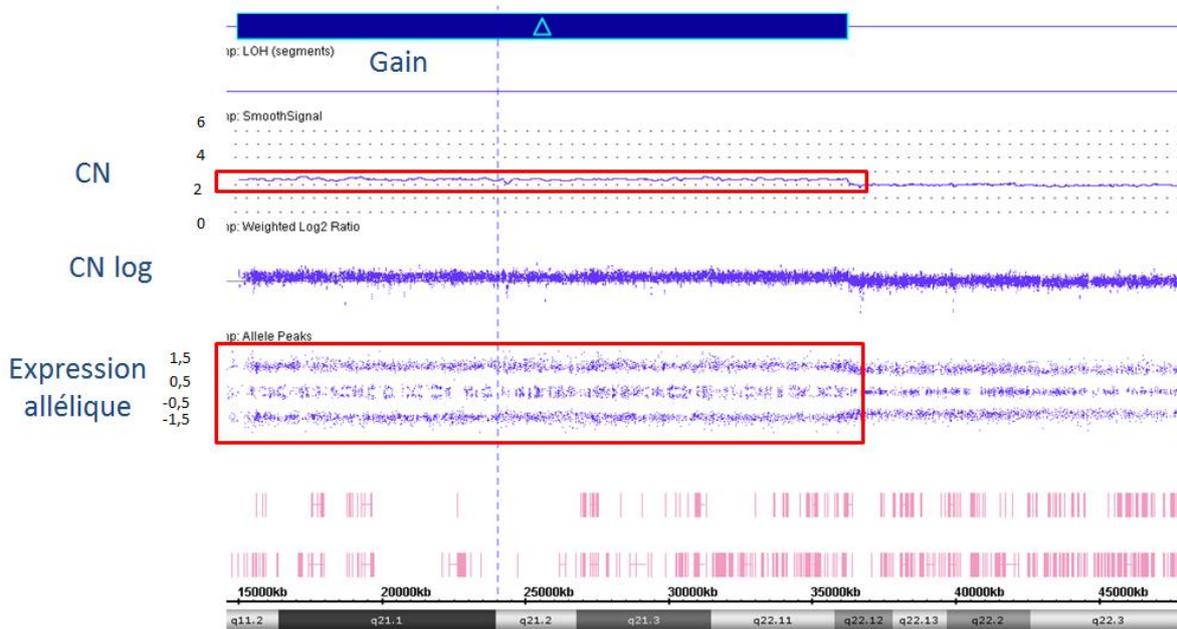


Figure 26. Représentation par le logiciel ChAS d'un gain d'une copie (ici en mosaïque).

2) Interprétation des disomies uniparentales (UPDs)

L'intérêt des puces *SNP-array* par rapport aux puces de *CGH-array* repose sur leur capacité à détecter les pertes d'hétérozygotie sans variation du nombre de copies ou UPDs (Disomies uniparentales).

Les SNPs correspondent à une variation d'un seul nucléotide sans aucune incidence sur le phénotype. Leur intérêt repose sur la possibilité de pouvoir ainsi différencier les deux allèles d'une même région du génome, l'un étant d'origine maternelle, l'autre d'origine paternelle.

Les UPDs correspondent bien souvent à des zones d'instabilité génétique.

L'identification d'une UPD dans une tumeur indique très souvent la duplication d'un gène compris dans cette région et touché par une mutation.

Leur détection est intéressante pour cibler les gènes à séquencer. Par exemple, les UPDs 13q12 ou 11q23 accompagnant des mutations de *FLT3* ou *CBL* (*Cbl Proto-Oncogene*) sont bien connues dans les LAM (134,135).

La fréquence des UPDs identifiées dans les LAL est très variable selon les études et les mutations bialléliques n'ont été que très rarement rapportées (136).

Notre expérience montre que les UPDs sont relativement rares. Toutefois, en l'absence d'analyse de l'ADN germlinal en parallèle, l'interprétation des UPDs et notamment la détermination de leur caractère acquis reste difficile.

En pratique, nous avons donc retenu les UPDs de taille supérieure 10 Mb et les UPDs télomériques (jamais retrouvées chez des individus sains en absence de consanguinité) (137).

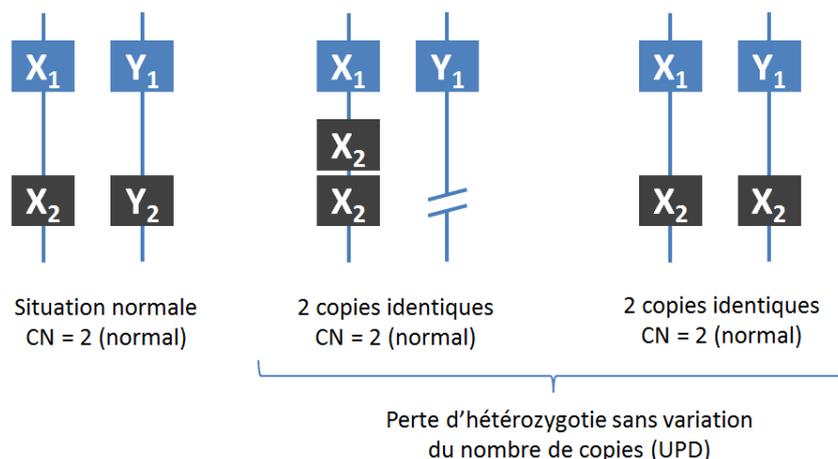


Figure 27. Représentation schématique des différents types de pertes d'hétérozygotie sans variation du nombre de copies (UPD). Pour chaque position sont représentés l'allèle d'origine maternelle (X) et l'allèle d'origine paternelle (Y). L'anomalie décrite concerne l'allèle en 2^{ème} position (noire).

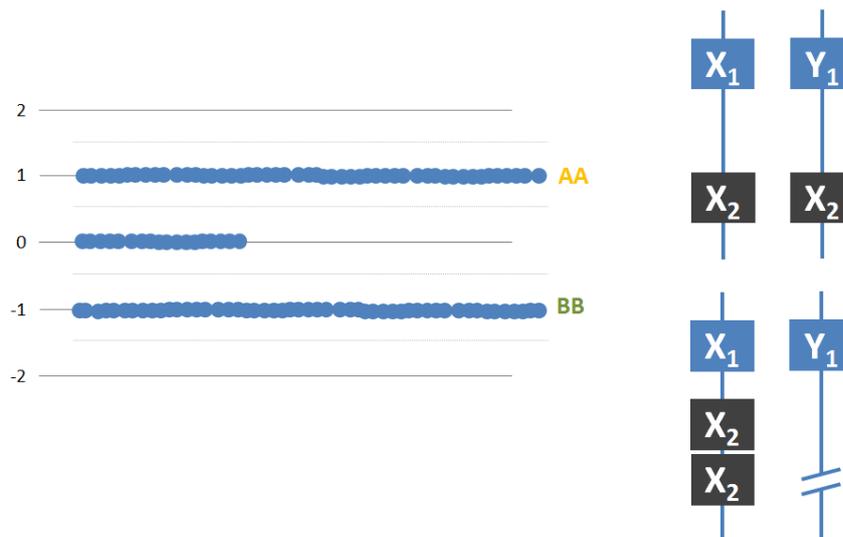


Figure 28. Représentation schématique de l'expression allélique lors d'une perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copies.

L'expression allélique est déséquilibrée car ce sont les 2 mêmes allèles qui s'expriment (Figure 28).

Le nombre de copies est stable et normal à 2 sur cette zone (CN = 2) (Figure 29).

La composante logarithmique du CN est de fait également bien linéaire.



Figure 29. Représentation par le logiciel ChAS d'une perte d'hétérozygotie sans anomalie du nombre de copies.

VI) Résultats

A) Anomalies du nombre de copies détectées

L'analyse par *SNP-array* a permis la mise en évidence d'un nombre important d'anomalies du nombre de copies (CNA) des gènes : 563 délétions et 587 gains soit un total de 1150 CNA.

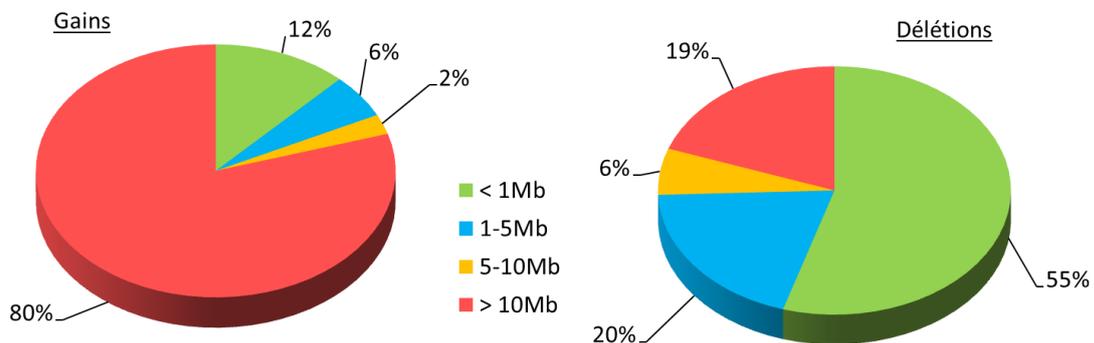


Figure 30. Répartition des anomalies du nombre de copies détectées par *SNP-array* en fonction de la taille.

Les tailles des anomalies observées étaient hétérogènes de 21 kb à 247 Mb. Les gains retrouvés étaient majoritairement de grande taille car ils concernaient principalement des patients hyperdiploïdes avec des gains entiers de chromosomes. De nombreuses anomalies cryptiques, de taille inférieure à la résolution du caryotype (5 Mb), ont été retrouvées parmi les délétions, les microdélétions étant en effet un mécanisme privilégié d'altération génique dans les LAL (Figure 30).

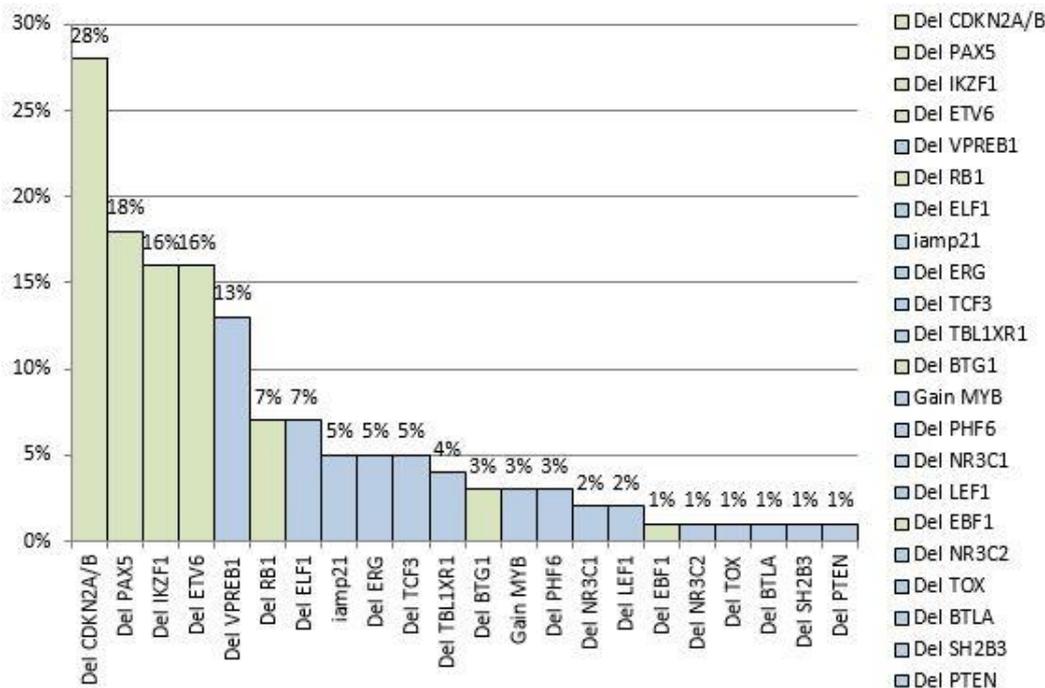


Figure 31. Fréquence des altérations d'intérêts les plus fréquemment retrouvées en fonction des gènes chez l'ensemble des patients de l'étude. En vert les délétions identifiées également par MLPA, en bleu les altérations uniquement retrouvées par SNP-array.

Parmi les délétions d'intérêt récurrentes (Figure 31) les délétions de *CDKN2A/B* sont les plus fréquentes avec 28% des cas (41/151), suivies des délétions de *PAX5* identifiées dans 18% des cas (26/151), puis de *ETV6* et *IKZF1* retrouvées dans 16% des cas (24 et 23/151 respectivement).

Les délétions *VPREB1*, présentes dans 13% des cas (19/151), sont les plus fréquentes parmi celles qui ne sont pas recherchées par MLPA.

Les amplifications intrachromosomiques du chromosome 21 (8/151) et les délétions de *ERG* (7/151), non recherchées par MLPA, sont retrouvées dans 5% des cas.

Des délétions localisées des gènes *CREBBP* (16p13) 7/151, *HIST1H1E* (6p22.2) 4/151 ainsi que des gènes *LRRC8C* (1p22.2), *ERBB4* (2q34), *PLEKHG1* (6q25.1), *THSD7A* (7p21.3) et *CYP2C18* (q23.33) dans 2/151 cas, ont également été retrouvées mais leur intérêt dans la leucémogénèse des LAL reste à démontrer.

Par ailleurs, des délétions récurrentes du bras long du chromosome 5 ont pu être détectées dans 3/27 cas, soit 11% des patients avec une LAL-T. Ils possédaient tous les trois une délétion terminale 5q35.1-5q35.3 non vues en cytogénétique.

B) Disomies uniparentales détectées

L'étude a permis de mettre en évidence que 33% des patients (50/151) présentaient des disomies uniparentales (UPDs) selon les critères retenus, à savoir les UPDs de taille supérieure à 10 Mb et/ou les UPDs télomériques. Certains patients en présentant plusieurs, le nombre total d'UPDs détectées est de 131. Les UPDs

retrouvées étaient localisées pour la plupart sur le chromosome 9 et concernaient notamment les gènes *PAX5* (9p13) 14/151, *CDKN2A* (9p21) 13/151, et *CDKN2B* (9p21) 14/151.

C) Caryogrammes

A partir des données de CNA récupérées suite aux analyses SNP-array, nous avons pu réaliser une analyse fine des délétions impliquées au sein des LAL.

Les 22 chromosomes autosomiques ainsi que les 2 chromosomes sexuels sont représentés grâce au logiciel *IdeogramBrowser*.

Chaque trait vertical correspond à une anomalie chez 1 patient.



