

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

**Soutenu publiquement le 27 Juin 2017
Par Mme Elise FOURNIER**

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

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

**Etude du profil mutationnel des leucémies aiguës myéloïdes
du sujet âgé par séquençage haut débit : résultats de l'essai
ALFA-0701**

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Annabelle Dupont (CHRU Lille)

Assesseurs : Monsieur le Professeur Bruno Quesnel (CHRU Lille)

Monsieur le Professeur Nicolas Boissel (Hôpital Saint-Louis Paris)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Preudhomme Claude (CHRU Lille)



Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille



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

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 ASSOCIES - 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

AHU

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

Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques de Lille

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

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

Remerciements

A mon président de thèse :

Madame le Professeur Annabelle Dupont

Professeurs des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de présider cette thèse. Je vous remercie pour votre disponibilité en cette fin d'année universitaire. Soyez assurée de mon profond respect.

A mes juges :

Monsieur le Professeur Bruno Quesnel

Professeurs des Universités – Praticien Hospitalier
Service des Maladies de Sang
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et de l'intérêt que vous portez à ce travail. Veuillez trouver ici l'expression de mes sentiments les plus sincères.

Monsieur le Professeur Nicolas Boissel

Professeurs des Universités – Praticien Hospitalier
Service des Maladies du Sang
AP-HP, Hôpital Saint-Louis, Paris

Je tiens à vous remercier pour toute l'aide que vous avez apporté à ce projet, pour vos conseils avisés ainsi que pour votre disponibilité le soir, les week-ends et les jours fériés. Soyez assuré de ma profonde reconnaissance.

A mon directeur de thèse :

Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

Professeurs des Universités – Praticien Hospitalier
Chef de service du laboratoire d'Hématologie
Centre Hospitalier Universitaire de Lille

Pour m'avoir fait l'honneur et le plaisir de me confier ce travail. Je tiens à vous remercier chaleureusement pour tous vos conseils, votre bienveillance dans les moments de doute et votre humanité. Durant les deux années passées dans votre service, j'ai participé avec enthousiasme à tous ces beaux projets et j'espère bien continuer. Soyez assuré de mon profond respect.

Au laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille :

A tous les biologistes pour vos enseignements pendant les deux années passées au laboratoire. Je tiens plus particulièrement à remercier Alice et Nicolas pour tous leurs conseils et pour tous les bons moments.

A Maxime pour ce grand projet : une collaboration dans la joie et la bonne humeur et **à tous les ingénieurs du service** pour votre disponibilité et votre accompagnement dans tous les projets du laboratoire.

A tous les techniciens de biologie moléculaire : merci pour votre accueil si sympathique au sein du laboratoire et pour votre travail. Je tiens à remercier Anna pour les rapports urgents du vendredi soir.

A tous les techniciens d'hématologie cellulaire : je tiens à vous remercier pour tous les bons moments passés avec vous au PTI d'hématologie et en CMF. Vous avez énormément contribué à mon enthousiasme pour l'hématologie.

A mes amis :

A tous les internes de Lille et d'Amiens : ces cinq dernières années ont été un réel plaisir grâce à vous.

A tous mes amis du lycée, de la faculté, et à mon « ancienne coloc » : Merci pour tous les bons moments partagés. Un merci très particulier à Caroline et ses « oui » de dernière minute.

A Camille et Marie-Calixte : le trio de la faculté de pharmacie pour toujours.

A ma famille :

A mes parents : Je ne vous remercierai jamais assez. Vous êtes toujours là dans les bons moments comme dans les moins bons. MERCI

A Alexandre et Paul : ma nouvelle famille. Je vous remercie de prendre soin de mes deux sœurs et de moi par la même occasion.

A Marie et Lucie : Tellement de choses à dire à mes sœurs chéries ... merci d'être toujours là. Tout simplement : je vous aime très fort !

A Florian : Je remercie ton arrivée « accidentelle » dans le Grand Nord et notre rencontre. Merci pour tous les magnifiques moments passés avec toi et pour tous les prochains.

Liste des Abréviations

ADN = acide désoxyribonucléique

ALFA = acute leukemia french association

ARF = ADP ribosylation factor

ARN = acide ribonucléique

ASXL1 = additional sex comb like 1

ATRA = acide trans rétinoïque

BCOR = BCL6 corepressor

BCORL1 = BCL6 corepressor like 1

BOM = biopsie ostéo-médullaire

bp = paires de base

CALR = calréticuline

CBF = core binding factor

CBF β = core binding factor bêta

CD = clusters de différenciation

CEBPA sm = CCAAT / enhancer binding protein A simple mutant

CEBPA dm = CCAAT / enhancer binding protein A double mutants

CHIP = clonal hematopoiesis of indeterminate potential

CIVD = coagulation intra-vasculaire disséminée

CMF = cytométrie en flux

CSF3R = colony stimulating factor 3 receptor

CSH = cellules souches hématopoiétiques

CSL = cellules souches leucémiques

CTBP1 = C-terminal binding protein 1

DFS = disease free survival

DNMT3A = DNA méthyltransférase 3A

dNTPs = désoxyribonucléosides

EBS = ETS binding site

ECOG = eastern cooperative oncology group

EDTA = éthylène diamine tétraacétique

EFS = event free survival

ELN = european leukemia net

EPO = érythropoïétine

ERK = extracellular signal regulated kinase

ETV6 = ETS variant 6

EZH2 = enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2

FAB = French-American-British

FBXW7 = F-box and WD repeat domain containing 7

FISH = Fluorescent in situ hybridization

FLT3-ITD = Fms like tyrosine kinase 3 - internal tandem duplication

FLT3-TKD = Fms like tyrosine kinase 3 - tyrosine kinase domain

G/L = giga/libre

GDP= guanosine diphosphate

GO = gemtuzumab ozagamycin

GTP = guanosine triphosphate

Hb = Hémoglobine

HDAC = histone désacétylase

HEAT = motif huntingtine, facteur d'élongation eukaryote 2, la protéine phosphatase 2A, la kinase TOR1.

HLA = human leukocyte antigen

IDH = isocitrate déshydrogénase

IL = interleukine

JAK = Janus kinase

KIT = tyrosine protein kinase

KMT2A = lysine méthyl transferase 2A

LA = leucémie aiguë

LAIP = leukemia aberrant immunophenotype

LAL = leucémie aiguë lymphoïde

LAM = leucémie aiguë myéloïde
LAM-CN = leucémie aiguë myéloïde à caryotype normal
LLC = leucémie lymphoïde chronique
LMC = leucémie myéloïde chronique
LMMC = leucémie myélomonocytaire chronique
LMMJ = leucémie myélomonocytaire juvénile
MAPK = mitogen activated protein kinase
MECOM = MDS1 and EVI1 complex locus
MFP = myélofibrose primitive
MKL1 = megakaryoblastic leukemia 1
MGG = May-Grünwald-Giemsa
MPO = myélopéroxydase
MLLT3 = mixed-lineage leukemia translocated 3
MRD = minimal residual disease
MYH11 = chaîne lourde de la myosine 11
NAF = fluorure de sodium
NASDA = estérases non spécifiques
NCID = notch intracellular domain
NGS = next generation sequencing
NK = natural killer
NLS = nuclear localization sequence
NPM1 = nucléophosmine 1
OMS = organisation mondiale de la santé
OS = overall survival
PBS = phosphate buffered-saline
PCR = polymerase chain reaction
PHF6 = PHD finger protein 6
PI3K = phosphatidylinositol -3 kinase
PML = promyelocytic leukemia

PP2A = protéine phosphatase de type 2A
PRC2 = polycomb repressive complex 2
PTEN = phosphatase and tensin homolog
PTPN11 = protein tyrosine standard phosphatase non receptor 11
PV = polyglobulie de Vaquez
qRT-PCR = quantitative real time polymerase chain reaction
RARA = récepteur à l'acide rétinoïque A
RBM15 = RNA binding protein 15
RC = rémission complète
RFS = relapse free survival
RHD = runt homology domain
RIT1 = ras like without CAAX1
RUNX1 = runt related transcription factor 1
SCF = stem cell factor
SETBP1 = SET binding protein 1
SF3B1 = splicing factor 3b subunit 1
SMC1A = structural maintenance of chromosomes 1A
SMC3 = structural maintenance of chromosomes 3
SMD = syndrome myélodysplasique
SMP = syndrome myéloprolifératif
SNP = single nucleotide polymorphism
SOCS = suppressor of cytokine signaling
SRSF2 = serine and arginine splicing factor 2
STAG2 = stromal antigen 2
STAT5 = signal transducer and activator of transcription 5
TAD = transactivation domain
TE = thrombocytémie essentielle
TET2 = ten eleven translocation
t-AML = therapy related acute myeloid leukemia