1) Caryogramme regroupant tous les patients de l'étude

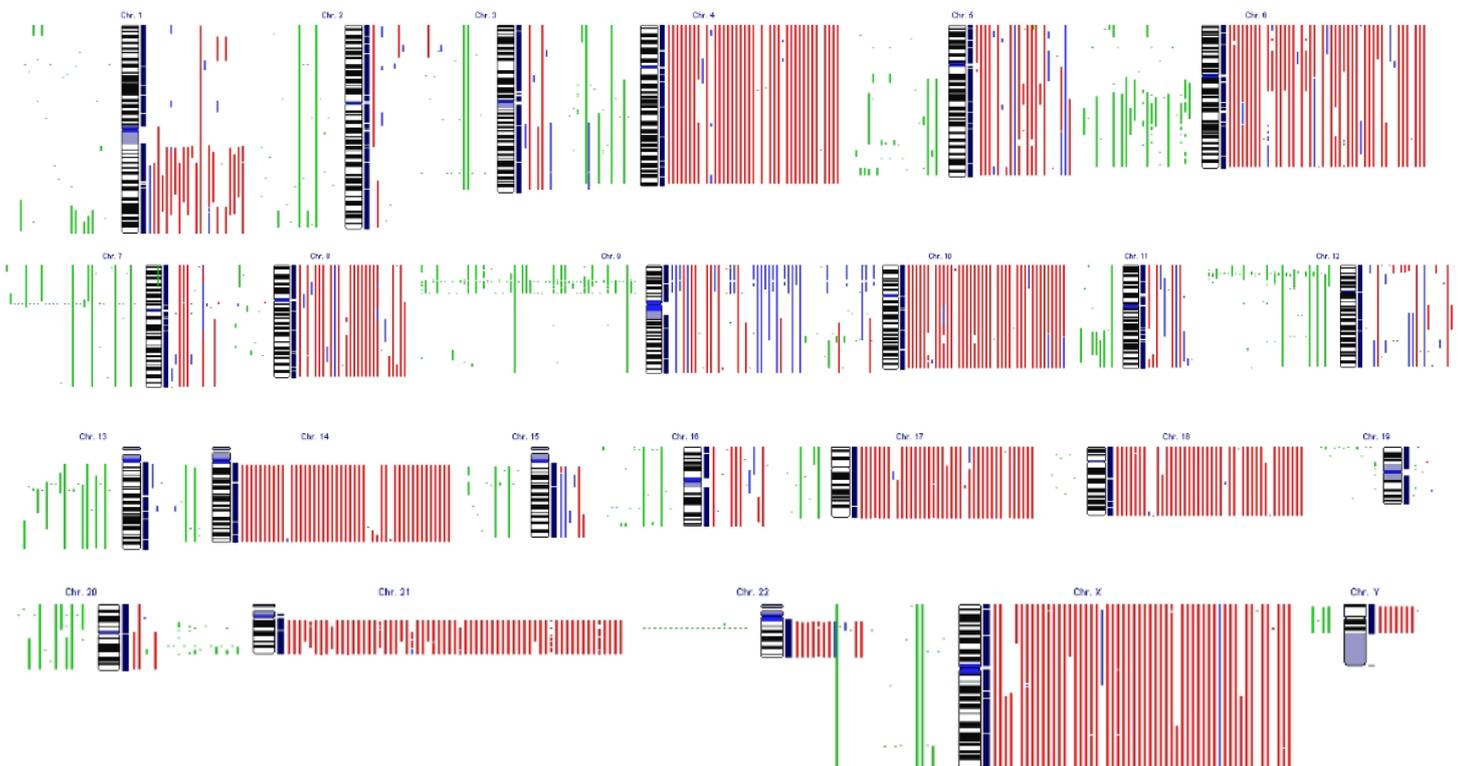


Figure 32. Caryogramme de tous les patients de l'étude.

L'analyse est difficile car trop d'informations se chevauchent pour les 151 patients.

2) Caryogramme des patients hyperdiploïdes

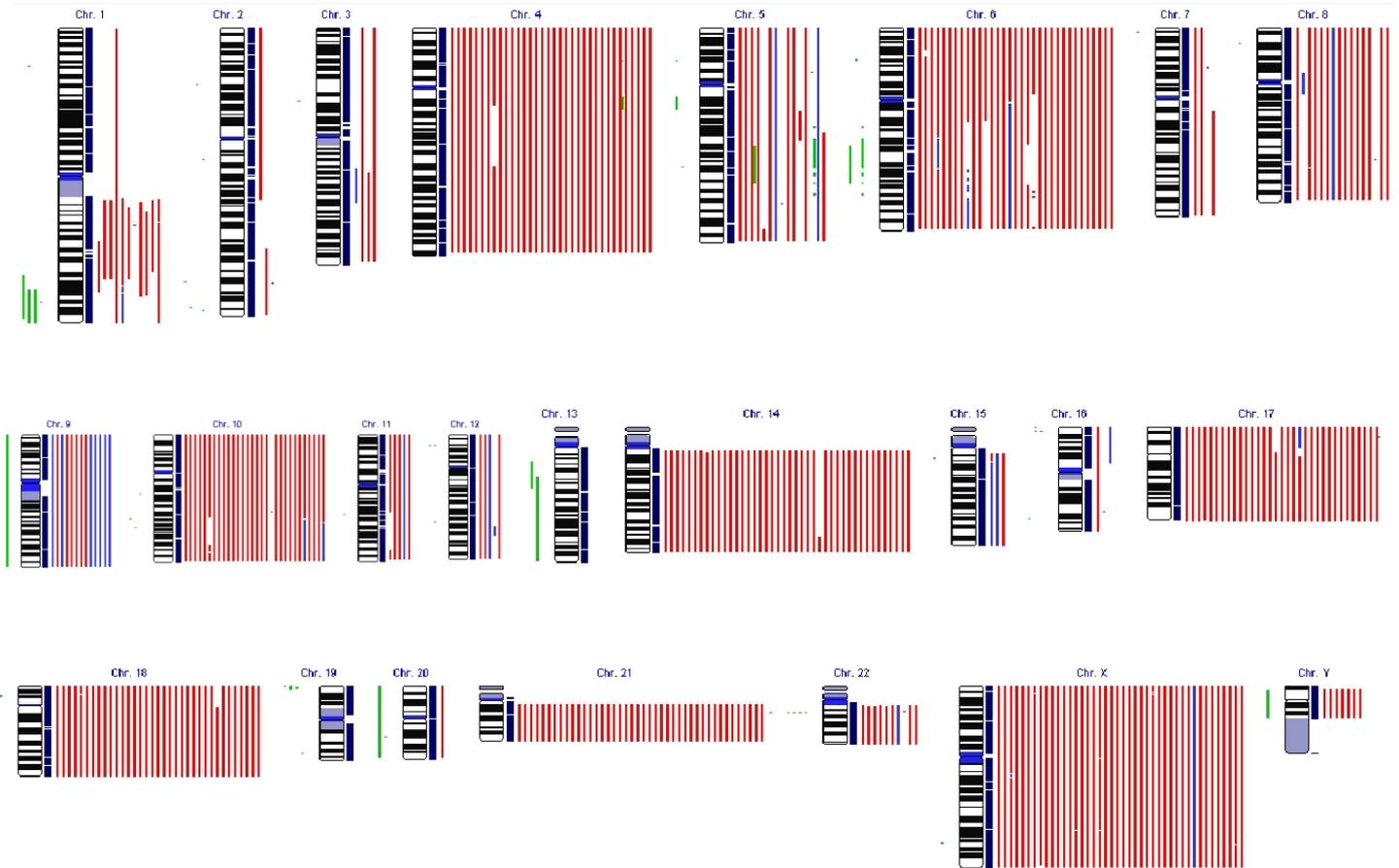


Figure 33. Caryogramme des patients hyperdiploïdes.

Nous observons que pour les 43 patients hyperdiploïdes les gains des chromosomes entiers sont bien objectivés mais cette population ne présente pas/peu d'anomalies cryptiques (Figure 33).

Ce sont les mêmes chromosomes qui sont le plus souvent dupliqués chez ces patients hyperdiploïdes : 4, 6, ± 8, 10, 14, 17, 18, 21, X.

3) Caryogramme des patients non hyperdiploïdes

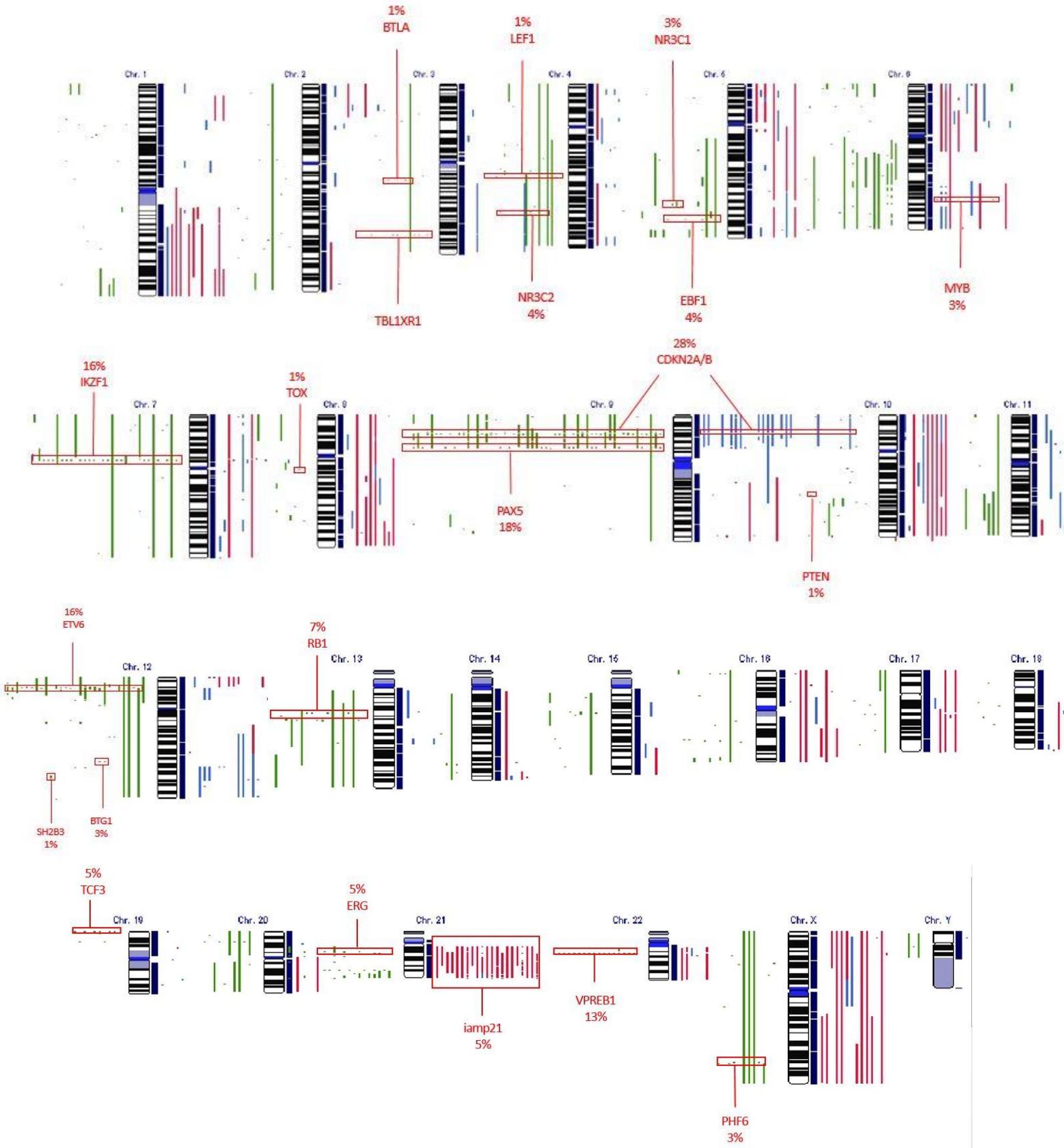


Figure 34. Caryogramme représentant les altérations du nombre de copies des gènes des patients non hyperdiploïdes.

Sans les patients hyperdiploïdes, le caryogramme apparaît plus clair : il permet la visualisation des anomalies récurrentes (Figure 34).

D) Comparaisons

1) Avec le caryotype conventionnel

Tableau 6. Comparaison des résultats du caryotype conventionnel et du Cytoscan® HD.

	<u>Caryotype</u>	<u>Cytoscan</u>
Analyses	150	151
Succès	118	145
Médiocres	10	4
Echecs	22	2

Pour le caryotype conventionnel :

- **Succès** : Le caryotype a pu être rendu de manière fiable avec au moins 20 métaphases normales ou au moins 2 métaphases anormales.
- **Médiocres** : La pousse s'est avérée compliquée. Les anomalies sont difficiles à voir, certaines peuvent ne pas avoir été observées.
- **Echecs** : Moins de 20 métaphases normales ou moins de 2 métaphases anormales ont pu être observées.

Pour le Cytoscan :

- **Succès** : SNPQC > 15 et MAPD < 0,25, bonne visualisation des anomalies.
- **Médiocres** : SNPQC < 15 ou MAPD > 0.25 : quatre examens (non hyperdiploïdes, MAPD < 0.25) présentaient un SNPQC compris entre 10 et 15, pour lesquelles la sensibilité de détection des anomalies est donc moindre.
- **Echecs** : Impossibilité d'interprétation des caryotypes car trop d'instabilité et d'approximation dans la représentation sur le logiciel ChAS (SNPQC très bas MAPD élevé), ou anomalies non vues par SNP-array visualisées par le caryotype conventionnel.

2) Avec la biologie moléculaire

Tableau 7. Comparaison des résultats de MLPA et du Cytoscan® HD.

	<u>MLPA / Cytoscan</u>
Concordance	97% (113/117)
Discordance	3% (4/117)

La MLPA est l'amplification *multiplex* de sondes dépendant d'une ligation. Elle correspond à une PCR avec plusieurs cibles. Deux sondes peuvent s'associer pour former une sonde complète, cependant cette association ne s'effectue qu'en présence de la séquence cible d'ADN complète et correcte. La quantité de sonde complète, et par conséquent la quantité du produit de PCR finale, permet de déterminer s'il y a dans l'échantillon d'ADN à tester une délétion ou une duplication.

De même, le Cytoscan® HD par approche *SNP-array* permet, entre autres, de détecter des gains ou des délétions.

Le Cytoscan® HD a permis de trouver dans 113/117 cas soit 97% des cas (Tableau 7) les mêmes exons délétés que ceux retrouvés en MLPA. De plus, de nombreuses autres anomalies ont pu être retrouvées car l'approche *SNP-array* est pangénomique.

La MLPA, utilisée au diagnostic de LAL-B au CHRU de Lille, présente l'avantage d'être plus précise pour les exons délétés (en particulier pour la délétion d'*IKAROS*) ou gagnés. De plus, la MLPA est plus sensible ce qui peut contribuer à expliquer les 4 cas discordants (Tableau 8).

Tableau 8. Cas des délétions retrouvées en MLPA et pas en Cytoscan® HD.

Patient	Résultats MLPA			Blastose médullaire	Interprétation
	Gènes délétés	Exons	Signal		
34	<i>ETV6</i>	2	0,53	97%	Délétion trop courte (un seul exon)
56	<i>IKZF1</i>	3	0,73	90%	Anomalies sous clonales
		5	0,68		
		6	0,78		
	<i>RB1</i>	24	0,76		
		26	0,54		
	<i>EBF1</i>	16	0,77		
81	<i>RB1</i>	24	0,78	80%	Anomalie sous clonale
		26	0,74		
106	<i>IKZF1</i>	4	0,76	85%	Anomalie sous clonale
		6	0,75		
		7	0,78		

E) Classification des patients

1) Classification avant Cytoscan® HD

Avant l'utilisation du Cytoscan® HD par technique *SNP-array*, 10% des patients de l'étude étaient en échec de classification car il n'avait pu être mis en évidence ni transcrite ni réarrangement, et le caryotype était en échec.

Par ailleurs, on dénombrait 20% de LAL-B « *others* » (Figure 35).

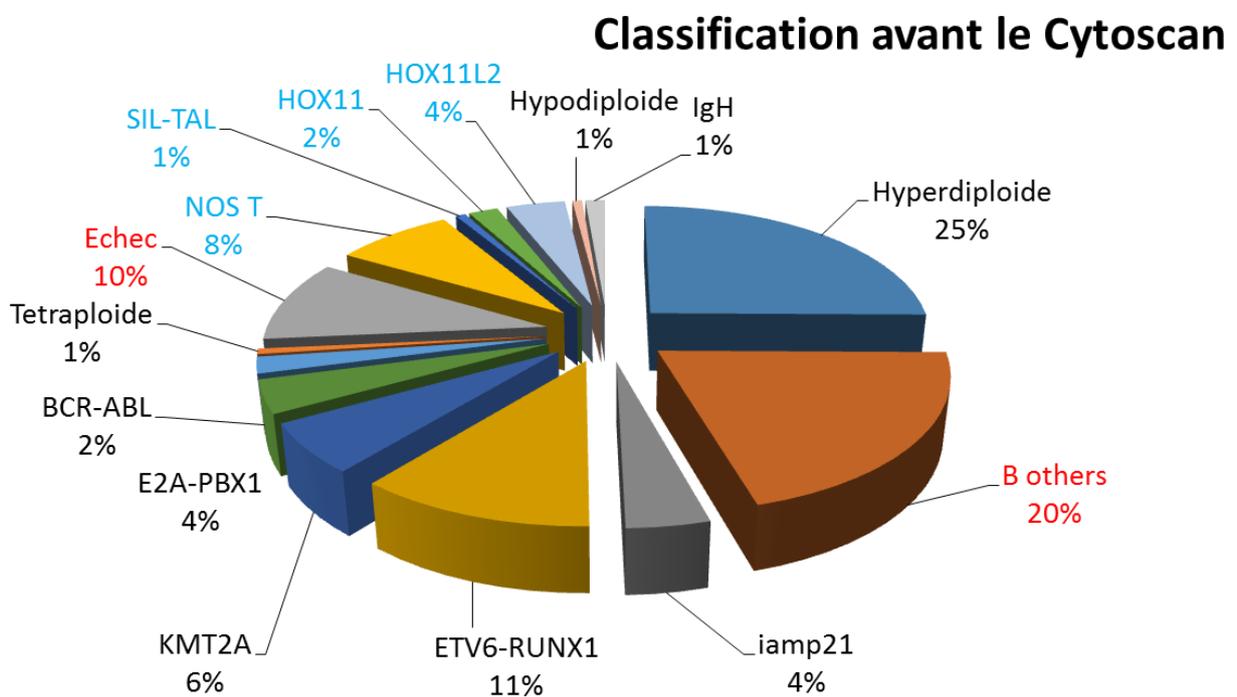


Figure 35. Classification des patients de l'étude avant l'utilisation du Cytoscan® HD (en rouge les échecs de classification et les B « *others* », en bleu les LAL-T).

2) Apport du Cytoscan® HD dans la classification

Le Cytoscan® HD a permis de reclasser 29 patients (29/151 soit 19%) : 15 patients en échec de classification (Tableau 9) et 14 patients auparavant classés parmi les B « others » pour lesquels les altérations n'avaient pas pu être vues par les techniques conventionnelles (Tableau 10).

Tableau 9. Classification par Cytoscan® HD des patients auparavant en échec.

Patients	Avant Cytoscan	Après Cytoscan
5	<i>ECHEC</i>	Hyperdiploïde
10	<i>ECHEC</i>	T others
17	<i>ECHEC</i>	T others
30	<i>ECHEC</i>	Ph like
33	<i>ECHEC</i>	T others
37	<i>ECHEC</i>	DelERG
43	<i>ECHEC</i>	Hyperdiploïde
46	<i>ECHEC</i>	T others
74	<i>ECHEC</i>	B others
77	<i>ECHEC</i>	B others
93	<i>ECHEC</i>	B others
97	<i>ECHEC</i>	B others
118	<i>ECHEC</i>	Hyperdiploïde
135	<i>ECHEC</i>	B others
150	<i>ECHEC</i>	B others

Tableau 10. Nouvelles anomalies détectées par Cytoscan® HD (en bleu la qualité du caryotype était médicale).

Patients	Avant Cytoscan	Après Cytoscan
12	<i>B others</i>	DelERG
29	B others	Ph like
42	B others	DelERG
47	<i>B others</i>	Ph like
49	T others	SIL-TAL
67	B others	DelERG
71	<i>B others</i>	iamp21
73	B others	Hyperdiploïde
75	B others	DelERG
85	B others	Ph like
96	B others	DelERG
129	B others	iamp21
137	B others	Hypodiploïde
139	B others	Ph like

Les iAMP21, les délétions de *ERG* et les transcrits *Ph-like* sont 3 grandes catégories oncogénétiques de LAL récemment admises qui peuvent être détectées par *SNP-array*. Auparavant ces patients étaient fréquemment classés au sein des LAL-B « *others* ».

Cette catégorisation présente un intérêt pronostique et de stratification thérapeutique.

a) Amplification intrachromosomique du chromosome 21

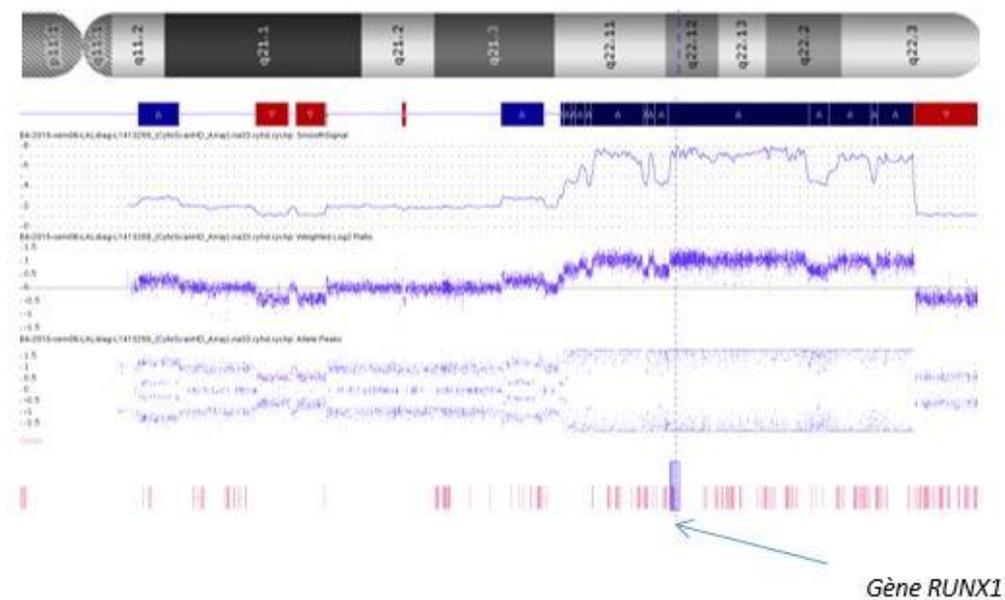


Figure 36. Gain de matériel génétique incluant *RUNX1* et délétion télomérique du chromosome 21 observés par *SNP-array* objectivant une amplification intrachromosomique du chromosome 21.

L'amplification sur le chromosome 21 inclut le gène *RUNX1* avec au moins 5 copies de ce gène (138) (Figure 36).

La délétion télomérique sur le bras long permet de confirmer le diagnostic.

Sa recherche est possible en FISH mais parfois difficile et non systématiquement réalisée dans certains centres.

Dans notre cohorte, cette anomalie a été retrouvée chez 8 patients dont 2 uniquement grâce au Cytoscan[®] HD.

b) Délétion *ERG*

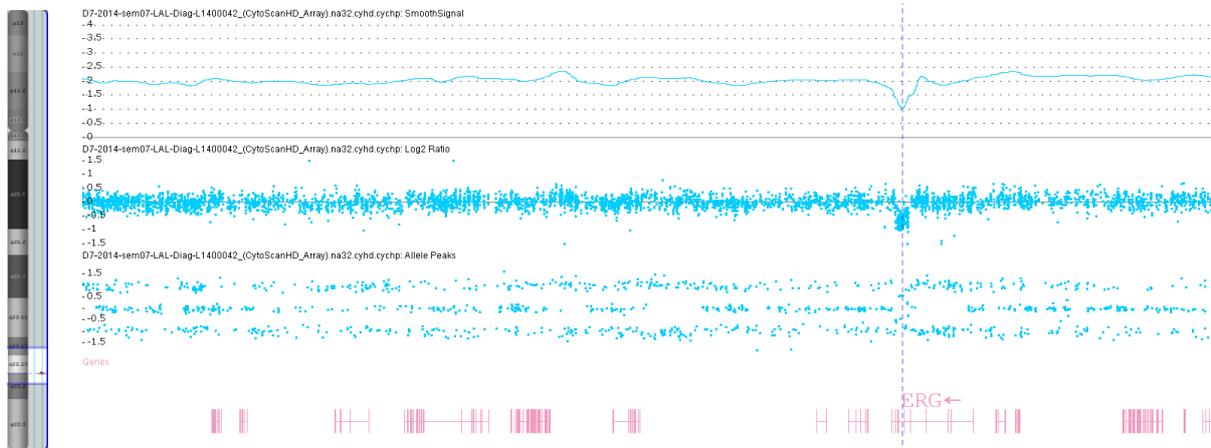


Figure 37. Perte de matériel génétique observée par *SNP-array* correspondant à une délétion localisée de *ERG* sur le chromosome 21.

Cette délétion a été retrouvée chez 7 patients (dans 1/7 cas, il s'agissait d'une délétion secondaire puisque cette patiente présentait un réarrangement *KMT2A*).

c) Transcrits *BCR-ABL1 like*

L'analyse *SNP-array* permet également d'identifier des réarrangements de type *BCR-ABL1-like* (Figure 38), lors d'anomalies du nombre de copies impliquant des gènes codant pour des kinases notamment. Tous ces cas sont explorés parallèlement par une technique complémentaire de détection de transcrits de fusion la RT-MLPA (139).



Figure 38. Transcrits de fusion *BCR-ABL1-like* retrouvés parmi les patients de l'étude.

Ce type d'anomalie a été caractérisé chez 5/151 patients de notre étude :

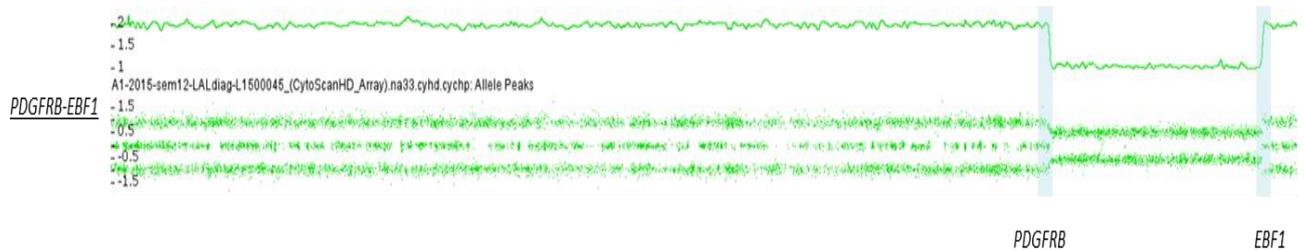


Figure 39. Déletion de matériel chromosomique entre *PDGFRB* et *EBF1* observée par *SNP-array* en faveur d'une fusion *PDGFRB-EBF1* (Patient 30).

Patient 30 (Figure 39) : Jeune fille de 12 ans présentant une LAL-BIII, hyperleucocytaire à 650 G/L, sans envahissement neuro-méningé au diagnostic. Le caryotype était en échec par technique conventionnelle mais l'étude *SNP-array* retrouvait un caryotype de type 46,XX,del(5)(q32). Des délétions au niveau de *PDGFRB* et *EBF1* ont ainsi été retrouvées, faisant évoquer un transcrit de type *PDGFRB-EBF1*, confirmé par RT-MLPA. La patiente était traitée selon le protocole EORTC 58081 bras VHR. Elle était corticorésistante mais chimiosensible. Le traitement d'entretien était associé à l'imatinib (Glivec®) auquel il a été attribué des cytopénies qui n'ayant toutefois pas empêché le maintien de ce traitement. Elle était toujours en réponse complète à 18 mois du diagnostic.

Patient 47 : Jeune homme de 23 ans présentant une LAL-BII sans envahissement neuro-méningé. Le caryotype de qualité médiocre par technique conventionnelle était normal. L'étude par *SNP-array* retrouvait un caryotype de type 46,XY,del(5)(q32). La délétion du bras long du chromosome 5 était localisée entre les gènes *PDGFRB* et *EBF1*. La RT-MLPA confirmait la présence de ce transcrit de type *PDGFRB-EBF1*. Le patient était traité selon le protocole GRAAL 2005. Il était corticorésistant et chimiorésistant. Le patient recevait une consolidation selon le GRAALL 2014 à laquelle de l'imatinib (Glivec®) était associé avant la greffe. Il était en réponse complète 3 mois après sa greffe, soit à 10 mois du diagnostic.

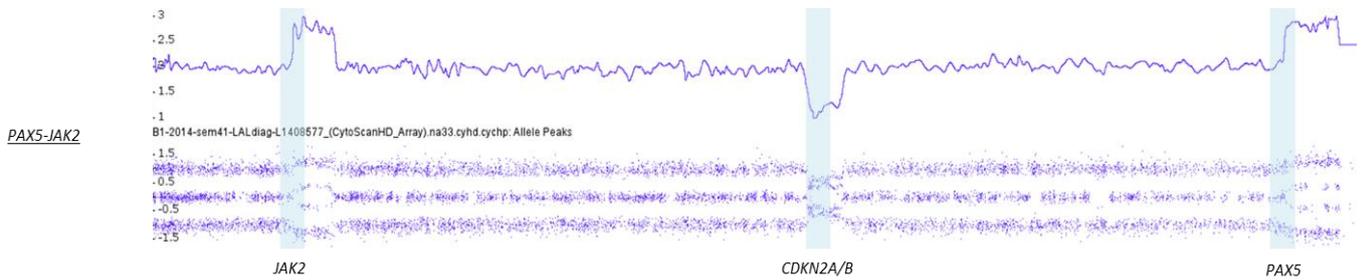


Figure 40. Gain de matériel chromosomique au niveau de *JAK2* et de *PAX5* observé par *SNP-array* permettant de suspecter la fusion *PAX5-JAK2* (Patient 139).

Patient 139 (Figure 40) : Jeune fille de 5 ans présentant une LAL-BIII à caryotype 46,XX,add(19)(p13), hyperleucocytaire et présentant un envahissement neuro-méningé au diagnostic. Des gains focaux de *JAK2* et *PAX5* étaient retrouvés par *SNP-array*, faisant suspecter un transcrite de fusion de type *PAX5-JAK2*, confirmé par RT-MLPA. La patiente était traitée selon le protocole EORTC 58081 bras AR2 sans changement thérapeutique. La maladie était corticosensible et chimiosensible. Elle était toujours en réponse complète à 17 mois du diagnostic.