TP53 = tumor protein 53

U2AF1 = U2 small nuclear RNA auxiliary factor 1

UPD = disomie uniparentale

VAF = variant allele frequency

WT1 = wilms tumor 1

ZRSR2 = zing finger CCCH – type, RNA binding motif and serine/arginine rich 1

Table des matières

I Les leucémies aiguës myéloïdes : introduction.....	20
A Généralités.....	20
B Epidémiologie.....	20
C Etiologie.....	20
D Présentation clinique.....	21
1) Signes liés à l'insuffisance médullaire.....	21
2) Signes liés au syndrome tumoral.....	21
E Présentation biologique.....	22
1) L'hémogramme.....	22
2) Le myélogramme.....	22
F Classification des LAM.....	26
1) Classification FAB.....	26
2) Classification OMS 2016.....	27
G Facteurs pronostiques.....	30
1) Les facteurs pronostiques liés aux patients.....	30
2) Les facteurs pronostiques liés à la pathologie.....	31
II Le traitement des LAM.....	34
A Chez le sujet jeune.....	34
1) La chimiothérapie d'induction.....	34
2) Le traitement post rémission.....	35
3) Thérapies ciblées.....	35
B Chez le sujet âgé.....	36
C Dans les LAM réfractaires ou en rechutes.....	37
III Hématopoïèse et leucémogénèse.....	37
A Hématopoïèse.....	37

B La leucémogénèse.....	38
C NPM1.....	40
D Les mutations de classe I	42
1) <i>FLT3</i>	42
2) <i>KIT</i>	43
3) <i>RAS</i>	43
4) <i>PTPN11</i>	44
5) <i>JAK2 et JAK3</i>	44
6) Autres gènes.....	45
E Les mutations de classe II.....	46
1) <i>CEBPA</i>	46
2) <i>RUNX1</i>	47
3) <i>GATA1 et GATA2</i>	48
4) <i>ETV6</i>	48
5) Autres gènes.....	49
F La régulation épigénétique.....	49
1) <i>DNMT3A</i>	49
2) <i>TET2</i>	50
3) <i>IDH</i>	50
4) <i>EZH2</i>	51
5) <i>ASXL1</i>	51
6) <i>BCOR et BCORL1</i>	51
G Les gènes suppresseurs de tumeur.....	52
1) <i>TP53</i>	52
2) <i>WT1</i>	53
3) Autres gènes.....	53
H Le complexe de la cohésine	53

I Le splicéosome	55
1) <i>U2AF1</i>	55
2) <i>SRSF2</i>	55
3) <i>SF3B1</i>	56
4) <i>ZRSR2</i>	56
J Autres	56
IV Objectifs	57
V Matériels et Méthodes.....	57
A Patients : essai ALFA-0701	57
B Isolement cellulaire et extraction de l'ADN	58
C Séquençage haut débit (NGS)	59
1) Préparation de la librairie haloplex (Agilent®)	59
2) Préparation de la matrice de séquençage (amplification clonale).....	61
3) Séquençage par synthèse (SBS).....	62
4) Analyse des données	63
D Panel mutationnel.....	63
E Analyse des variants détectés.	65
F Statistiques	66
VI Résultats.....	66
A Patients inclus	66
B Fréquence des mutations.....	67
1) Sur la cohorte globale.....	67
2) Dans les LAM-CN	73
3) En fonction du groupe cytogénétique.....	75
C Analyse des VAFs.....	79
D Corrélations entre les mutations	79
E Données générales de survie	81

1) Suivi médian	81
2) Impact sur la mise en RC	81
3) RFS	83
4) Survie globale	88
VII Discussion.....	93
A Performance du séquençage NGS.....	94
B Incidence des mutations	94
C Corrélations biologiques	95
D Données générales de survie.....	95
E Etude de l'évolution clonale.....	96
F Optimisation thérapeutique.....	97
VIII Conclusion et perspective	98
Bibliographie	99

I Les leucémies aiguës myéloïdes : introduction

A Généralités

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par une prolifération incontrôlée de cellules myéloïdes immatures (appelées blastes), ayant perdu leur capacité à se différencier. Cette accumulation de cellules est à l'origine d'une hématopoïèse inefficace et d'une insuffisance médullaire.

Le caractère aigu de cette pathologie est défini par le potentiel évolutif rapide des symptômes et des signes biologiques. En l'absence de traitement efficace, la LAM cause des dommages viscéraux irréversibles et létaux (médiane de survie 11-20 semaines).

B Epidémiologie

La leucémie aiguë (LA) représente moins de 3% de tous les cancers mais elle est l'un des plus mortels. Le taux de survie à 5 ans des patients qui reçoivent une chimiothérapie est de 30% [1]. Avec une incidence de 3,4 pour 100 000 habitants aux Etats-Unis, la LAM représente environ 25% de toutes les leucémies de l'adulte. Elle touche préférentiellement les hommes (ratio 4,6 versus 3 pour 100 000 habitants) et les sujets âgés. Elle est cependant également retrouvée chez les enfants en très bas âge (<6mois). L'âge médian au diagnostic est de 65 ans. Les LAM étaient rarement diagnostiquées avant l'âge de 40 ans mais l'incidence augmente de nos jours.

En France, l'incidence de nouveaux cas a été estimée à 4 à 5/100 000 habitants par an.

C Etiologie

Le développement des LAM est associé à de nombreux facteurs de risques [2]:

- Les antécédents personnels tels que l'âge. En effet, l'instabilité génétique et le défaut de réparation des anomalies sont majorés avec l'âge, on parle de vieillissement des cellules souches. On retrouve également les antécédents de pathologie hématologique (secondaires aux syndromes myéloprolifératifs (SMP) : la leucémie myéloïde chronique (LMC), la myélofibrose primitive (MFP), la polyglobulie de Vaquez (PV), la thrombocytémie essentielle (TE) et également secondaires aux syndromes myélodysplasiques (SMD))
- Les facteurs génétiques constitutionnels favorisant l'instabilité génétique : on retrouve notamment les anomalies chromosomiques (le Down syndrome ou trisomie 21, syndrome du klinefelter...), les aplasies médullaires (l'anémie de Fanconi,

l'érythroblastopénie de Blackfan-Diamond), le syndrome de Li-Fraumeni, la neurofibromatose de type I.

- L'exposition antérieure à des composés physiques et chimiques tels que le benzène, les pesticides, les herbicides ainsi que l'exposition à des radiations ionisantes.
- L'exposition à des agents anti-cancéreux et notamment les agents alkylants, les inhibiteurs de topoisomérase II, les anthracyclines et les taxoïdes. Les LAM secondaires aux agents alkylants sont associées à des anomalies cytogénétiques défavorables (monosomie 7 et 5) alors que les LAM secondaires aux inhibiteurs de topoisomérase II sont principalement associées à des anomalies équilibrées telles que inv(16)/t(16;16), t(15;17) ou des réarrangements de *KMT2A* [3].

D Présentation clinique

La symptomatologie des LAM est dominée par des signes d'insuffisance médullaire et par un syndrome tumoral. Le tableau clinique est peu spécifique de la maladie et très variable (forme peu symptomatique ou grave nécessitant une hospitalisation).

1) Signes liés à l'insuffisance médullaire

On distingue trois tableaux en fonction des cytopénies sanguines :

- L'atteinte de la lignée érythroblastique entraîne un syndrome anémique. Il est d'installation rapide et souvent mal toléré. On le caractérise par une pâleur cutanéomuqueuse, une asthénie, une dyspnée et des vertiges.
- L'atteinte de la lignée granulocytaire entraîne une neutropénie voire une agranulocytose (définie par un taux de polynucléaires neutrophiles < 0.5 G/L). Elle est responsable d'une susceptibilité accrue aux infections. On retrouve classiquement un syndrome pseudo-grippal (asthénie, fièvre, perte d'appétit et de poids) et des infections fréquentes ou persistantes après la mise sous antibiothérapie (sphère ORL, sepsis).
- L'atteinte de la lignée mégacaryocytaire est à l'origine d'une thrombopénie plus ou moins sévère et d'un syndrome hémorragique cutanéomuqueux. Cette symptomatologie peut être aggravée en cas de coagulation intra-vasculaire disséminée (CIVD).