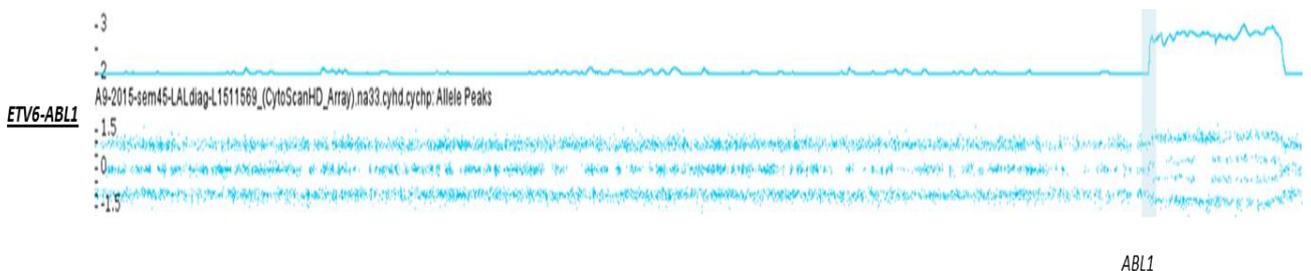


Figure 41. Gain de matériel chromosomique au niveau d'*ABL1* observé par *SNP-array* permettant de suspecter un transcrite de fusion de type *BCR-ABL1-like* (Patient 85).

Patient 85 (Figure 41) : Jeune homme de 19 ans présentant une LAL-BI à caryotype complexe (plus de 3 anomalies cyogénétiques) hyperleucocytaire sans envahissement neuro-méningé. Un transcrite impliquant *ABL1* était suspecté en *SNP-array* car un gain focal d'*ABL1* (9q34) était retrouvé. Il n'existait pas d'argument pour l'identification du gène partenaire. La RT-MLPA permettait l'identification d'un transcrite de fusion de type *ETV6-ABL1*. Le patient était traité selon le protocole GRAAL 2005 mais s'avérait être corticorésistant, chimiorésistant et rechutait. Un traitement de rattrapage par imatinib (Glivec®) était instauré mais a devait être arrêté en raison d'une forte hépatotoxicité. Une deuxième allogreffe de CSH est envisagée.

Par ailleurs, il est à noter qu'une délétion débutant à *ABL1* de 4,9 Mb (9q33.3-9q34.12) a été identifiée chez le patient 102, sans qu'un transcrite de fusion impliquant *ABL1* n'ait pu être mis en évidence jusqu'à présent.

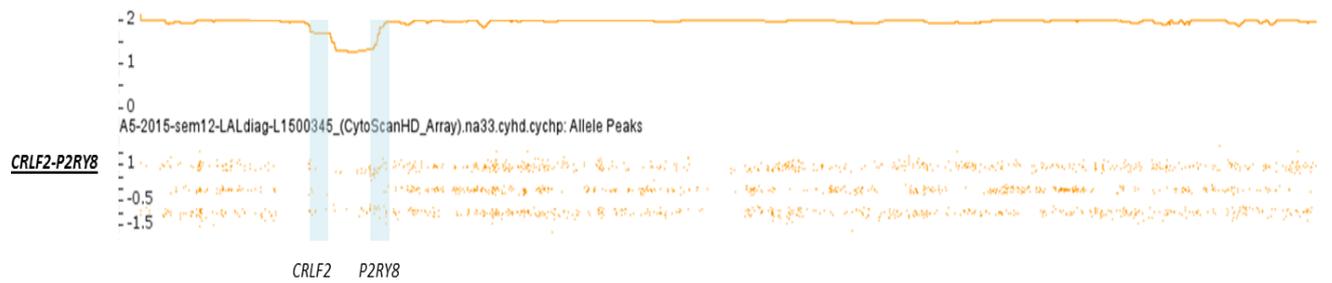


Figure 42. Délétion de matériel chromosomique entre *CRLF2* et *P2RY8* observée par *SNP-array* en faveur d'une fusion *CRLF2-P2RY8* (Patient 29).

Patient 29 (Figure 42) : Jeune fille de 6 ans présentant une LAL-BII non hyperleucocytaire et sans envahissement neuro-méningé. Le caryotype retrouvait une trisomie 21 constitutionnelle. L'étude par *SNP-array* retrouvait cette même anomalie. De plus, une délétion localisée au niveau de la région pseudoautosomale Xp22.33 du chromosome X suggérait la présence d'un transcrit de fusion de type *P2RY8-CRLF2*, confirmé par RT-MLPA. La patiente était traitée selon le protocole FRALLE A. Elle était corticosensible et chimiosensible et en réponse complète à 11 mois du diagnostic.

3) Classification après Cytoscan® HD

La classification des patients suite à l'utilisation par *SNP-array* a permis de catégoriser les patients de la manière suivante (Figure 43) :

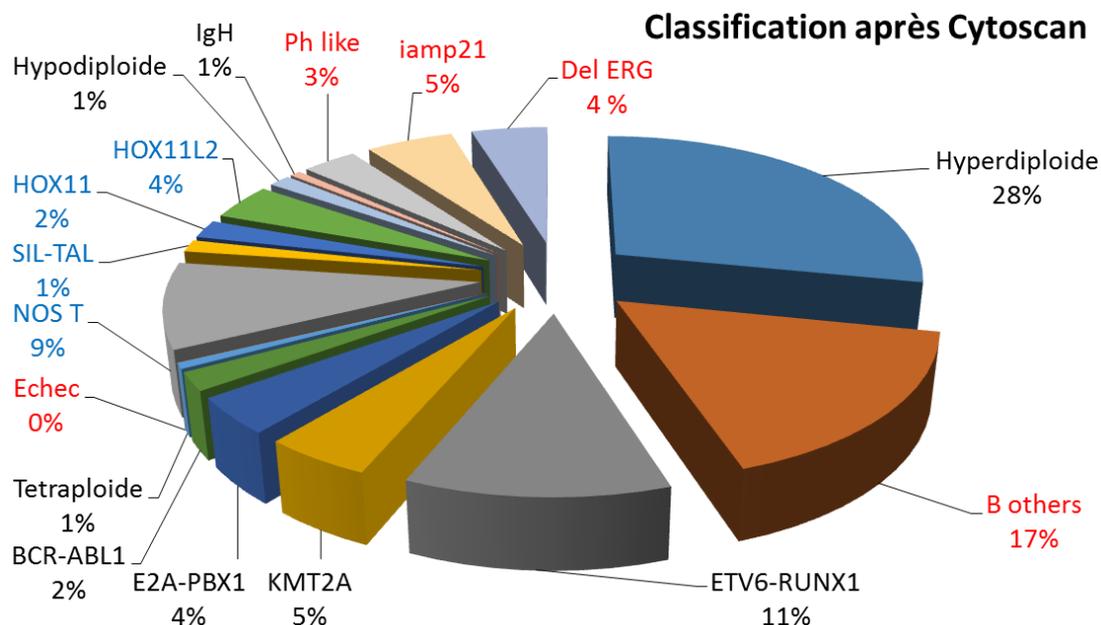


Figure 43. Classification des patients de l'étude suite à l'utilisation du Cytoscan® HD (en rouge les échecs, les B « others » et les nouvelles catégories oncogénétiques détectées par *SNP-arrays*, en bleu les LAL-T).

Avec l'apport du *SNP-array*, nous ne retrouvons aucun cas d'échec de classification car un caryotype ou des transcrits ont toujours pu être définis.

Certains cas de LAL-B « others » ont pu être reclassés dans des groupes de pronostic bien distinct permettant d'établir un traitement adapté. Pour les LAL-B « others » restantes, le *SNP-array* a permis d'identifier de nouvelles altérations génétiques associées à un score pronostique (118).

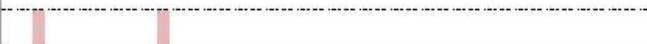
Une difficulté de classification subsiste pour les LAL-T.

F) Paysage génétique

1) Patients hyperdiploïdes

La détermination du paysage génétique par *SNP-array* des LAL-B classées selon l'OMS 2016 a permis de mettre en évidence que la nature et la fréquence des altérations génétiques sont associées au sous type de LAL.

Tableau 10. Paysage génétique des patients hyperdiploïdes.

		Hyperdiploïde
<u>Développement lignée B</u>	Del IKZF1 (7p12) Del PAX5 (9p) Del ETV6 (12p13) Del VPREB1 (22q11) Del EBF1 (5q33) Del ELF1 (13q13) Del LEF1 (4q25)	
<u>Voie de Tyrosine kinase</u>	Del PAR1	
<u>Réponse aux médicaments</u>	Del TBL1XR1 (3q26) Del NR3C1 (5q31) Del NR3C2 (4q31)	
<u>Apoptose</u>	Del BTG1 (12q21)	
<u>Marqueurs lymphoïdes</u>	Del BTLA (3q13) Del TOX (8q12)	
<u>Suppresseur de tumeur</u>	Del CDKN2A/B (9p21) bi Del RB1 (13q14) Del PTEN (10q23) Del PHF6 (Xq26)	
<u>Régulation transcriptionnelle</u>	Gain MYB (6q23)	
<u>hématopoïese</u>	Del ERG (21q22)	
<u>Lymphopoïese</u>	Del TCF3 (19p13)	

- Peu de délétions sont retrouvées au sein des patients hyperdiploïdes avec seulement 11/42 patients (Tableau 10).
De plus, au maximum deux délétions par patient sont identifiées et ne touchent pas des gènes dont l'impact pronostique est clairement reconnu.

- Les patients présentant une translocation de type $t(12;21)(p13;q22)$; *RUNX1-ETV6* présentent de multiples délétions (Tableau 11).
En majorité, ces délétions concernent des gènes impliqués dans le développement de la lignée B.
Des délétions au niveau des gènes se rapportant à la réponse aux médicaments, et du gène suppresseur de tumeur *CDKN2A/B* sont également retrouvées. On peut noter la possibilité de détecter des délétions au niveau du gène *ETV6* (8/16 cas), pouvant orienter vers ce type de classification.
- Les délétions sont peu nombreuses pour les patients possédant une amplification intra-chromosomique au niveau du chromosome 21, hormis celles concernant les gènes *ETV6* et *RB1*.
- Il est à noter la similitude de profil génomique en *SNP-array* entre les patients présentant une translocation $t(9;22)(q34;q11.2)$; *BCR-ABL1* et les patients *Ph-like*. On constate notamment la présence de délétions au niveau des gènes *IKZF1*, *PAX5* et *CDKN2A/B*.
- Les LAL-B « *others* » présentent également volontiers des délétions de gènes impliqués dans le développement de la lignée B tels que *IKZF1* ou *PAX5*.
- Les patients délétés *ERG* présentent tous au moins une anomalie secondaire associée, majoritairement parmi les gènes impliqués dans le développement de la lignée B.
- Les patients avec $t(v;11q23)$; réarrangement *KMT2A (MLL)* présentent peu d'anomalies secondaires, hormis des délétions *IKZF1*, *PAX5* ou *ELF1* (2/7 cas). Il est à noter un cas de délétion de *ERG*, anomalie sous-clonale secondaire dans ce cas.
- Enfin, les $t(1;19)(q23;p13.3)$; *TCF3-PBX1* présentent très peu de délétions. On peut noter la possibilité de détecter des délétions au niveau du gène *TCF3* (4/7 cas), pouvant orienter vers ce type de classification.

G) Pronostic

Nous avons étudié la rechute des patients en fonction de différents paramètres pronostiques, cliniques et biologiques (Tableau 12).

Tableau 12 Patients ayant rechuté et leurs facteurs pronostiques associés (en rouge les anomalies, en gris NR : non renseigné).

Patient	36	41	61	85	90	114	122	125	130
Sexe	M	M	M	M	M	M	F	M	F
Age diag	3	0	14	19	16	4	7	9	1
EGIL	BIII	BI	BIII	BI	BII	BI	TIII/IV	TIV	BIV
Classification	KMT2A	KMT2A	iamp21	Ph like	B others	KMT2A	T others	HOX11L2	KMT2A
Atteinte SNC	Oui	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Non	Oui
GB	73,5	977	2,9	83	1	375	580	33	740
Corticorésistance	Non	Oui	Inévaluable	Oui	Inévaluable	Non	Oui	Non	Non
MRD1	Neg	Pos	Pos	Neg	Neg	NR	NR	Pos	Neg
MRD2	Neg	Pos	Neg	Pos	Neg	NR	NR	Pos	Pos
Décès	Non	Oui	Non	Non	Non	Oui	Oui	Non	Oui
Delétions récurrentes	CDKN2A/B		x	x	x		x	x	
	IKZF1	x		x				x	x
	PAX5				x	x	x	x	x
	VPREB1			x		x			x
	ETV6							x	
	ELF1	x					x		
	TCF3						x		

Parmi les 149 patients inclus dans cette étude, seuls 9 ont rechuté. Cependant, des tendances ont pu mettre en exergue certaines corrélations entre les rechutes et :

- Les réarrangements de *KMT2A* $p=0.001$ (Tableau 13).

Tableau 13. Étude des rechutes en fonction des translocations *KMT2A*.

		Rechute		Total
		Oui	Non	
Translocation <i>KMT2A</i>	Oui	4	4	8
	Non	5	136	141
	Total	9	140	149

- Les délétions de *PAX5* $p=0.050$ (Tableau 14).

Tableau 14. Étude des rechutes en fonction des délétions de *PAX5*.

		Rechute		Total
		Oui	Non	
Délétion <i>PAX5</i>	Oui	4	22	26
	Non	5	118	123
	Total	9	140	149

- Les délétions d'*IKZF1* $p=0.028$ (Tableau 15).

Tableau 15. Étude des rechutes en fonction des délétions d'*IKZF1*.

		Rechute		Total
		Oui	Non	
Délétion <i>IKZF1</i>	Oui	4	18	22
	Non	5	122	127
	Total	9	140	149

- La maladie résiduelle n°1 (MRD1) $p= 0.001$ (Tableau 16).

Tableau 16. Étude des rechutes en fonction de la MRD1.

		Rechute		Total
		Oui	Non	
MRD1	Positive	3	2	5
	Négative	4	125	129
	Total	7	127	134

- La maladie résiduelle n°2 (MRD2) $p<0.001$ (Tableau 17).

Tableau 17. Étude des rechutes en fonction de la MRD2.

		Rechute		Total
		Oui	Non	
MRD2	Positive	4	3	7
	Négative	3	120	123
	Total	7	123	130

Les réarrangements de *KMT2A*, les délétions de *IKZF1* ou de *PAX5*, et une maladie résiduelle positive à J35 et 70 seraient donc associés à un risque de rechute élevé dans les LAL, comme cela a déjà été démontré sur des cohortes plus importantes (41,59,85).