2) Signes liés au syndrome tumoral

La prolifération incontrôlée des blastes entraîne une accumulation et une hypertrophie des organes hématopoïétiques secondaires : hépatomégalie et splénomégalie. En revanche, les adénopathies sont rarement retrouvées dans les LAM. Les cellules immatures peuvent s'accumuler dans des localisations particulières, notamment on retrouve une localisation cutanée sous forme de leucémides ou une infiltration gingivale dans les LAM5.

Un phénomène de leucostase peut être retrouvé au niveau pulmonaire et cérébral se traduisant au niveau clinique par une hypoxie avec parfois des signes de détresse respiratoire et des troubles de la conscience voire un coma et des convulsions.

E Présentation biologique

1) L'hémogramme

La numération sanguine révèle le plus souvent l'existence de cytopénie(s). Tout d'abord, on retrouve une anémie quasi constante (> 90% des cas) modérée à très sévère (Hb = 13 à 5 g/dL). Elle est dite arégénérative (réticulocytes < 120G/L), normochrome et normocytaire. Il est observé également une thrombopénie, parfois majeure (< 10 G/L) liée à une insuffisance de production et / ou à une consommation excessive (phénomène de CIVD). Enfin, la leucocytose est très variable : on peut observer soit une leucopénie (parfois franche < 1G/L), soit une hyperleucocytose (50-100 G/L).

La formule sanguine numérée sur un frottis sanguin coloré au May-Grünwald-Giemsa (MGG) peut détecter la présence de blastes circulants. Ce sont des cellules qui présentent un rapport nucléo-cytoplasmique élevé, une chromatine fine contenant parfois un ou plusieurs nucléoles et un cytoplasme basophile. La morphologie est variable en fonction du type de LAM (granulations, corps d'Auer). Le frottis permet de mettre en évidence une neutropénie ou une agranulocytose, un excès de granulocytes basophiles ou éosinophiles et une augmentation du taux de monocytes (caractéristique des LAM à composante monocyttaire).

2) Le myélogramme

a) Ponction médullaire

La ponction médullaire consiste à prélever par aspiration à la seringue la moelle osseuse. Elle peut être réalisée soit en sternal, soit en iliaque (chez les enfants ou en cas de contre-indication à la ponction sternale). Cet examen est indispensable au diagnostic de LAM.

Dans de rares cas, il est possible d'avoir recours à la biopsie ostéo-médullaire (BOM). Elle consiste en un prélèvement, à l'aide d'un trocart à biopsie, d'une carotte de moelle osseuse. Cet examen, plus invasif n'est réalisé que dans certains cas, notamment en cas de myélogramme non contributif.

b) Examen cytologique

Le myélogramme reste le seul examen permettant de poser avec certitude le diagnostic de LA et de la classer d'un point de vue morphologique selon la classification French-American British (FAB).

La moelle est régulièrement richement cellulaire, exceptée en cas de dilution par le sang ou en cas de myélofibrose (< 10 % des cas). L'alternative indispensable est alors une BOM.

L'examen cytologique présente une moelle le plus souvent pauvre en mégacaryocytes et contenant au moins 20% de blastes. Chaque lignée cellulaire sera analysée d'un point de vue quantitatif et qualitatif. En effet, afin de classer cette pathologie, il est nécessaire de mentionner la persistance de la lignée granulocytaire, la présence de dysplasies, de quantifier les érythroblastes, de définir le pourcentage de monocytes, et enfin de rechercher les éosinophiles morphologiquement anormaux.

c) Les réactions cytochimiques

Tout examen morphologique est complété par une analyse cytochimique des blastes permettant leur classification FAB.

Elle consiste en la recherche d'un composant ou d'une enzyme particulière à une lignée ou à un stade de différenciation. Il est possible de détecter tout d'abord la myéloperoxydase (MPO). Cette enzyme transforme le peroxyde d'hydrogène en acide hypochloreux. Elle caractérise les cellules myéloïdes granulocytaires mais également monocytaires (réaction plus faible). La positivité dans plus de 3% des blastes affirme la nature myéloïde de ces cellules. Cependant, cette activité reste négative dans la LAM0 et la LAM7. Dans un second temps, il est possible de réaliser la cytochimie des estérases. Il en existe différents types mais la réaction la plus utilisée en routine est la recherche d'estérases non spécifiques (ou NASDA). Ces enzymes hydrolysent le naphтол-ASD-acétate au sein des monoblastes (réaction très faible voire absente dans les myéloblastes). Ce phénomène est spécifiquement inhibé en présence de fluorure de sodium (NAF).

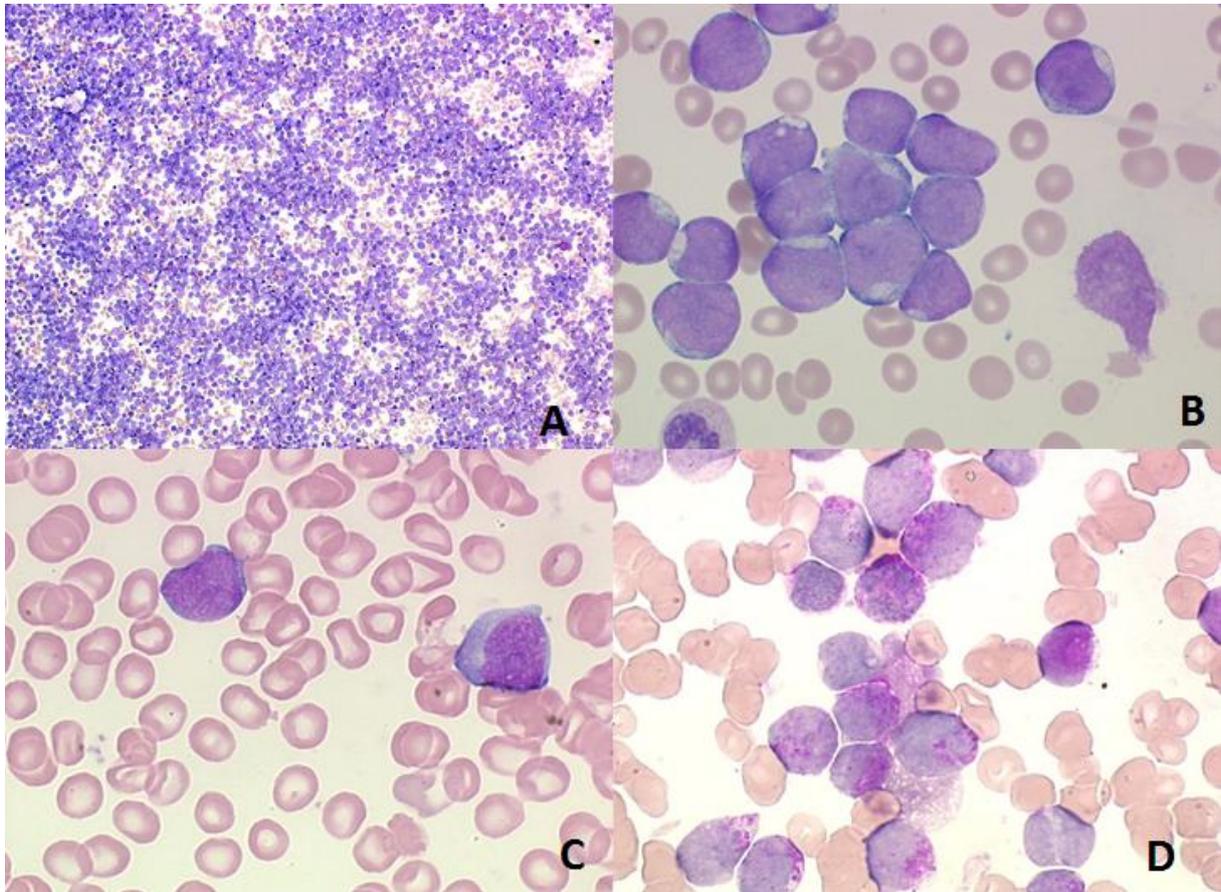


Figure 1 : Aspect cytologique de LAM (A) Myélogramme présentant un envahissement blastique. (B, C) Myéloblastes médullaires. (D) Cytochimie de la MPO. (Photographies du laboratoire d'hématologie du CHRU de Lille)

d) L'immunophénotypage

L'immunophénotypage consiste en l'étude par cytométrie en flux (CMF) de l'expression de divers antigènes de différenciation (membranaires ou intra-cytoplasmiques) des cellules sanguines ou de la moelle osseuse. Cet examen permet de différencier les LAM des leucémies aigües lymphoblastiques (LAL), de diagnostiquer les phénotypes mixtes et de confirmer le diagnostic de LAM (notamment certaine LAM indifférenciée : LAMO et rare : LAM7). Il met en évidence la présence de profils antigéniques particuliers : LAIP (leukemia aberrant immunophenotype) qui permettent le suivi de la pathologie par l'évaluation de la maladie résiduelle (MRD).