VII) Discussion

La caractérisation des anomalies cytogénétiques et moléculaires est déterminante dans la prise en charge des patients atteints de LAL. Cette recherche s'effectue encore la plupart du temps par la détermination du caryotype par cytogénétique conventionnelle et par la recherche de délétions ciblées par biologie moléculaire. Cependant, depuis quelques années, l'approche *SNP-array* offre de nouvelles perspectives.

L'objectif de notre travail a été d'évaluer l'apport de cette technique dans la prise en charge des LAL de l'enfant et de l'adulte jeune. Nous avons ainsi pu exploiter les données de 151 patients diagnostiqués depuis le début de la mise en place de cette technique au laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille début 2014 jusqu'à la fin de l'année 2015.

Cette étude confirme tout d'abord que la cytogénétique médicale est en pleine révolution. Si la cytogénétique conventionnelle reste l'examen de référence pour la détermination des caryotypes, les nouvelles technologies pangénomiques de type *SNP-array* et *CGH-array* ouvrent de nouvelles possibilités car elles sont fiables et hautement résolutes. En effet, la technologie *SNP-array* présente l'avantage d'être réalisée à partir d'ADN sans nécessité de culture cellulaire ; cette étape est nécessaire pour le caryotype conventionnel mais souvent difficile dans le cas des LAL.

L'approche *SNP-array* démontre par ce travail un taux d'échec bien moindre (2/151 *versus* 22/150) pour la détection d'anomalies cytogénétiques. Nous avons ainsi pu établir un caryotype pour les 22 patients en échec en cytogénétique conventionnelle, et pu confirmer voire compléter les 10 caryotypes dont la définition était médiocre.

Deux analyses d'échantillons par *SNP-array* n'ont pas abouti à des résultats interprétables. Le premier cas s'explique par une blastose médullaire faible à hauteur de 20% (seuil de sensibilité fournisseur d'au moins 20% des cellules et plutôt 30% entre nos mains), et le second cas par un ADN dégradé du fait d'une mauvaise hybridation liée à une puce défectueuse (les électrophorèses de contrôle pour l'amplification/ligation et la fragmentation étaient très bonnes tandis que les contrôles de qualité d'hybridation du logiciel ChAS étaient tous très mauvais : SNPQC = 0,012 ; MAPD = 0,649 ; Waviness = 0,139).

Par ailleurs, de nombreuses délétions ont été retrouvées. 75% d'entre elles étaient cryptiques car de taille inférieure à 5Mb et donc non visibles par cytogénétique conventionnelle. Il s'agit là d'une réelle plus-value de la technique *SNP-array*, particulièrement dans le cadre des LAL-B où les microdélétions représentent un mécanisme de leucémogénèse récurrent (97). Ces délétions concernent notamment des gènes impliqués dans le développement de la lignée B (*IKZF1*, *PAX5*, *ETV6*, *TCF3*, *ERG*...), dans la réponse aux médicaments (*TBL1XR1*, *NR3C1*, *NR3C2*) et des gènes suppresseurs de tumeurs (*CDKN2A/B*, *RB1*...). Certains de ces gènes ont d'ores et déjà un impact pronostique avéré : les délétions isolées des gènes *IKZF1*, *EBF1* ou *RB1* sont associées à un pronostic défavorable, tandis que celles

concernant les gènes *ERG*, *ETV6* ou *BTG1* sont favorables (87,118,123). En ce qui concerne les gains, ils étaient plutôt rares en dehors des LAL hyperdiploïdes. L'unique gain cryptique identifié concerne le gène *MYB*.

La concordance est excellente pour l'identification de délétions focales des gènes également ciblées par MLPA. Toutefois, bien que la technologie *SNP-array* permette de détecter des délétions focales ne touchant que quelques exons du gène incriminé, la MLPA demeure plus précise en permettant de détecter des délétions ne touchant qu'un exon, et possède une meilleure sensibilité. Les discordances observées (4/151) entre les résultats de MLPA et de *SNP-array* peuvent ainsi s'expliquer par le fait que l'approche *SNP-array* offre une sensibilité moindre pour la détection d'anomalies sous-clonales ou au sein d'un prélèvement dilué.

Par ailleurs, bien que l'analyse *SNP-array* ne permette théoriquement pas de détecter des anomalies équilibrées, plusieurs anomalies cytogénétiques dites équilibrées ont pu être identifiées car elles sont caractérisées par des anomalies du nombre de copie des gènes aux points de cassure : délétions *ETV6* (8/16) dans le cadre des t(12 ;21), délétions *TCF3* (4/6) dans le cadre des t(1 ;19).

La distribution des fréquences des classes de LAL de nos patients s'est avérée conforme à la littérature avec une majorité de patients hyperdiploïdes et présentant une t(12 ;21). Dans un premier temps, 31/151 patients (soit 20%) étaient classés au sein du groupe des LAL-B « *others* » car aucune anomalie cytogénétique ou de biologie moléculaire n'avaient pu être détectées par les techniques conventionnelles. Parmi ceux-ci, 14 patients (9% de tous les patients) ont pu être reclassés grâce à l'analyse *SNP-array*. Trois principaux types d'anomalies d'impact pronostique et/ou thérapeutique ont pu être retrouvées ou suspectées : l'amplification intrachromosomique du chromosome 21, la délétion de *ERG*, la détection d'anomalies compatibles avec la présence d'un transcrite de fusion de type *Ph like*.

La fréquence des iAMP21 retrouvées après *SNP-array* était de 5% alors qu'elle est de 2 à 3% dans la littérature. Cette discordance pourrait s'expliquer d'une part par le fait que cette anomalie était encore récemment peu connue donc non systématiquement recherchée, et d'autre part car cette dernière technique permet une détection optimale des iAMP21 avec un nombre de copies de *RUNX1* augmenté et une délétion télomérique du chromosome 21 évocatrice.

De même, les analyses conventionnelles de cytogénétique et de biologie moléculaire sont des techniques peu adaptées pour la détection des LAL *Ph-like*. La technique de *SNP-array* est une technique de choix dans ce cas de figure car elle permet de détecter les gains ou délétions sur l'ensemble du génome dont les gènes impliqués dans des transcrits à activité tyrosine kinase (*ABL1*, *JAK2*, *PDGFRB*) ou ceux codant pour des récepteurs de cytokines (*CRLF2*) (76). Ces anomalies du nombre de copies touchant ces gènes sont en faveur d'un possible transcrite de fusion de type *BCR-ABL1-like*. En outre, cette technique pangénomique permet également de détecter des anomalies fréquemment associées à ce type de leucémies aiguës, telles que les délétions d'*IKZF1* (93). Néanmoins, afin de pouvoir caractériser ces transcrits avec certitude, une technique complémentaire doit être mise en place : au CHRU de Lille, nous avons choisi d'utiliser la RT-MLPA (139).

Par ailleurs, 15 patients (10%) de l'étude étaient auparavant en échec de classification avec les analyses conventionnelles car ni transcrite de fusion ni

réarrangement n'avaient pu être mis en évidence, et le caryotype était en échec. L'analyse *SNP-array* a permis leur catégorisation essentiellement en LAL-B « *others* », T « *others* » et hyperdiploïdes.

Nous avons également pu déterminer le paysage génétique des LAL en fonction de leur classe OMS. Seules quelques modifications sont observées dans les leucémies *KMT2A*-réarrangé, alors que de multiples altérations sont objectivées dans les LAL avec transcrits de fusion *Ph-like* et les translocations *ETV6-RUNX1*. Ceci suggère que seules quelques altérations génétiques supplémentaires sont nécessaires pour induire une leucémie dans le cas des réarrangements *KMT2A* alors que dans le cas des transcrits *Ph-like* et *ETV6-RUNX1* de multiples anomalies additionnelles sont requises dans la leucémogénèse.

La technique Cytoscan® HD est réalisable à condition de posséder un nombre suffisant de prélèvements, car l'analyse s'effectue par série de 12 à 24 échantillons. Il s'agit d'un examen innovant dont le coût fournisseur est de 250 euros par patient. Ce coût est à contrebalancer avec l'aide précieuse apportée par cet examen dans la prise en charge des patients au diagnostic d'une LAL. En effet, il permet d'instaurer de façon précoce un traitement mieux adapté au type de LAL, ce qui se traduit à la fois par une amélioration de la survie et une diminution de la survenue de complications. Également, il diminue les surcoûts engendrés par de nouveaux traitements suite à des rechutes, ou par des effets indésirables en relation avec des traitements plus intensifs que nécessaire.

De plus, les analyses de cytogénétique et biologie moléculaire conventionnelles ont également un coût. Compte tenu des très bons résultats présentés dans ce travail en matière de concordance avec l'analyse *SNP-array*, il pourrait donc être envisagé de remplacer ces techniques conventionnelles par la technique de cytogénétique moléculaire *SNP-array*, associée à la technique de RT-MLPA pour la recherche de transcrits de fusion chimériques.

Nous avons choisi de présenter ce travail en recherchant des anomalies indépendamment du type de LAL-B ou T.

Il est toutefois à noter que les types d'anomalies détectées par *SNP-array*, en particulier les microdélétions, sont plus nombreuses et mieux décrites au sein des LAL-B.

Au CHRU de Lille, la technique de biologie moléculaire de MLPA n'est pas effectuée en routine pour les LAL-T car il s'agit d'une technique ciblée de détection de délétions ou de gains. Or, de telles anomalies récurrentes d'impact pronostique n'ont actuellement pas été mises en évidence. Les études démontrent plutôt des altérations par transcrits équilibrés (89) ou mutations (94) au sein des LAL-T.

Grâce aux dernières technologies développées au sein des laboratoires, en particulier les *SNP-arrays*, seuls environ 20% des patients atteints de LAL-B ne sont toujours pas classables alors que c'est encore le cas pour plus de 50% des LAL-T.

L'étude effectuée s'appuie sur un effectif important, puisque 151 patients ont été étudiés. Cependant, afin de différencier plusieurs groupes statistiques, les patients ont été associés en fonction de leur classification OMS ou d'autres anomalies détectées par *SNP-array*. Par conséquent, notamment pour les anomalies plus rares,

les sous-groupes étaient constitués d'un nombre très restreint de patients pour lesquels il était difficile d'obtenir des résultats pronostiques significatifs.

De plus, le recul médian (18 mois) par rapport au diagnostic est faible donc peu propice à une analyse pronostique statistique optimale. En effet, les patients de l'étude ont tous été diagnostiqués en 2014 et 2015. Pour les patients diagnostiqués fin 2015, nous ne disposons que de quelques mois de recul. Au mieux, pour les premiers patients inclus dans cette étude, deux ans et demi d'évolution ont pu être observés. Les contraintes de temps n'ont ainsi pas permis d'avoir plus de recul, notamment concernant les rechutes ou les décès.

Des tendances ont tout de même pu être observées, par exemple le pronostic défavorable des patients atteints de LAL avec réarrangements de *KMT2A* qui représentent 3 des 5 décès dénombrés et 4 des 9 rechutes. Ce travail a également permis de confirmer que les délétions d'*IKZF1* ainsi qu'une MRD positive sont des éléments de mauvais pronostic.

D'ici quelques temps, le recul sera plus optimal pour affiner les corrélations pronostiques et exploiter ainsi au mieux les données recueillies au cours de ce travail.

Dans certaines hémopathies, telles que les syndromes myélodysplasiques (SMD), il a été démontré que certaines disomies uniparentales (UPDs) impliquant des chromosomes fréquemment touchés par les délétions pouvaient avoir des implications pronostiques similaires à ces délétions (140).

L'interprétation des UPDs s'est avérée complexe car ce sont des anomalies qui n'ont jusqu'ici pas été caractérisées au sein des LAL. Peu d'UPDs ont pu être observées chez les patients de notre cohorte, mais la plupart des UPDs retrouvées concernaient des gènes fréquemment délétés tels que *PAX5* et *CDKN2A/B*. Les études statistiques sur ces faibles effectifs n'ont pas permis de retrouver d'impact pronostique.

Une technologie de type *CGH-array* aurait ainsi pu être valable dans le cadre de cette étude car les UPDs n'ont pas pu être pleinement exploitées. Néanmoins, la détection d'UPDs est intéressante dans la caractérisation des hypodiploïdies masquées (qui restent toutefois des situations très rares).

Enfin, bien que le nombre de *Single Nucleotid Polymorphism* (SNPs) soit très important et recouvre plus de 99% du génome, certaines régions sont moins bien couvertes. C'est notamment le cas d'une zone d'intérêt Xp22.33 correspondant au gène *CRLF2*. Dans ce cas une autre technique, telle que la PCR quantitative en temps réel, peut être intéressante afin de pouvoir détecter cette anomalie de manière plus fiable.

Ainsi, les résultats obtenus grâce à ce travail sont très encourageants et permettent de valoriser l'activité du laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille dans la prise en charge des jeunes patients atteints de LAL, en apportant le maximum d'informations utiles aux pédiatres. La place du *SNP-array* dans les LAL de l'adulte pourrait désormais être étudiée et son intérêt rapidement démontré.

VIII) Conclusion

En conclusion, cette étude permet de démontrer que la cytogénétique moléculaire pangénomique et hautement résolutive constitue un lien important entre la cytogénétique conventionnelle et la biologie moléculaire.

En effet, dans un temps compatible avec un laboratoire de routine moléculaire, les puces à ADN de type *SNP-array* permettent d'améliorer la prise en charge des patients atteints de LAL en apportant des informations supplémentaires, non retrouvées avec les analyses conventionnelles. Une classification optimale de ces LAL permet d'utiliser le traitement le plus adapté pour obtenir de meilleurs résultats en matière de survie des patients et limiter la survenue de complications.

Le caryotype conventionnel nécessite l'obtention de cellules en métaphase donc des divisions cellulaires, ce qui peut être délicat, en particulier pour les patients atteints de LAL. L'approche *SNP-array* présente quant à elle un taux d'échec extrêmement faible (1,3%) ainsi qu'une meilleure résolution.

De plus, la concordance avec les délétions retrouvées en biologie moléculaire est excellente (97%). L'analyse *SNP-array* présente en outre l'avantage d'être pangénomique. De fait, nous avons pu retrouver de multiples altérations géniques, en particulier de nombreuses microdélétions qui s'avèrent être un mécanisme privilégié de leucémogénèse dans les LAL-B.

Grâce à cette analyse de nombreux patients ont pu bénéficier d'une prise en charge plus adaptée. Mise en place en routine au sein du secteur de Biologie Moléculaire du Laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille cours de cette étude, la technique *SNP-array* possède désormais toute sa place dans la prise en charge initiale des patients atteints de LAL.

IX) Bibliographie

1. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 1 nov 2001;414(6859):105-11.
2. Fey MF. Normal and malignant hematopoiesis. *Ann Oncol Off J Eur Soc Med Oncol ESMO*. janv 2007;18 Suppl 1:i9-13.
3. Saudemont A, Quesnel B. In a model of tumor dormancy, long-term persistent leukemic cells have increased B7-H1 and B7.1 expression and resist CTL-mediated lysis. *Blood*. 1 oct 2004;104(7):2124-33.
4. Cheung AMS, Kwong Y-L, Liang R, Leung AYH. Stem cell model of hematopoiesis. *Curr Stem Cell Res Ther*. sept 2006;1(3):305-15.
5. Morrison SJ, Weissman IL. The long-term repopulating subset of hematopoietic stem cells is deterministic and isolatable by phenotype. *Immunity*. nov 1994;1(8):661-73.
6. Larsson J, Karlsson S. The role of Smad signaling in hematopoiesis. *Oncogene*. 29 août 2005;24(37):5676-92.
7. Woolthuis CM, Park CY. Hematopoietic stem/progenitor cell commitment to the megakaryocyte lineage. *Blood*. 10 mars 2016;127(10):1242-8.
8. Nimmo RA, May GE, Enver T. Primed and ready: understanding lineage commitment through single cell analysis. *Trends Cell Biol*. août 2015;25(8):459-67.
9. Rieger MA, Hoppe PS, Smejkal BM, Eitelhuber AC, Schroeder T. Hematopoietic cytokines can instruct lineage choice. *Science*. 10 juill 2009;325(5937):217-8.
10. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 22 févr 2008;132(4):631-44.
11. Rhodes J, Hagen A, Hsu K, Deng M, Liu TX, Look AT, et al. Interplay of pu.1 and gata1 determines myelo-erythroid progenitor cell fate in zebrafish. *Dev Cell*. janv 2005;8(1):97-108.
12. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol*. oct 2002;39(4 Suppl 3):6-11.
13. Sharma S, Gurudutta G. Epigenetic Regulation of Hematopoietic Stem Cells. *Int J Stem Cells*. 30 mai 2016;9(1):36-43.

14. Ji H, Ehrlich LIR, Seita J, Murakami P, Doi A, Lindau P, et al. Comprehensive methylome map of lineage commitment from haematopoietic progenitors. *Nature*. 16 sept 2010;467(7313):338-42.
15. Kluiver J, Kroesen B-J, Poppema S, van den Berg A. The role of microRNAs in normal hematopoiesis and hematopoietic malignancies. *Leukemia*. nov 2006;20(11):1931-6.
16. Passegué E, Weisman IL. Leukemic stem cells: where do they come from? *Stem Cell Rev*. 2005;1(3):181-8.
17. Mullighan CG. The molecular genetic makeup of acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2012;2012:389-96.
18. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Lond Engl*. 1 juin 2013;381(9881):1943-55.
19. Lacour B, Guyot-Goubin A, Guissou S, Bellec S, Désandes E, Clavel J. Incidence of childhood cancer in France: National Children Cancer Registries, 2000-2004. *Eur J Cancer Prev Off J Eur Cancer Prev Organ ECP*. mai 2010;19(3):173-81.
20. Monnereau A, Remontet L, Maynadié M, Binder-Foucard F, Belot A, Troussard X, et al. Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 [Internet]. InVS. Disponible sur: <http://www.invs.sante.fr/Publications-et-outils/Rapports-et-syntheses/Maladies-chroniques-et-traumatismes/2013/Estimation-nationale-de-l-incidence-des-cancers-en-France-entre-1980-et-2012>
21. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 11 avr 2016;
22. Chow EJ, Puumala SE, Mueller BA, Carozza SE, Fox EE, Horel S, et al. Childhood cancer in relation to parental race and ethnicity: a 5-state pooled analysis. *Cancer*. 15 juin 2010;116(12):3045-53.
23. Swift M. Fanconi's anaemia in the genetics of neoplasia. *Nature*. 9 avr 1971;230(5293):370-3.
24. Toledano SR, Lange BJ. Ataxia-telangiectasia and acute lymphoblastic leukemia. *Cancer*. 1 avr 1980;45(7):1675-8.
25. Dördelmann M, Schrappe M, Reiter A, Zimmermann M, Graf N, Schott G, et al. Down's syndrome in childhood acute lymphoblastic leukemia: clinical characteristics and treatment outcome in four consecutive BFM trials. Berlin-Frankfurt-Münster Group. *Leukemia*. mai 1998;12(5):645-51.

26. Shu XO, Potter JD, Linet MS, Severson RK, Han D, Kersey JH, et al. Diagnostic X-rays and ultrasound exposure and risk of childhood acute lymphoblastic leukemia by immunophenotype. *Cancer Epidemiol Biomark Prev Publ Am Assoc Cancer Res Cosponsored Am Soc Prev Oncol*. févr 2002;11(2):177-85.
27. Greaves MF, Alexander FE. An infectious etiology for common acute lymphoblastic leukemia in childhood? *Leukemia*. mars 1993;7(3):349-60.
28. Freedman DM, Stewart P, Kleinerman RA, Wacholder S, Hatch EE, Tarone RE, et al. Household solvent exposures and childhood acute lymphoblastic leukemia. *Am J Public Health*. avr 2001;91(4):564-7.
29. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937-51.
30. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN-based oncogenetic risk classification of adult T-cell acute lymphoblastic leukemia: a Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia study. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 déc 2013;31(34):4333-42.
31. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. août 1976;33(4):451-8.
32. 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.
33. Smith M, Bleyer A, Crist W, Murphy S, Sallan SE. Uniform criteria for childhood acute lymphoblastic leukemia risk classification. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. févr 1996;14(2):680-1.
34. Narayanan S, Shami PJ. Treatment of acute lymphoblastic leukemia in adults. *Crit Rev Oncol Hematol*. janv 2012;81(1):94-102.
35. Stock W. Adolescents and young adults with acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 2010;2010:21-9.
36. Bassan R, Gatta G, Tondini C, Willemze R. Adult acute lymphoblastic leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*. juin 2004;50(3):223-61.

37. Smith M, Arthur D, Camitta B, Carroll AJ, Crist W, Gaynon P, et al. Uniform approach to risk classification and treatment assignment for children with acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. janv 1996;14(1):18-24.
38. Pui C-H, Campana D, Pei D, Bowman WP, Sandlund JT, Kaste SC, et al. Treating childhood acute lymphoblastic leukemia without cranial irradiation. *N Engl J Med*. 25 juin 2009;360(26):2730-41.
39. Patrick K, Wade R, Goulden N, Mitchell C, Moorman AV, Rowntree C, et al. Outcome for children and young people with Early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia treated on a contemporary protocol, UKALL 2003. *Br J Haematol*. août 2014;166(3):421-4.
40. Vora A, Goulden N, Mitchell C, Hancock J, Hough R, Rowntree C, et al. Augmented post-remission therapy for a minimal residual disease-defined high-risk subgroup of children and young people with clinical standard-risk and intermediate-risk acute lymphoblastic leukaemia (UKALL 2003): a randomised controlled trial. *Lancet Oncol*. juill 2014;15(8):809-18.
41. Cavé H, van der Werff ten Bosch J, Suciú S, Guidal C, Waterkeyn C, Otten J, et al. Clinical significance of minimal residual disease in childhood acute lymphoblastic leukemia. European Organization for Research and Treatment of Cancer--Childhood Leukemia Cooperative Group. *N Engl J Med*. 27 août 1998;339(9):591-8.
42. Conter V, Bartram CR, Valsecchi MG, Schrauder A, Panzer-Grümayer R, Möricke A, et al. Molecular response to treatment redefines all prognostic factors in children and adolescents with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: results in 3184 patients of the AIEOP-BFM ALL 2000 study. *Blood*. 22 avr 2010;115(16):3206-14.
43. Pui C-H, Evans WE. A 50-year journey to cure childhood acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. juill 2013;50(3):185-96.
44. Norton L, Simon R. The Norton-Simon hypothesis revisited. *Cancer Treat Rep*. janv 1986;70(1):163-9.
45. Yamada M, Wasserman R, Lange B, Reichard BA, Womer RB, Rovera G. Minimal residual disease in childhood B-lineage lymphoblastic leukemia. Persistence of leukemic cells during the first 18 months of treatment. *N Engl J Med*. 16 août 1990;323(7):448-55.
46. Ravandi F, Kebriaei P. Philadelphia chromosome-positive acute lymphoblastic leukemia. *Hematol Oncol Clin North Am*. oct 2009;23(5):1043-1063, vi.
47. 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.
48. Pui C-H, Carroll WL, Meshinchi S, Arceci RJ. Biology, risk stratification, and therapy of pediatric acute leukemias: an update. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 10 févr 2011;29(5):551-65.
 49. Ibagy A, Silva DB, Seiben J, Winneshoffer APFF, Costa TEJB, Dacoregio JS, et al. Acute lymphoblastic leukemia in infants: 20 years of experience. *J Pediatr (Rio J)*. févr 2013;89(1):64-9.
 50. Moorman AV. New and emerging prognostic and predictive genetic biomarkers in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. avr 2016;101(4):407-16.
 51. Moorman AV, Ensor HM, Richards SM, Chilton L, Schwab C, Kinsey SE, et al. Prognostic effect of chromosomal abnormalities in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results from the UK Medical Research Council ALL97/99 randomised trial. *Lancet Oncol*. mai 2010;11(5):429-38.
 52. Dastugue N, Suciú S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 28 mars 2013;121(13):2415-23.
 53. Moorman AV, Richards SM, Martineau M, Cheung KL, Robinson HM, Jalali GR, et al. Outcome heterogeneity in childhood high-hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 oct 2003;102(8):2756-62.
 54. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. juill 2007;46(7):684-93.
 55. Sutcliffe MJ, Shuster JJ, Sather HN, Camitta BM, Pullen J, Schultz KR, et al. High concordance from independent studies by the Children's Cancer Group (CCG) and Pediatric Oncology Group (POG) associating favorable prognosis with combined trisomies 4, 10, and 17 in children with NCI Standard-Risk B-precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: a Children's Oncology Group (COG) initiative. *Leukemia*. mai 2005;19(5):734-40.
 56. Paulsson K, Forestier E, Andersen MK, Autio K, Barbany G, Borgström G, et al. High modal number and triple trisomies are highly correlated favorable factors in childhood B-cell precursor high hyperdiploid acute lymphoblastic leukemia treated according to the NOPHO ALL 1992/2000 protocols. *Haematologica*. sept 2013;98(9):1424-32.

57. Moorman AV. The clinical relevance of chromosomal and genomic abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Rev.* mai 2012;26(3):123-35.
58. Pieters R, Schrappe M, De Lorenzo P, Hann I, De Rossi G, Felice M, et al. A treatment protocol for infants younger than 1 year with acute lymphoblastic leukaemia (Interfant-99): an observational study and a multicentre randomised trial. *Lancet Lond Engl.* 21 juill 2007;370(9583):240-50.
59. Meyer C, Hofmann J, Burmeister T, Gröger D, Park TS, Emerenciano M, et al. The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia.* nov 2013;27(11):2165-76.
60. Druker BJ. Translation of the Philadelphia chromosome into therapy for CML. *Blood.* 15 déc 2008;112(13):4808-17.
61. Fielding AK, Rowe JM, Buck G, Foroni L, Gerrard G, Litzow MR, et al. UKALLXII/ECOG2993: addition of imatinib to a standard treatment regimen enhances long-term outcomes in Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 6 févr 2014;123(6):843-50.
62. Biondi A, Schrappe M, De Lorenzo P, Castor A, Lucchini G, Gandemer V, et al. Imatinib after induction for treatment of children and adolescents with Philadelphia-chromosome-positive acute lymphoblastic leukaemia (EsPhALL): a randomised, open-label, intergroup study. *Lancet Oncol.* sept 2012;13(9):936-45.
63. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart ARM, Wright SL, Martineau M, et al. Molecular cytogenetic characterization of TCF3 (E2A)/19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* mai 2007;46(5):478-86.
64. Chow R, Shabsovich D, Schiller G, Kallen M, Tirado CA. A t(17;19)(q22;p13.3) Involving TCF3, a t(1;9)(p13;p13), and a 5' IGH Deletion in a Case of Adult B-cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *J Assoc Genet Technol.* 2016;42(1):6-14.
65. Harrison CJ, Moorman AV, Broadfield ZJ, Cheung KL, Harris RL, Reza Jalali G, et al. Three distinct subgroups of hypodiploidy in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol.* juin 2004;125(5):552-9.
66. Russell LJ, Enshaei A, Jones L, Erhorn A, Masic D, Bentley H, et al. IGH@ translocations are prevalent in teenagers and young adults with acute lymphoblastic leukemia and are associated with a poor outcome. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 mai 2014;32(14):1453-62.
67. Raimondi SC, Behm FG, Roberson PK, Williams DL, Pui CH, Crist WM, et al. Cytogenetics of pre-B-cell acute lymphoblastic leukemia with emphasis on

- prognostic implications of the t(1;19). *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. août 1990;8(8):1380-8.
68. Kager L, Lion T, Attarbaschi A, Koenig M, Strehl S, Haas OA, et al. Incidence and outcome of TCF3-PBX1-positive acute lymphoblastic leukemia in Austrian children. *Haematologica*. nov 2007;92(11):1561-4.
 69. Papaemmanuil E, Rapado I, Li Y, Potter NE, Wedge DC, Tubio J, et al. RAG-mediated recombination is the predominant driver of oncogenic rearrangement in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. févr 2014;46(2):116-25.
 70. Mullighan CG, Phillips LA, Su X, Ma J, Miller CB, Shurtleff SA, et al. Genomic analysis of the clonal origins of relapsed acute lymphoblastic leukemia. *Science*. 28 nov 2008;322(5906):1377-80.
 71. Hogan LE, Meyer JA, Yang J, Wang J, Wong N, Yang W, et al. Integrated genomic analysis of relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia reveals therapeutic strategies. *Blood*. 10 nov 2011;118(19):5218-26.
 72. Yang JJ, Bhojwani D, Yang W, Cai X, Stocco G, Crews K, et al. Genome-wide copy number profiling reveals molecular evolution from diagnosis to relapse in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 15 nov 2008;112(10):4178-83.
 73. 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.
 74. Yeoh E-J, Ross ME, Shurtleff SA, Williams WK, Patel D, Mahfouz R, et al. Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling. *Cancer Cell*. mars 2002;1(2):133-43.
 75. Harvey RC, Mullighan CG, Wang X, Dobbin KK, Davidson GS, Bedrick EJ, et al. Identification of novel cluster groups in pediatric high-risk B-precursor acute lymphoblastic leukemia with gene expression profiling: correlation with genome-wide DNA copy number alterations, clinical characteristics, and outcome. *Blood*. 2 déc 2010;116(23):4874-84.
 76. 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.
 77. Moorman AV, Richards SM, Robinson HM, Strefford JC, Gibson BES, Kinsey SE, et al. Prognosis of children with acute lymphoblastic leukemia (ALL) and intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21). *Blood*. 15 mars 2007;109(6):2327-30.