On recherche l'expression des antigènes spécifiques de certaines lignées cellulaires [4] :

- les marqueurs d'immaturation (HLA-DR, CD34, CD38)
- les marqueurs de la lignée myéloïde (MPO, CD11b, CD13, CD14, CD15, CD33, CD65, CD117)
- les marqueurs de la lignée lymphoïde B (CD10, CD19, CD20, CD22)

- les marqueurs de la lignée lymphoïde T (CD2, CD3, CD4, CD5, CD7)
- les marqueurs associés aux cellules NK (CD56)

D'autres marqueurs spécifiques peuvent être ajoutés au panel de base en cas de suspicion de LAM spécifique (par exemple le CD41, CD61 en cas de suspicion de LAM7).

e) La cytogénétique

Le caryotype des cellules blastiques préférentiellement médullaires corrobore au diagnostic et à la classification pronostique de ce groupe très hétérogène d'hémopathies. Dans 60% des LAM, de nombreuses anomalies cytogénétiques sont acquises et responsables de la leucémogénèse. On retrouve des anomalies de nombre (trisomie, monosomie...) ou de structure telles que les translocations, parfois spécifiques de certaines LAM (par exemple la t(15;17) dans les LAM3). Le caractère clonal d'une anomalie repose sur la présence de deux mitoses au moins présentant la même anomalie (gain chromosomique, anomalie de structure) et de trois mitoses présentant une même perte chromosomique. Cet examen est conforme si l'analyse est réalisée sur un minimum de 20 mitoses avant tout traitement mais ce nombre n'est plus recommandé en présence d'une anomalie.

La cytogénétique conventionnelle présente certaines limites techniques (par exemple, l'obtention de métaphase de mauvaise qualité ou l'impossibilité de détecter des anomalies de structure de taille < 5000 kb). Cela nécessite l'utilisation de techniques complémentaires comme la FISH (fluorescent *in situ* hybridization) ou la SNP-Array (single nucleotide polymorphism-Array).

Le principe technique du FISH repose sur l'utilisation d'une sonde contenant la séquence d'ADN à étudier, marquée chimiquement avec une molécule fluorescente. Les étapes d'hybridation et de lavages successifs sont suivies de la détection de la fluorescence par microscopie. Les sondes sont choisies en fonction de l'anomalie à rechercher : les sondes centrométriques, spécifiques de chaque chromosome, pour la détection des anomalies de nombre ou les sondes d'ADN pour la détection des anomalies de structure.

Enfin, l'utilisation de puce à ADN (SNP Array) permet la détection des variations du nombre de copies d'un gène (telles que les délétions et les amplifications) mais également les disomies uniparentales (UPD). Elle agit en complément à la cytogénétique conventionnelle car elle détecte des anomalies de quelques kilobases mais ne permet pas la détection des anomalies équilibrées [5].

f) La biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire prennent une place de plus en plus importante dans la stratégie diagnostique et surtout pronostique des hémopathies malignes. Environ 40% des LAM ont un caryotype normal, l'identification au diagnostic d'anomalies moléculaires (*FLT3-*

ITD, NPM1, CEBPA bi allélique) est indispensable à la stratification thérapeutique afin de proposer l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en première rémission complète (RC).

Ces altérations génétiques constituent également des marqueurs potentiels de suivi de la maladie résiduelle ou encore des cibles thérapeutiques médicamenteuses.

F Classification des LAM

1) Classification FAB

Proposée en 1976 puis révisée en 1985 par le French-American-British Cooperative Group, la classification FAB catégorise les LAM selon des critères cytologiques et cytochimiques (MPO et estérases) [6].

On recense 8 LAM (LAM0 à LAM7) décrite dans le tableau 1.

Type et sous type		Caractéristiques
LAM0	LAM avec différenciation minime	<ul style="list-style-type: none"> - >90% de blastes indifférenciés - MPO <3% - Phénotype myéloïde en CMF (MPO,CD13, CD33, CD117)
LAM1	LAM sans maturation	<ul style="list-style-type: none"> - > 90% de blastes avec ou sans granulations - MPO ≥3%
LAM2	LAM avec maturation	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 20% de blastes - Différenciation granulocytaires (>10%) +/- myelodysplasie - +/- corps d'Auer - MPO ≥3%
LAM3	LA promyélocytaire	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 20% de promyélocytes anormaux avec corps d'Auer en fagot - MPO ≥3%
LAM4	LA myélomonocytaire	<ul style="list-style-type: none"> - ≥ 20% de blastes myéloïdes + ≥20% de monocytes dystrophiques dans la moelle (ou 5G/L dans le sang) - MPO ≥3% (faiblement positive) ou < 3% - Estérases NASDA positives et inhibées par le NAF

LAM5		
- LAM 5a	LA monoblastique	- ≥ 80% de monoblastes
- LAM 5b	LA monocyttaire	- Monoblastes + maturation monocyttaire (promonocytes, monocytes)
LAM6	LA érythroïde	- ≥ 20% de myéloblastes - ≥ 50 % d'érythroblastes médullaire - Dysérythropoïèse - Phénotype : CD36
LAM7	LA mégacaryoblastique	- Mégacaryoblastes/ mégacaryocytes dystrophiques - Myélofibrose - Phénotype : CD42, CD61 et MPO négative

Depuis 2016, disparition de la LAM6 de la classification OMS [7]

Tableau 1 : Classification FAB et principales caractéristiques des LAM

2) Classification OMS 2016

La classification OMS élaborée en 2001 et révisée en 2008 et 2016 [7], intègre les caractéristiques cytogénétiques, moléculaires ainsi que les antécédents pathologiques et thérapeutiques des patients. Cette classification permet une catégorisation de plusieurs entités de LAM ayant une présentation clinique, une évolution et une réponse différente aux traitements. Elle a également abaissé à 20 le pourcentage de blastes médullaires nécessaires pour poser le diagnostic.

On retrouve 6 catégories de LAM caractérisées dans le tableau 2.

Catégorie	Type	Caractéristiques
LAM avec anomalies cytogénétiques récurrentes	<ul style="list-style-type: none"> -LAM avec t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> -LAM promyélocytaire avec t(15;17); <i>PML-RARA</i> -LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> -LAM avec t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-KMT2A (MLL)</i> 	<p>LAM de bon pronostic</p> <p>Pour ces trois entités, la simple présence de l'anomalie cytogénétique pose le diagnostic quelque soit le pourcentage de blastes au niveau médullaire</p>

	<p>-LAM avec t(6;9)(p23;q34) ; <i>DEK-NUP214</i></p> <p>-LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) ; <i>GATA2, MECOM</i></p> <p>-LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13) ; <i>RBM15-MKL1</i></p> <p>-LAM avec mutation <i>NPM1</i></p> <p>-LAM avec mutation bi allélique <i>CEBPA</i></p> <p>-Entités provisoires :</p> <ul style="list-style-type: none"> • LAM avec <i>BCR-ABL1</i> • LAM avec mutation <i>RUNX1</i> 	<p>Elle correspond à un repositionnement distal de l'enhancer de <i>GATA2</i> activant l'expression de <i>MECOM</i> et entraînant simultanément l'haploinsuffisance de <i>GATA2</i>.</p> <p>Différenciation difficile d'une crise blastique de LMC et une LAM de novo présentant le réarrangement <i>BCR-ABL1</i>.</p> <p>LAM non associée à des anomalies liées aux myélodysplasies et semble être de mauvais pronostic.</p> <p>La duplication de <i>FLT3</i> n'a pas été intégrée du fait de son association fréquente avec d'autres anomalies moléculaires.</p>
<p>LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies (25-30%)</p>	<p>-LAM secondaire à un SMD ou un SMD/SMP</p> <p>-anomalie(s) cytogénétique(s) de SMD</p>	<p>Dysplasie ≥ 50% sur au moins deux lignées myéloïdes.</p> <p>Absence de chimiothérapie et de radiothérapie antérieure.</p> <p>Touche préférentiellement le sujet âgé.</p> <p>Les anomalies cytogénétiques des SMD sont :</p>

	<ul style="list-style-type: none"> - Caryotype complexe (défini par la présence d'au moins 3 anomalies) - Anomalies déséquilibrées (monosomie 7 ou del(7q), monosomie 5 ou del(5q), i(17q) ou t(17p), del(13)q ou monosomie 13, del(11q), del(12p), del(9q), idic(X)(q13)) - Anomalies équilibrées (t(11;16) (q23.3;p13.3), t(1;3)(q26.2;q22.1), t(3;21)(p36.3;q21.2), t(2;11)(p21;q23.3), t(5;12)(q32;p13.2), t(5;7)(q32;q11.2), t(5;17)(q32;p13.2), t(5;10)(q32;q21.2), t(3;5)(q25.3;q35.1)).
Néoplasies myéloïdes post chimiothérapie (10-20%)	<p>-LAM-t ou un SMD-t</p> <p>LAM, SMD ou SMP/SMD</p> <p>Principalement, cela est du à l'administration préalable d'agents alkylants, des inhibiteurs de topoisomérases II et/ou de la radiothérapie pour une maladie néoplasique (90%) ou non (10%).</p>
LAM sans autre spécification par ailleurs (NOS) (25-30%)	<p>-LA myéloblastique avec différenciation minime</p> <p>-LA myéloblastique sans maturation</p> <p>-LA myéloblastique avec maturation</p> <p>-LA myélomonocytaire</p> <p>L'OMS propose de recourir aux critères cytologiques et cytochimiques de la classification FAB.</p>

	-LA monoblastique / monocytaire - LA érythroïde pure -LA mégacaryoblastique -LA myéloblastique à composante basophile -LA avec myélofibrose (panmyélose aigüe)	
Sarcome granulocytaire	-sarcomes myéloïdes <i>de novo</i> sans évidence de maladie médullaire	Tumeur myéloïde localisée dans un territoire extra médullaire
Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle (ou syndrome de Down)		Prolifération mégacaryoblastique Soit la prolifération est transitoire à la naissance et persiste quelques semaines, soit il s'agit d'une LAM. Blastose médullaire variable Mutation <i>GATA1</i> et de la voie JAK/STAT

Tableau 2 : Classification et caractéristiques principales des LAM selon l'OMS en 2016

G Facteurs pronostiques

Le pronostic des patients est très hétérogène. Cette diversité serait liée aux caractéristiques de chaque patient mais également aux profils cytogénétiques et moléculaires des LAM.

1) Les facteurs pronostiques liés aux patients

L'âge au diagnostic est un facteur indépendant de mauvais pronostic. Il est associé à une diminution des taux de RC, une diminution de la survie sans rechute (RFS) et de la survie globale (OS). De plus, les anomalies cytogénétiques de mauvais pronostic (caryotype complexe, caryotype monosomique) et le taux de mortalité secondaire aux traitements sont augmentés chez une personne âgée (>60 ans) [4].

Les co-morbidités (obésité...), les insuffisances multi-organes (rénale, hépatique, cardio-pulmonaire) et l'altération de l'état général (évaluée par l'échelle ECOG) sont également des facteurs de mauvais pronostic du fait de l'utilisation suboptimale des traitements.

2) Les facteurs pronostiques liés à la pathologie

a) Leucocytose au diagnostic

L'hyperleucocytose (>50G/L de leucocytes sanguins) au diagnostic est un facteur pronostique péjoratif. Elle entraîne un phénomène de leucostase cérébrale et pulmonaire. Les patients sont plus à risque de développer des hémorragies cérébrales, des défaillances respiratoires et des rechutes par envahissement neuro-méningé [8].

b) Le caractère secondaire

Dans les LAM secondaires (t-AML), le traitement de chimiothérapie est un facteur indépendant de mauvais pronostic [9]. La valeur pronostique des LAM secondaires à une myélodysplasie est encore discutée [10, 11].

Certaines hypothèses pourraient expliquer ce pronostic comme la persistance de la maladie primitive, les lésions d'organes liées aux traitements antérieurs, la diminution du pool de CSH, une immunodépression chronique et une inefficacité du support transfusionnel.

c) La cytogénétique

Au diagnostic d'une LAM, le caryotype conventionnel est le facteur pronostique indépendant le plus robuste de la prédiction de la réponse thérapeutique et du risque de rechute. Il a donc toute sa place dans l'adaptation de la stratégie thérapeutique au diagnostic et notamment l'indication d'une allogreffe de CSH en première RC. Les anomalies cytogénétiques retrouvées catégorisent les LAM en trois groupes distincts [12] : les LAM de bon pronostic qui regroupent les anomalies suivantes : t(15;17), t(8;21) et inv(16), les LAM de pronostic défavorable (caryotype complexe, monosomie 5, délétion 5q, monosomie 7, des anomalies 3q ou les anomalies 17p) et enfin les LAM de pronostic intermédiaire. Ce dernier groupe est composé des caryotypes normaux et des anomalies cytogénétiques ne correspondant pas aux deux autres groupes. Il est donc très hétérogène en terme de réponse aux traitements.

Certaines anomalies, telles que les délétions 7q et les t(6;9), sont considérées soit de risque intermédiaire soit de haut risque. Les LAM 11q23/*MLL* ont également un pronostic différent en fonction du partenaire : la t(9;11) appartient au groupe intermédiaire, la t(11;19) appartient soit au groupe intermédiaire, soit au groupe défavorable, enfin les autres LAM 11q23/*MLL* sont considérées de pronostic défavorable chez l'adulte.

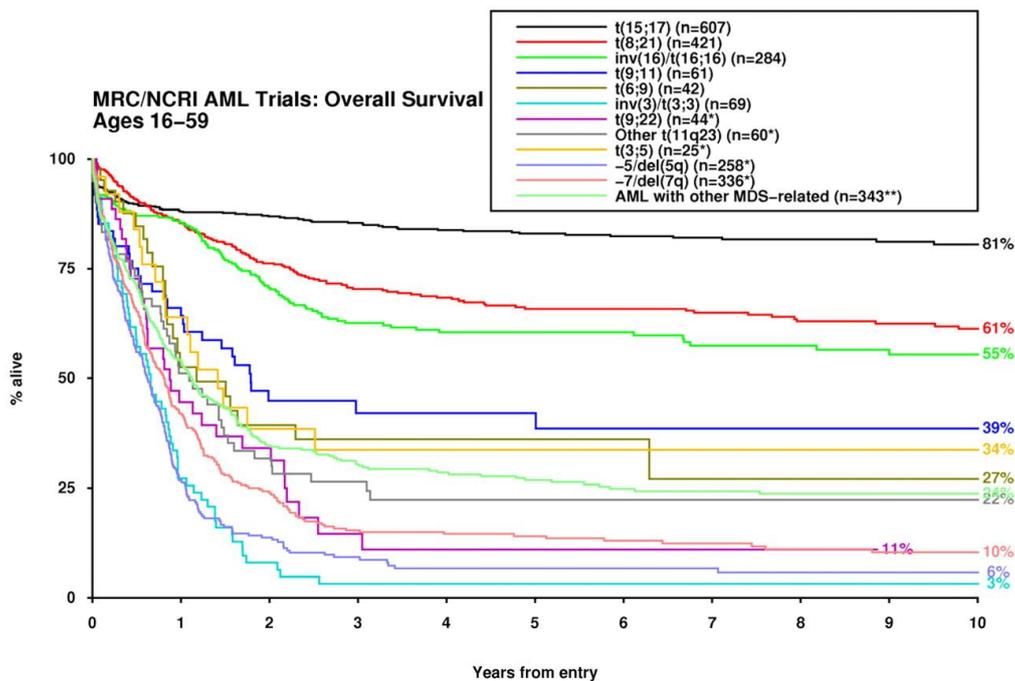


Figure 2 : Impact de la cytogénétique sur la survie globale des LAM [13]

Actuellement, il est noté que la présence d'un caryotype monosomique, c'est-à-dire la présence de deux monosomies autosomales ou d'une monosomie associée à des anomalies structurales, est une entité à part entière de pronostic défavorable [14].

d) La biologie moléculaire

Ces dernières années, la caractérisation moléculaire des LAM a été un grand succès, permettant ainsi une stratification pronostique moléculaire [15] notamment dans le vaste groupe très hétérogène des LAM à caryotype normal (LAM-CN) [16]. Afin d'homogénéiser les différentes études et d'intégrer les nouvelles données moléculaires et notamment le statut mutationnel de *NPM1*, *CEBPA*, et *FLT3-ITD* aux données cytogénétiques, un groupe d'expert a proposé une nouvelle classification pronostique (tableau 3).