78. Heerema NA, Carroll AJ, Devidas M, Loh ML, Borowitz MJ, Gastier-Foster JM, et al. Intrachromosomal amplification of chromosome 21 is associated with inferior outcomes in children with acute lymphoblastic leukemia treated in contemporary standard-risk children's oncology group studies: a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 sept 2013;31(27):3397-402.
79. Heerema NA, Raimondi SC, Anderson JR, Biegel J, Camitta BM, Cooley LD, et al. Specific extra chromosomes occur in a modal number dependent pattern in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. juill 2007;46(7):684-93.
80. van der Veer A, Zaliouva M, Mottadelli F, De Lorenzo P, Te Kronnie G, Harrison CJ, et al. IKZF1 status as a prognostic feature in BCR-ABL1-positive childhood ALL. *Blood*. 13 mars 2014;123(11):1691-8.
81. Martinelli G, Iacobucci I, Storlazzi CT, Vignetti M, Paoloni F, Cilloni D, et al. IKZF1 (Ikaros) deletions in BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia are associated with short disease-free survival and high rate of cumulative incidence of relapse: a GIMEMA AL WP report. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 nov 2009;27(31):5202-7.
82. Iacobucci I, Storlazzi CT, Cilloni D, Lonetti A, Ottaviani E, Soverini S, et al. Identification and molecular characterization of recurrent genomic deletions on 7p12 in the IKZF1 gene in a large cohort of BCR-ABL1-positive acute lymphoblastic leukemia patients: on behalf of Gruppo Italiano Malattie Ematologiche dell'Adulto Acute Leukemia Working Party (GIMEMA AL WP). *Blood*. 3 sept 2009;114(10):2159-67.
83. Schwab CJ, Chilton L, Morrison H, Jones L, Al-Shehhi H, Erhorn A, et al. Genes commonly deleted in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: association with cytogenetics and clinical features. *Haematologica*. juill 2013;98(7):1081-8.
84. Buitenkamp TD, Pieters R, Gallimore NE, van der Veer A, Meijerink JPP, Beverloo HB, et al. Outcome in children with Down's syndrome and acute lymphoblastic leukemia: role of IKZF1 deletions and CRLF2 aberrations. *Leukemia*. oct 2012;26(10):2204-11.
85. Mullighan CG, Su X, Zhang J, Radtke I, Phillips LAA, Miller CB, et al. Deletion of IKZF1 and prognosis in acute lymphoblastic leukemia. *N Engl J Med*. 29 janv 2009;360(5):470-80.
86. Enshaei A, Schwab CJ, Konn ZJ, Mitchell CD, Kinsey SE, Wade R, et al. Long-term follow-up of ETV6-RUNX1 ALL reveals that NCI risk, rather than secondary genetic abnormalities, is the key risk factor. *Leukemia*. nov 2013;27(11):2256-9.

87. Clappier E, Auclerc MF, Rapon J, Bakkus M, Caye A, Khemiri A, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia*. janv 2014;28(1):70-7.
88. Zaliova M, Zimmermannova O, Dörge P, Eckert C, Mörnicke A, Zimmermann M, et al. ERG deletion is associated with CD2 and attenuates the negative impact of IKZF1 deletion in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. janv 2014;28(1):182-5.
89. Arian Van der Veer, Waanders E, Pieters R, Willemse ME, Van Reijmersdal SV, Russell LJ, et al. Independent prognostic value of BCR-ABL1-like signature and IKZF1 deletion, but not high CRLF2 expression, in children with B-cell precursor ALL. *Blood*. 10 oct 2013;122(15):2622-9.
90. Palmi C, Valsecchi MG, Longinotti G, Silvestri D, Carrino V, Conter V, et al. What is the relevance of Ikaros gene deletions as a prognostic marker in pediatric Philadelphia-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia? *Haematologica*. août 2013;98(8):1226-31.
91. Waanders E, van der Velden VHJ, van der Schoot CE, van Leeuwen FN, van Reijmersdal SV, de Haas V, et al. Integrated use of minimal residual disease classification and IKZF1 alteration status accurately predicts 79% of relapses in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. févr 2011;25(2):254-8.
92. Moorman AV, Harrison CJ, Buck GAN, Richards SM, Secker-Walker LM, Martineau M, et al. Karyotype is an independent prognostic factor in adult acute lymphoblastic leukemia (ALL): analysis of cytogenetic data from patients treated on the Medical Research Council (MRC) UKALLXII/Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) 2993 trial. *Blood*. 15 avr 2007;109(8):3189-97.
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. Mullighan CG. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia in children and young adults. *Hematol Educ Program Am Soc Hematol Am Soc Hematol Educ Program*. 5 déc 2014;2014(1):174-80.
95. Roberts KG, Morin RD, Zhang J, Hirst M, Zhao Y, Su X, et al. Genetic alterations activating kinase and cytokine receptor signaling in high-risk acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Cell*. 14 août 2012;22(2):153-66.
96. Roll JD, Reuther GW. CRLF2 and JAK2 in B-Progenitor Acute Lymphoblastic Leukemia: A Novel Association in Oncogenesis. *Cancer Res*. 1 oct 2010;70(19):7347-52.

97. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 25 juin 2015;125(26):3977-87.
98. La Starza R, Barba G, Demeyer S, Pierini V, Di Giacomo D, Gianfelici V, et al. Deletions of the long arm of chromosome 5 define subgroups of T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 août 2016;101(8):951-8.
99. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *Lancet Oncol*. févr 2009;10(2):147-56.
100. Patrick K, Vora A. Update on biology and treatment of T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Curr Opin Pediatr*. févr 2015;27(1):44-9.
101. Neumann M, Coskun E, Fransecky L, Mochmann LH, Bartram I, Sartangi NF, et al. FLT3 mutations in early T-cell precursor ALL characterize a stem cell like leukemia and imply the clinical use of tyrosine kinase inhibitors. *PLoS One*. 2013;8(1):e53190.
102. Neumann M, Heesch S, Schlee C, Schwartz S, Gökbuget N, Hoelzer D, et al. Whole-exome sequencing in adult ETP-ALL reveals a high rate of DNMT3A mutations. *Blood*. 6 juin 2013;121(23):4749-52.
103. Inukai T, Kiyokawa N, Campana D, Coustan-Smith E, Kikuchi A, Kobayashi M, et al. Clinical significance of early T-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: results of the Tokyo Children's Cancer Study Group Study L99-15. *Br J Haematol*. févr 2012;156(3):358-65.
104. Wood BL, Winter SS, Dunsmore KP, Devidas M, Chen S, Asselin B, et al. T-Lymphoblastic Leukemia (T-ALL) Shows Excellent Outcome, Lack of Significance of the Early Thymic Precursor (ETP) Immunophenotype, and Validation of the Prognostic Value of End-Induction Minimal Residual Disease (MRD) in Children's Oncology Group (COG) Study AALL0434. *Blood*. 6 déc 2014;124(21):1-1.
105. Hunger SP, Raetz EA, Loh ML, Mullighan CG. Improving outcomes for high-risk ALL: translating new discoveries into clinical care. *Pediatr Blood Cancer*. juin 2011;56(6):984-93.
106. Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, van Kessel AG, van Leeuwen FN, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*. juin 2007;21(6):1258-66.
107. Safavi S, Hansson M, Karlsson K, Biloglav A, Johansson B, Paulsson K. Novel gene targets detected by genomic profiling in a consecutive series of 126

- adults with acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. janv 2015;100(1):55-61.
108. Ghazavi F, Clappier E, Lammens T, Suciu S, Caye A, Zegrari S, et al. CD200/BTLA deletions in pediatric precursor B-cell acute lymphoblastic leukemia treated according to the EORTC-CLG 58951 protocol. *Haematologica*. oct 2015;100(10):1311-9.
 109. Gupta SK, Bakhshi S, Kumar L, Kamal VK, Kumar R. Gene copy number alteration profile and its clinical correlation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 24 juin 2016;1-10.
 110. Ribera J, Morgades M, Zamora L, Montesinos P, Gómez-Seguí I, Pratcorona M, et al. Prognostic significance of copy number alterations in adolescent and adult patients with precursor B acute lymphoblastic leukemia enrolled in PETHEMA protocols. *Cancer*. 1 nov 2015;121(21):3809-17.
 111. Chapiro E, Russell L, Lainey E, Kaltenbach S, Ragu C, Della-Valle V, et al. Activating mutation in the TSLPR gene in B-cell precursor lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. mars 2010;24(3):642-5.
 112. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LAA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. nov 2009;41(11):1243-6.
 113. Harvey RC, Mullighan CG, Chen I-M, Wharton W, Mikhail FM, Carroll AJ, et al. Rearrangement of CRLF2 is associated with mutation of JAK kinases, alteration of IKZF1, Hispanic/Latino ethnicity, and a poor outcome in pediatric B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1 juill 2010;115(26):5312-21.
 114. Ernst P, Hahm K, Trinh L, Davis JN, Roussel MF, Turck CW, et al. A potential role for Elf-1 in terminal transferase gene regulation. *Mol Cell Biol*. nov 1996;16(11):6121-31.
 115. Kawamata N, Ogawa S, Zimmermann M, Kato M, Sanada M, Hemminki K, et al. Molecular allelokaryotyping of pediatric acute lymphoblastic leukemias by high-resolution single nucleotide polymorphism oligonucleotide genomic microarray. *Blood*. 15 janv 2008;111(2):776-84.
 116. Jia M, Zhao H-Z, Shen H-P, Cheng Y-P, Luo Z-B, Li S-S, et al. Overexpression of lymphoid enhancer-binding factor-1 (LEF1) is a novel favorable prognostic factor in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Int J Lab Hematol*. oct 2015;37(5):631-40.
 117. Nakano K, Uchamaru K, Utsunomiya A, Yamaguchi K, Watanabe T. Dysregulation of c-Myb pathway by aberrant expression of proto-oncogene

MYB provides the basis for malignancy in adult T-cell leukemia/lymphoma cells. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res.* 15 juin 2016;

118. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2014;124(9):1434–44.
119. 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.
120. Meacham CE, Lawton LN, Soto-Feliciano YM, Pritchard JR, Joughin BA, Ehrenberger T, et al. A genome-scale in vivo loss-of-function screen identifies Phf6 as a lineage-specific regulator of leukemia cell growth. *Genes Dev.* 1 mars 2015;29(5):483-8.
121. Gutierrez A, Sanda T, Grebliunaite R, Carracedo A, Salmena L, Ahn Y, et al. High frequency of PTEN, PI3K, and AKT abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 16 juill 2009;114(3):647-50.
122. Ge Z, Gu Y, Xiao L, Han Q, Li J, Chen B, et al. Co-existence of IL7R high and SH2B3 low expression distinguishes a novel high-risk acute lymphoblastic leukemia with Ikaros dysfunction. *Oncotarget.* 14 juin 2016;
123. Olsson L, Castor A, Behrendtz M, Biloglav A, Forestier E, Paulsson K, et al. Deletions of IKZF1 and SPRED1 are associated with poor prognosis in a population-based series of pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia diagnosed between 1992 and 2011. *Leukemia.* févr 2014;28(2):302-10.
124. Parker H, An Q, Barber K, Case M, Davies T, Konn Z, et al. The complex genomic profile of ETV6-RUNX1 positive acute lymphoblastic leukemia highlights a recurrent deletion of TBL1XR1. *Genes Chromosomes Cancer.* déc 2008;47(12):1118-25.
125. Jones CL, Bhatla T, Blum R, Wang J, Paugh SW, Wen X, et al. Loss of TBL1XR1 disrupts glucocorticoid receptor recruitment to chromatin and results in glucocorticoid resistance in a B-lymphoblastic leukemia model. *J Biol Chem.* 25 juill 2014;289(30):20502-15.
126. Wilkinson B, Chen JY-F, Han P, Rufner KM, Goularte OD, Kaye J. TOX: an HMG box protein implicated in the regulation of thymocyte selection. *Nat Immunol.* mars 2002;3(3):272-80.
127. Mangum DS, Downie J, Mason CC, Jahromi MS, Joshi D, Rodic V, et al. VPREB1 deletions occur independent of lambda light chain rearrangement in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* janv 2014;28(1):216-20.

128. Van Delft FW, Horsley S, Colman S, Anderson K, Bateman C, Kempinski H, et al. Clonal origins of relapse in ETV6-RUNX1 acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 9 juin 2011;117(23):6247-54.
129. Data Sheet, CytoScan™ HD Cytogenetics Solution - cytoscan_hd_datasheet.pdf [Internet]. [cité 18 août 2016]. Disponible sur: http://www.cogentech.it/download/molecular-karyotyping-genotyping/cytoscan_hd_datasheet.pdf
130. De Ligt J, Boone PM, Pfundt R, Vissers LELM, de Leeuw N, Shaw C, et al. Platform comparison of detecting copy number variants with microarrays and whole-exome sequencing. *Genomics Data*. déc 2014;2:144-6.
131. Ivanov Öfverholm I, Tran AN, Olsson L, Zachariadis V, Heyman M, Rudd E, et al. Detailed gene dose analysis reveals recurrent focal gene deletions in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 19 avr 2016;1-10.
132. Irving JA, Enshaei A, Parker CA, Sutton R, Kuiper RP, Erhorn A, et al. Integration of genetic and clinical risk factors improves prognostication in relapsed childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Blood*. 26 mai 2016;
133. Barbosa TC, Terra-Granado E, Quezado Magalhães IM, Neves GR, Gadelha A, Guedes Filho GE, et al. Frequency of copy number abnormalities in common genes associated with B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia cytogenetic subtypes in Brazilian children. *Cancer Genet*. oct 2015;208(10):492-501.
134. Dunbar AJ, Gondek LP, O'Keefe CL, Makishima H, Rataul MS, Szpurka H, et al. 250K single nucleotide polymorphism array karyotyping identifies acquired uniparental disomy and homozygous mutations, including novel missense substitutions of c-Cbl, in myeloid malignancies. *Cancer Res*. 15 déc 2008;68(24):10349-57.
135. Renneville A, Abdelali RB, Chevret S, Nibourel O, Cheok M, Pautas C, et al. Clinical impact of gene mutations and lesions detected by SNP-array karyotyping in acute myeloid leukemia patients in the context of gemtuzumab ozogamicin treatment: results of the ALFA-0701 trial. *Oncotarget*. 28 févr 2014;5(4):916-32.
136. Mullighan CG, Downing JR. Global genomic characterization of acute lymphoblastic leukemia. *Semin Hematol*. janv 2009;46(1):3-15.
137. Schoumans J, Suela J, Hastings R, Muehlematter D, Rack K, van den Berg E, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes Cancer*. mai 2016;55(5):480-91.

138. Duployez N, Boudry-Labis E, Decool G, Grzych G, Grardel N, Abou Chahla W, et al. Diagnosis of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21) by molecular cytogenetics in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Clin Case Rep.* oct 2015;3(10):814-6.
139. 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.
140. Gondek LP, Tiu R, O'Keefe CL, Sekeres MA, Theil KS, Maciejewski JP. Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML. *Blood.* 1 févr 2008;111(3):1534-42.

X) Annexe

Les données des patients de l'étude sont représentées ci-dessous (Tableau 18).

Tableau 18. Données des patients de l'étude.