Catégories	Anomalies génétiques
Favorable	<p>t(8;21)(q22;q22.1) : <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>inv(16)(p.13.1;q22) : <i>CBFB-MYH11</i></p> <p><i>NPM1</i> muté /<i>FLT3-ITD</i> non muté ou avec un faible ratio de mutation <i>FLT3-ITD</i>.</p> <p>Mutation-bi allélique de <i>CEBPA</i></p>
Intermédiaire	<i>NPM1</i> muté et un ratio élevé de la mutation <i>FLT3-ITD</i>

	<p><i>NPM1</i> non muté et aucune mutation de <i>FLT3-ITD</i> ou faible ratio de <i>FLT3-ITD</i> (sans anomalie génétique de mauvais pronostic additionnelle)</p> <p>t(9;11)(p.21.3;q23.3) : <i>MLL3-KMT2A</i></p> <p>Anomalies cytogénétiques non classées dans les groupes favorables et défavorables</p>
Défavorable	<p>t(6;9)(p23;q34.1) : <i>DEK-NUP214</i></p> <p>t(v;11q23.3) : <i>KMT2A</i> réarrangé</p> <p>t(9;22)(q34.1;q11.2) : <i>BCR-ABL1</i></p> <p>inv(3)(q21.3;q26.2) ou t(3;3)(q21.3;26.2) : <i>GATA2-MECOM</i></p> <p>monosomie 5 or del(5q); monosomie 7; monosomie 17/abn(17p)</p> <p>Caryotype complexe et monosomal</p> <p><i>NPM1</i> non muté et ratio de <i>FLT3-ITD</i> élevé</p> <p>Mutation de <i>RUNX1</i></p> <p>Mutation d'<i>ASXL1</i></p> <p>Mutation de <i>TP53</i></p>

Tableau 3 : Classification pronostique des LAM selon l'ELN [4]

De nouveaux travaux sont en cours afin de créer de nouveaux modèles statistiques à plusieurs niveaux pouvant prédire avec précision la probabilité de rémission, de rechute et de mortalité [17].

e) Evaluation de la MRD

En plus de ces facteurs pronostiques globaux, certains paramètres plus individualisés comme l'étude de la maladie résiduelle semble être prometteuse pour le suivi de la pathologie.

Elle est évaluée en pratique quotidienne par le pourcentage de blastes médullaires sur le myélogramme en sortie d'aplasie. Néanmoins, cet examen est peu sensible et parfois difficile à interpréter (moelle de richesse variable, blastes de régénération non pathogène). Deux types d'approches ont alors émergé : une évaluation soit par la CMF (cellulaire) par l'expression de LAIP par les blastes leucémiques, soit par une évaluation moléculaire selon différentes techniques (la qRT-PCR, la PCR digitale, le séquençage haut débit (NGS)). Ces deux approches permettent d'obtenir une sensibilité pouvant aller de 10^{-4} à 10^{-6} .

La quantification des différents marqueurs moléculaires : les transcrits de fusion chimériques (*PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*...), les mutations géniques (*NPM1*, *DNMT3A*, *IDH*, *FLT3-ITD*...), et la surexpression du gène *WT1* [18] permettraient ainsi une évaluation précoce et sensible de la réponse thérapeutique afin d'envisager une optimisation du traitement de consolidation. Une étude récente s'intéressant aux LAM *NPM1+* a mis en évidence que la MRD permet d'identifier les meilleurs candidats à l'allogreffe : seuls les patients n'ayant pas atteint une perte d'au moins 4 log en MRD-*NPM1* sur sang périphérique en post-induction bénéficient de l'allogreffe [19].

De nombreuses publications ont également souligné l'impact pronostique de la MRD précoce en terme de risque de rechute et de survie, indépendamment des facteurs pré-thérapeutiques et quelque soit le marqueur utilisé : transcrits de fusion CBF [20], surexpression de *WT1* [21], mutation de *NPM1* [22, 23].

II Le traitement des LAM

A l'heure actuelle, le traitement des LAM est encore uniforme malgré de nombreux progrès en biologie moléculaire qui pourront conduire par la suite à une thérapie personnalisée.

Le traitement est basé sur l'utilisation d'une chimiothérapie intensive administrée en différentes phases après vérification des désordres métaboliques et infectieux.

Dans les LAM hyperleucocytaires, le traitement peut être précédé d'une phase de réduction leucocytaire à l'aide d'un traitement myélofreinateur (hydroxyurée).

A Chez le sujet jeune

1) La chimiothérapie d'induction

La première phase du traitement consiste en une réduction tumorale afin d'obtenir une RC. Elle est définie par trois critères : une proportion de blastes médullaires inférieure à 5% des cellules nucléées et dont le cytoplasme ne contient pas de corps d'Auer, l'absence de localisation extra-hématologique de cellules immatures et une normalisation de l'hémogramme.

Elle associe deux drogues, un agent intercalant : les anthracyclines (plus fréquemment la daunorubicine ou l'idarubicine) pendant 3 jours et un analogue nucléosidique de la pyrimidine (la cytarabine) pendant 7 jours. Cette chimiothérapie est encore appelée : le protocole 3+7 [24]. La phase d'aplasie dure environ 4 semaines.

De nombreuses études randomisées essayent de mettre en place de nouveaux protocoles utilisant des doses supérieures d'anthracycline [25] ou de cytarabine [26], l'utilisation d'une forme liposomale [27] ou l'utilisation d'une troisième molécule. Malgré le retrait du marché du gemtuzumab ozagamicine (GO), un anticorps humanisé anti CD33 couplé à une toxine (chalichéamicine), par la FDA (Food and drug administration) qui révélait une mortalité

élevée et précoce lors des premières études, ce médicament a montré un bénéfice en chimiothérapie d'induction [28], chez les patients à risque favorable ou intermédiaire en présence de la mutation de *FLT3-ITD* [29]. L'utilisation d'analogues de purines (clofarabine [30]) semble renforcer la chimiothérapie d'induction des patients de plus de 50 ans et à caryotype défavorable.

Des spécificités sont retrouvées pour la LAM3 selon la classification FAB, l'induction doit comporter de l'acide tout trans-rétinoïque (ATRA) et du trioxyde d'arsenic (Trisenox®). Ce traitement peut être associée ou non à une anthracycline.

2) Le traitement post rémission

a) La chimiothérapie de consolidation

La deuxième étape du traitement consiste en une phase de consolidation de la rémission à l'aide de cures d'aracytine à dose élevée. Le schéma d'injection, le nombre de cycles et la dose varient en fonction de la catégorie des patients.

Dans la LAM3, cette phase comprend une ou plusieurs cures comportant l'association d'ATRA et de trioxyde d'arsenic pouvant être associées ou non à une anthracycline.

b) Allogreffe de CSH

L'allogreffe de CSH reste le meilleur moyen de prévenir les rechutes de LAM, cependant elle est associée à un risque élevé de morbidité et de mortalité liée au traitement, surtout chez les personnes âgées. C'est pourquoi, elle n'est pas envisagée chez tous les patients.

Pour les patients classés dans le groupe pronostic favorable selon l'ELN [4], l'allogreffe n'est pas envisagée en première intention [31]. Chez le sujet jeune (<50 ans) sans anomalie cytogénétique de bon pronostic, l'allogreffe de CSH par un donneur familial HLA identique doit être systématiquement discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire.

L'évaluation de la balance bénéfice-risque est obligatoire pour les autres catégories de LAM en fonction des critères ELN [4]. Cependant les avancées récentes dans l'allogreffe (conditionnement d'intensité diminué, différentes sources de CSH) peuvent permettre de reconsidérer son indication [32].