Patient	Sexe	Age	diag	EGIL	Classification avant Cytoscan	Classification après Cytoscan	Atteinte SNC	GB	Corticorésistance	MRD1	MRD2	Rechute	Décès	Délétions récurrentes
1	F	5		BIII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	82	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
2	F	0		BI	KMT2A	KMT2A	NR	120	Oui	NR	NR	Non	Non	Non
3	M	3		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
4	F	10		TII	HOX11L2	HOX11L2	Non	111	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, RB1
5	M	7		BIII	ECHEC	Hyperdiploïde	Non	4	Non	NR	Neg	Non	Non	Non
6	M	4		BI/BIII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	11	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
7	F	16		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,8	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
8	F	10		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	3,3	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
9	M	15		TIII	KMT2A	KMT2A	Non	7,2	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
10	M	4		TIII	ECHEC	T others	Non	242	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PAX5, ELF1
11	M	7		BII	Hypodiploïde	Hypodiploïde	Non	10	Non	NR	NR	Non	Non	ELF1
12	F	25		BII	B others	DelERG	Non	7	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, ERG
13	M	13		BIII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	2	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	VPREB1
14	M	9		TIII	HOX11	HOX11	Non	8,4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PHF6
15	M	3		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,5	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	RB1, ELF1
16	M	18		BII	IGH	IGH	Non	89	Inévaluable	Neg	Pos	Non	Non	IKZF1
17	M	6		TIII	ECHEC	T others	Non	46,7	Non	NR	NR	Non	Non	Non
18	M	15		TIII	T others	T others	Non	15	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PAX5
19	M	6		TI	SIL-TAL	SIL-TAL	Non	61	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
20	M	8		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	3,7	Non	Neg	Neg	Non	Non	TBL1XR1, VPREB1
21	M	2		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
22	F	3		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	13	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
23	M	10		TIII	HOX11	HOX11	Non	14	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, RB1
24	M	2		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	59	Oui	Neg	Neg	Non	Non	Non
25	M	2		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,7	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
26	F	6		LLB	B others	B others	Non	7,4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
27	F	3		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,2	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
28	M	19		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
29	F	6		BII	B others	Ph like	Non	5,3	Non	Neg	NR	Non	Non	CDKN2A/B, PARI, PAX5, TOX
30	F	12		BIII	ECHEC	Ph like	Non	647	Oui	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, EBF1, PAX5, LEF1
31	M	5		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	5	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, BTG1, ETV6, TBL1XR1
32	M	19		TIII	T others	T others	Oui	43	Oui	NR	NR	Non	Non	Non
33	F	2		TIII	ECHEC	T others	Non	343	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, ETV6
34	M	8		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	8	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, NR3C2, VPREB1
35	M	3		BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3,4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
36	M	3		BIII	KMT2A	KMT2A	Oui	73,5	Non	Neg	Neg	Oui	Non	IKZF1, ELF1
37	M	14		BII	ECHEC	DelERG	Non	5,3	Non	Neg	Neg	Non	Non	ERG, TBL1XR1, VPREB1, LEF1
38	F	2		BII	B others	B others	Non	39	Non	Neg	Neg	Non	Non	ETV6, NR3C2, VPREB1
39	F	5		BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	7,1	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, PAX5, ETV6

Patient	Sexe	Age diag	EGIL	Classification avant Cytoscan	Classification après Cytoscan	Atteinte SNC	GB	Corticorésistance	MRD1	MRD2	Rechute	Décès	Délétions récurrentes
40	M	8	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	51	Oui	Neg	Neg	Non	Non	VPREB1, TCF3
41	M	0	BI	KMT2A	KMT2A	Non	977	Oui	Pos	Pos	Oui	Oui	CDKN2A/B, PAX5, ERG, PTEN
42	F	7	BII	B others	DelERG	Non	9	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
43	F	12	BII	ECHEC	Hyperdiploïde	Non	4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	BTG1, VPREB1
44	F	4	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	6	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, TCF3
45	M	15	BIII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	10	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
46	M	16	TIII	ECHEC	T others	Non	8	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
47	M	23	BII	B others	Ph like	Non	NR	NR	Neg	NR	NR	NR	IKZF1, EBF1, VPREB1
48	F	6	BI	B others	B others	Non	2,6	Inévaluable	Neg	NR	Non	Non	IKZF1
49	M	3	TII/III	T others	SIL-TAL	Non	355	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
50	F	6	BII	IGH	IGH	Non	154	Oui	Neg	NR	Non	Non	IKZF1
51	M	3	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	9,6	Non	Neg	Neg	Non	Non	Gain MYB
52	M	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	15	Non	Neg	Neg	Non	Non	TCF3
53	F	2	BII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	10	Non	Neg	Neg	Non	Non	TCF3
54	F	4	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	7	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, ETV6
55	F	20	TIV	HOX11L2	HOX11L2	Non	66	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PHF6, SH2B3
56	M	3	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	8,2	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
57	F	12	TIII	T others	T others	Non	56	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
58	F	5	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
59	F	8	BIII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	9,8	Non	Neg	Neg	Non	Non	TCF3, PHF6
60	M	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	4	Non	Neg	Neg	Non	Non	VPREB1
61	M	14	BIII	iamp21	iamp21	Oui	2,9	Inévaluable	Pos	Neg	Oui	Non	IKZF1, CDKN2A/B, VPREB1
62	M	3	BII	B others	B others	Non	2,6	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
63	M	14	BII	BCR-ABL1	BCR-ABL1	Oui	5,14	Non	NR	NR	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, PAX5
64	M	3	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	4,7	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
65	M	8	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	32	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
66	F	13	BII	BCR-ABL1	BCR-ABL1	Non	134	Oui	Pos	Neg	Non	Non	Non
67	M	14	BII	B others	DelERG	Non	35	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, ERG
68	F	2	BIII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	45	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
69	F	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	6,4	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
70	F	5	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	17	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
71	M	12	BII	B others	iamp21	Non	2	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	ETV6, RB1
72	M	5	BII	iamp21	iamp21	Non	18	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
73	M	1	BII	B others	Hyperdiploïde	Non	111	Oui	Neg	Neg	Non	Non	Non
74	M	6	BI	ECHEC	B others	Non	38	Oui	Pos	Pos	Non	Non	ETV6
75	F	7	BII	B others	DelERG	Non	5	Non	Neg	Neg	Non	Non	ERG, NR3C1
76	F	28	BI	B others	B others	Non	10	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1
77	M	20	BIII	ECHEC	B others	Non	3	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
78	M	14	BII	iamp21	iamp21	Oui	3,5	Non	Neg	NR	Non	Non	RB1
79	M	16	BI	KMT2A	KMT2A	Non	211	Oui	Neg	Pos	Non	Non	Non
80	F	5	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	3	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, ETV6, VPREB1

Patient	Sexe	Age diag	EGIL	Classification avant Cytoscan	Classification après Cytoscan	Atteinte SNC	GB	Corticorésistance	MRD1	MRD2	Rechute	Décès	Déliétions récurrentes
81	M	10	BII	iamp21	iamp21	Oui	0,92	Inévaluable	Neg	NR	Non	Non	Non
82	M	6	BII	B others	B others	Non	115	Oui	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, BTG1, ETV6, VPREB1
83	M	14	TIII	T others	T others	Non	19	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
84	M	16	TIII	HOX11L2	HOX11L2	Non	8,6	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, Gain MYB
85	M	19	BI	B others	Ph like	Non	NR	Oui	Neg	Pos	Oui	Non	CDKN2A/B, PAX5
86	F	8	TIV	T others	T others	Non	4	Oui	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PAX5, RB1, Gain MYB, ELF1
87	M	18	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	2	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	BTG1, ETV6
88	F	11	BII	B others	B others	Non	7,2	Non	NR	NR	Non	Non	Non
89	F	7	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	5	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5,ETV6
90	M	16	BII	B others	B others	Non	1	Inévaluable	Neg	Neg	Oui	Non	CDKN2A/B,PAX5, VPREB1
91	F	3	B II	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	3	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
92	M	15	BII	B others	B others	Non	2,02	Non	Neg	Neg	Non	Non	PHF6
93	M	2	BIII	ECHEC	ECHEC	Non	29	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5
94	F	19	BII	B others	B others	Non	6,3	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B,PAX5, VPREB1
95	F	2	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	2	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	VPREB1
96	M	15	BII	B others	DelERG	Non	5,7	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, ERG, NR3C1, VPREB1
97	M	17	BII	ECHEC	B others	Non	23	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5
98	F	11	BII	iamp21	iamp21	Non	11,6	Non	Neg	Neg	Non	Non	ETV6
99	F	10	BII	KMT2A	DelERG	Oui	8,3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, ERG, NR3C1, TBL1XR1
100	M	4	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	33	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, ETV6, NR3C1
101	M	8	BIII	Tetraploïde	Tetraploïde	Non	3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
102	M	3	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	8	Non	Neg	Neg	Non	Non	TBL1XR1, ELF1
103	M	5	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	2	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
104	M	10	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	0,7	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	ETV6
105	F	17	BII	B others	B others	Non	4,4	Non	Neg	Neg	Non	Non	BTLA
106	F	15	BII	B others	B others	Non	3	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
107	F	15	TI	T others	T others	Non	38	NR	NR	NR	NR	Oui	CDKN2A/B,ETV6, RB1, ELF1
108	M	8	BII	B others	B others	Non	7	Non	Neg	Neg	Non	Non	TBL1XR1, TCF3
109	M	1	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	4,8	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
110	M	12	TIII	T others	T others	Non	12	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
111	F	4	TIII	HOX11L2	HOX11L2	Non	22	Non	NR	NR	Non	Non	CDKN2A/B
112	F	8	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	13	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
113	M	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	0,78	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
114	M	4	BI	KMT2A	KMT2A	Non	375	Non	NR	NR	Oui	Oui	PAX5, TCF3, ELF1
115	F	7	TIII	HOX11L2	HOX11L2	Non	38	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, Gain MYB
116	F	1	BI	KMT2A	KMT2A	Oui	347	Oui	NR	NR	Non	Non	Non
117	F	4	BII	B others	B others	Non	15	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, RB1, ELF1
118	M	4	BIII	ECHEC	Hyperdiploïde	Non	13	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
119	M	4	BIII	B others	B others	Non	37	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1,PAX5, ETV6
120	M	4	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	19,5	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, ETV6, VPREB1

Patient	Sexe	Age diag	EGIL	Classification avant Cytoscan	Classification après Cytoscan	Atteinte SNC	GB	Corticorésistance	MRD1	MRD2	Rechute	Décès	Délétions récurrentes
121	M	3	BII	iamp21	iamp21	Non	19,5	Non	Neg	Neg	Non	Non	PAX5, ETV6
122	F	7	TIII/IV	T others	T others	Oui	580	Oui	NR	NR	Oui	Oui	CDKN2A/B
123	M	5	TIII	HOX11	HOX11	Non	31	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
124	F	2	BII	B others	B others	Oui	16	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, ETV6
125	M	9	TIV	HOX11L2	HOX11L2	Non	33	Non	Pos	Pos	Oui	Non	IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, ETV6
126	F	5	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	6	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
127	F	1	BII	B others	B others	Oui	245	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, PAX5, ETV6
128	F	9	BIII	B others	B others	Non	12	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, PAX5, ELF1
129	F	8	BII	B others	iamp21	Non	18	Oui	Neg	Neg	Non	Non	ETV6, RB1, BTLA
130	F	1	BIV	KMT2A	KMT2A	Oui	740	Non	Neg	Pos	Oui	Oui	IKZF1, PAX5, VPREB1
131	F	4	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	3,8	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, PAX5, NR3C1, VPREB1
132	F	2	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	19	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
133	F	2	BIII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	6,8	Non	Neg	Neg	Non	Non	RB1
134	M	11	BIII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	5,2	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B, TCF3
135	F	19	BII	ECHEC	B others	Oui	1	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
136	F	2	BII	BCR-ABL1	BCR-ABL1	Oui	53	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, PAX5
137	M	17	BIII	B others	Hyperdiploïde	Non	4,5	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	ELF1
138	M	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	16	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
139	F	5	BIII	B others	Ph like	Oui	120	Non	Neg	Neg	Non	Non	CDKN2A/B
140	M	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	4,6	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	PTEN
141	M	3	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	25	Oui	Neg	Neg	Non	Non	Non
142	M	18	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	0,8	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
143	M	15	TII	T others	T others	Oui	13	Non	Neg	Neg	Non	Non	LEF1
144	M	8	BII	ETV6-RUNX1	ETV6-RUNX1	Non	99	Non	Neg	Neg	Non	Non	IKZF1, CDKN2A/B, ETV6
145	F	15	TIII	T others	T others	Oui	127	Oui	NR	NR	Non	Non	CDKN2A/B
146	F	4	BIII	TCF3-PBX1	TCF3-PBX1	Non	45	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non
147	M	3	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	5	Inévaluable	NR	NR	Non	Non	Non
148	F	2	BIII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	4	Inévaluable	Neg	Neg	Non	Non	Non
149	M	2	TII	T others	T others	Oui	12,3	Oui	NR	NR	Non	Non	ETV6
150	F	4	BII	ECHEC	B others	Non	8	Non	NR	NR	Non	Non	Non
151	F	4	BII	Hyperdiploïde	Hyperdiploïde	Non	12	Non	Neg	Neg	Non	Non	Non

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 2016/2017

Nom : DECOOL
Prénom : Gauthier

Titre du mémoire / thèse : Apport de la cytogénétique moléculaire dans la prise en charge des Leucémies Aiguës Lymphoblastiques de l'enfant et de l'adulte jeune

Mots-clés : Leucémies aiguës lymphoblastiques, *SNP-array*, Cytogénétique, Biologie moléculaire, LAL-B *others*, *Ph-like*

Résumé : Les Leucémies Aiguës Lymphoblastiques sont des pathologies malignes touchant particulièrement les enfants. Ces hémopathies comportent différentes entités pronostiques définies par la cytogénétique. Cependant, près d'un quart des LAL-B comportent des anomalies récurrentes qui demeurent indétectables par la cytogénétique conventionnelle et la biologie moléculaire. L'approche SNP-array est une technique d'étude pangénomique qui permet d'évaluer les anomalies du nombre de copies des gènes. Cette analyse a été effectuée sur 151 prélèvements médullaires au diagnostic de patients atteints de LAL. Ces patients, âgés de 1 à 28 ans, étaient issus des centres de Lille, Lyon et Marseille. Les résultats obtenus grâce à cette technique nous ont permis de mettre en évidence d'une part le faible taux d'échec lors de la détermination du caryotype (2/151 *versus* 22/151 par cytogénétique conventionnelle), et d'autre part la bonne concordance avec les résultats de biologie moléculaire (97% avec les délétions retrouvées en MLPA). De plus, de multiples microdélétions cryptiques de taille inférieure à 5Mb ont été observées alors qu'elles ne pouvaient pas l'être par cytogénétique conventionnelle. Les caryogrammes élaborés ainsi ont permis de visualiser les gènes les plus fréquemment impliqués dans ce type de pathologie. Les paysages génétiques retrouvaient une importante hétérogénéité des altérations additionnelles en fonction des classes OMS. Grâce au SNP-array, 15 patients en échec de classification ont pu être catégorisés, tandis que 14 patients initialement classés parmi les LAL-B *others* ont pu être reclassés au sein de trois grandes familles : amplification intrachromosomique du chromosome 21, délétion de *ERG* ou *Ph-like*. La détection de ces anomalies est primordiale dans la prise en charge des patients car elle permet d'utiliser le traitement le plus adapté afin d'obtenir de meilleurs résultats concernant la survie des patients. Désormais, au CHRU de Lille l'analyse SNP-array est ainsi effectuée au diagnostic chez tous les patients atteints de LAL en complément des analyses conventionnelles.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Aline Renneville, CHRU Lille
Assesseurs : Monsieur le Professeur Yves Bertrand, IHOP Lyon
Madame le Docteur Marina Lafage, AP-HM Marseille
Madame le Docteur Brigitte Nelken, CHRU Lille
Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme, CHRU Lille