3) Thérapies ciblées

L'apport de la biologie moléculaire ces dernières années a permis de proposer des nouveaux traitements dits ciblés en première intention dans le traitement d'induction ou de consolidation ou en seconde intention en cas de rechute.

En effet, de nouvelles drogues sont proposées dans le traitement des LAM (figure 3). Elles ciblent de nombreux processus cellulaires comme la signalisation via les tyrosines kinases, l'épigénétique, l'apoptose ou ciblent certains antigènes exprimés par les CSH et plus

spécifiquement par les cellules souches leucémiques (CSL). Ce concept sera développé dans le paragraphe III.B.

Therapeutic target	Potentially sensitive genotypes	Inhibitor	Phase	Trial identifier number
Early phase				
Highly specific				
hDOT1L*	<i>MLL</i> rearranged	EPZ-5676	I	NCT01684510
IDH2	<i>IDH2</i> mutated	AG-221	I	NCT019115498
CDK6	<i>MLL</i> rearranged	Palbociclib	Ib/IIa	NCT02310243†
Broader specificity				
BET proteins*	<i>MLL</i> rearranged, <i>NPM1c</i> , other	OTX015 GSK525762	I I	NCT01713582 NCT01943851†
XPO1/CRM-1	<i>NPM1c</i> , other	KPT-330 (Selinexor)	I	NCT01607892
BCL-2*	<i>IDH2</i> mutated, other	venetoclax	II	NCT01994837
Risk adapted later phase				
FLT3*	<i>FLT3</i> mutated	Crenolanib Quizartinib Midostaurin	II II III	NCT01522469 NCT01236144 NCT00651261
C-KIT*	<i>C-KIT</i> mutated	Dasatinib	III	NCT02013648
CD33	CBF leukemia	Gemtuzumab ozogamicin (Mylotarg)	III	ISRCTN17161961†

Figure 3 : Exemples de nouveaux traitements dit ciblés utilisés dans les LAM [33]

a) Les inhibiteurs de *FLT3-ITD*

Les inhibiteurs de 1^{ère} génération (sunitinib, sorafenib) semblent peu spécifiques, présentent une toxicité et n'ont pas encore prouvé leur intérêt dans l'obtention d'une réponse stable et robuste [34, 35]. La midaustorine quant à elle vient d'obtenir l'indication dans le traitement des LAM porteurs de la mutation de *FLT3* par la FDA [36].

Les inhibiteurs de 2^{ème} génération (quizartinib, crenolanib) ont donc été développés afin d'améliorer leur spécificité.

Malheureusement, de nombreuses études montrent une sélection des mutants pour *FLT3* résistants à ces nouvelles drogues [37].

b) Les inhibiteurs d'*IDH 1 - IDH2*

Les inhibiteurs des enzymes *IDH1* et *2* mutés lèvent le blocage de maturation [38] et diminuent l'hyperméthylation de l'ADN [39]. Ces molécules sont en cours d'étude chez les patients atteints de LAM en première intention, en rechute ou réfractaire.

B Chez le sujet âgé

Le pronostic péjoratif des LAM du sujet âgé est lié à la pathologie mais également aux patients. L'état général, la présence de co-morbidités, et l'évaluation des dysfonctionnements des organes sont des critères à évaluer lors de la mise en place d'une chimiothérapie d'induction. En cas d'impossibilité de débiter cette chimiothérapie intensive, le traitement repose sur l'utilisation de cytarabine à faible dose. Il peut être également proposé aux patients deux agents déméthylants : la décitabine et l'azacitidine qui ont montré des résultats à moyen terme [40, 41].

C Dans les LAM réfractaires ou en rechutes

Le traitement est mal codifié. De nombreux critères (l'âge, la durée de la RC, les anomalies cytogénétiques et moléculaires) aident au choix du traitement à mettre en place. Ce traitement de rattrapage est nécessaire à la mise en RC avant d'envisager une allogreffe de CSH par les cliniciens. En cas d'impossibilité, les nouvelles thérapies peuvent être l'une des dernières alternatives avant d'envisager un soin de support.

III Hématopoïèse et leucémogénèse

A Hématopoïèse

Les différents éléments figurés du sang (les hématies, les globules blancs et les plaquettes) sont renouvelés en continu selon un processus physiologique régulé qu'on appelle l'hématopoïèse.

Le système hématopoïétique est organisé de façon hiérarchique avec au sommet les CSH (0.01 à 0.005 %) qui possèdent quatre propriétés fondamentales :

- L'auto renouvellement : capacité de se multiplier indéfiniment sans subir de différenciation. Cette propriété permet de maintenir un pool de cellules souches.
- La capacité de prolifération
- La multi potentialité : capacité à se différencier et à donner naissance à toutes les cellules de l'hématopoïèse.
- La capacité de différenciation

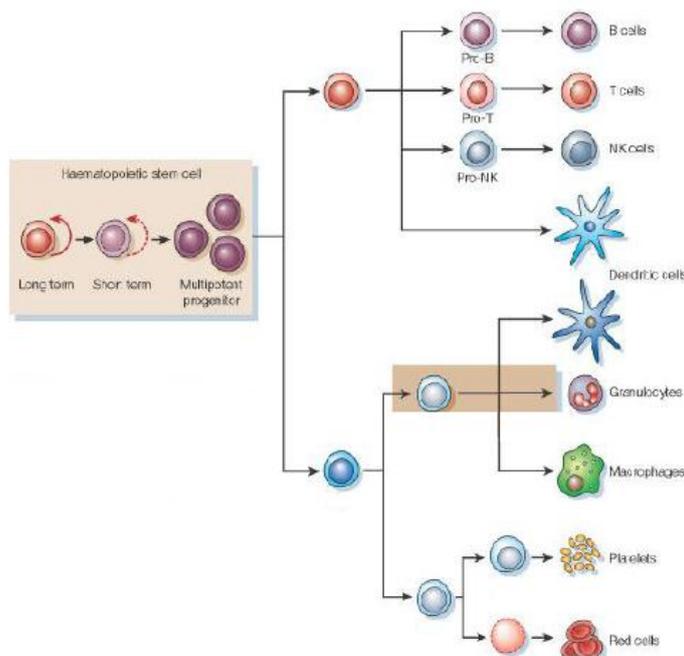


Figure 4 : représentation schématique de l'hématopoïèse [42].

La combinaison des nombreux facteurs de croissance, cytokines et facteurs de transcription régulant ce processus permet d'orienter la différenciation des CSH vers une lignée spécifique ou alors promouvoir plutôt l'auto-renouvellement, la prolifération, l'apoptose ou la survie [43].

La notion de niche hématopoïétique a pris toute sa place dans la régulation de ce processus. Les constituants de cet environnement (matrice extracellulaire, cellules stromales, ostéoblastes, adipocytes...) interagissent entre eux et avec les CSH afin de promouvoir le renouvellement, la prolifération ou la différenciation du pool de ces cellules [44].

B La leucémogénèse

La notion de cellules souches leucémiques (CSL) a été mise en évidence en 1994 [45]. Pour assurer sa transformation en CSL, la cellule hématopoïétique normale doit acquérir (ou conserver) des propriétés d'auto-renouvellement, voir ses propriétés de réponse aux signaux prolifératifs et antiprolifératifs modifiées, acquérir une résistance à l'apoptose et perdre ses capacités de différenciation. Il s'agit d'un phénomène multi-étape qui résulte de l'accumulation de multiples anomalies génétiques acquises : des translocations équilibrées, des mutations somatiques, une altération du nombre de copie de gènes mais également une hétérogénéité de l'expression génique [46] et du profil de méthylation de l'ADN [47].

Les mutations somatiques sont retrouvées dans un grand nombre de cancers et dans les hémopathies. Elles sont cependant moins nombreuses dans les LAM que dans les autres cancers [48]. Certaines mutations confèrent un avantage prolifératif à la cellule : elles sont

appelées « driver », d'autres au contraire ne possédant pas cet effet sont dites « passager » [48]. Cependant, cette classification binaire est dépendante également du contexte [49].

Récemment, les mutations fréquemment rencontrées dans les LAM ont été classées en huit catégories fonctionnelles principales [50].

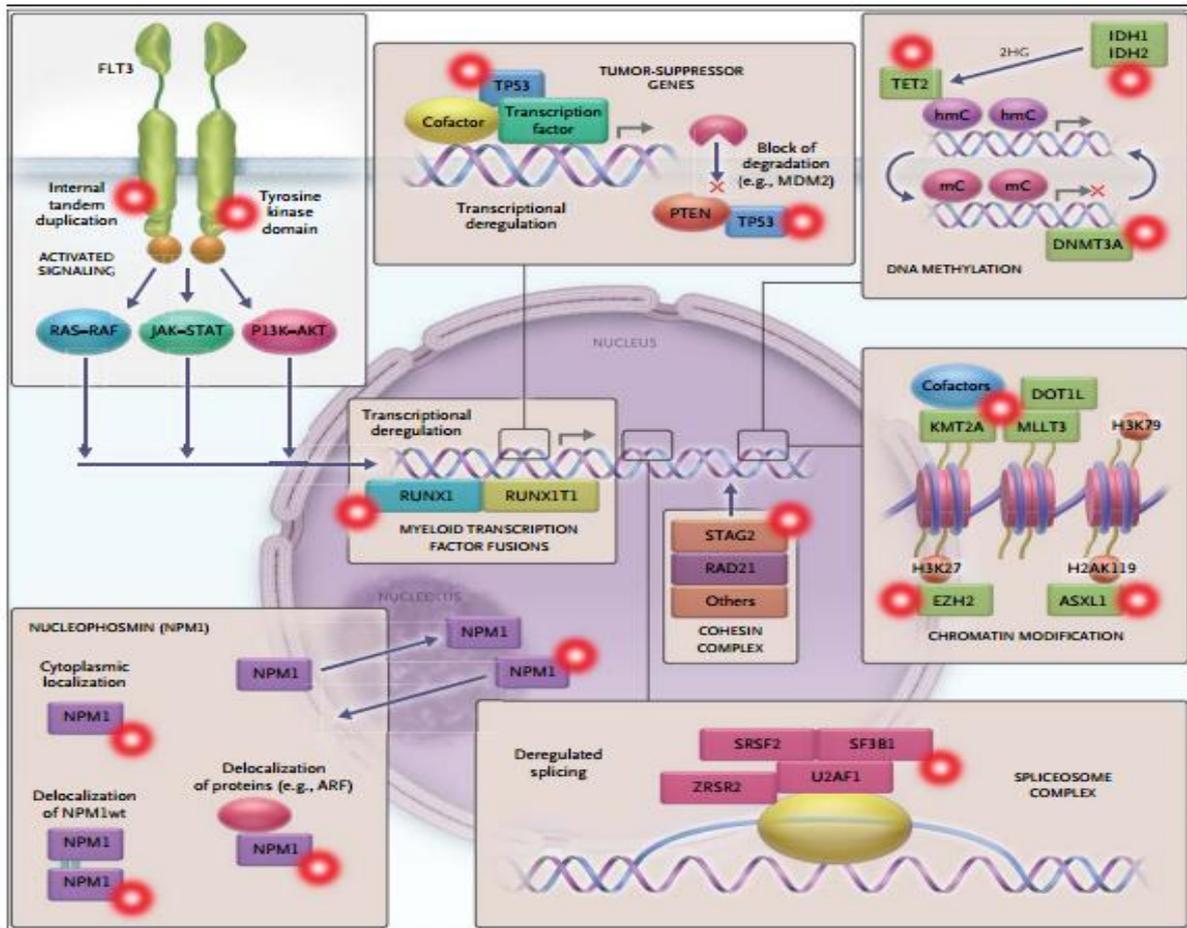


Figure 5 : Représentation schématique des 8 classes d'altérations génétiques responsables du phénomène de leucémogénèse [50]

Tout d'abord, les mutations de classe I confèrent un avantage prolifératif et/ou de survie du progéniteur. Parmi ces anomalies, on retrouve des mutations des récepteurs tyrosine kinase (*FLT3* ou *c-KIT*) ou les mutations de protéines de voie de signalisation telles que *RAS*. Les mutations de classe II quant à elles entraînent un blocage de la différenciation myéloïde. Il s'agit de modification de l'expression ou de l'activité de facteurs de transcription tels que *RUNX1* et *CEBPA*.

Ensuite, il a été classé isolément la mutation de la protéine chaperonne *NPM1* et les mutations entraînant un dérèglement des protéines intervenant dans la régulation épigénétique : soit au niveau de la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1* et *2*), soit par modification de la structure de la chromatine en agissant sur les histones (*ASXL1*, *EZH2*, *KMT2A*, *BCOR*, *BCORL1*).

Enfin, on retrouve également des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs (*TP53*, *WT1*, *PTEN*), dans les gènes du splicéosome (*SRSF2*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *SF3B1*) dont les protéines sont nécessaires à la formation du complexe d'épissage et dans les gènes de la cohésine (*STAG2*, *RAD21*, *NIPBL*, *SMC1A*, *SMC3*) dont le rôle principal est de maintenir la cohésion entre les chromatides sœurs lors de la division mitotique.

Au diagnostic, les LAM présentent une grande hétérogénéité clonale, elles possèdent un voire plusieurs clones pathologiques [48, 51]. L'architecture clonale et l'ordre d'apparition des mutations peuvent être déduites par les fractions de l'allèle variant (ou VAF) lors d'un séquençage haut débit [52, 53].

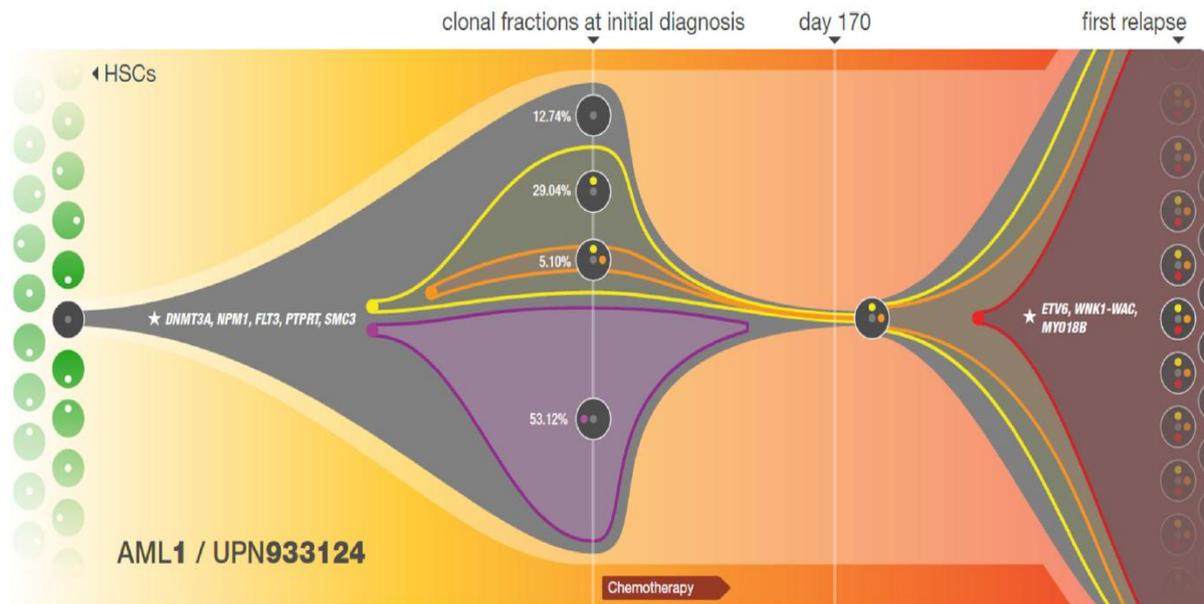


Figure 6 : Représentation de l'hétérogénéité clonale des LAM [51]

Les rechutes peuvent avoir deux origines : soit le clone majoritaire au diagnostic qui a subi de nouvelles mutations, soit un sous clone résistant à la chimiothérapie initiale qui a émergé suite à l'acquisition de mutations additionnelles.

Enfin, le séquençage à haut débit a permis de mettre en évidence l'existence de cellules souches préleucémiques (CHIP). Les mutations touchant les gènes de la régulation épigénétique tels que *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* et *IDH2* apparaissent très précocement avant même le développement d'une LAM, remettant en question le rôle de ces mutations dans le développement de la pathologie [54, 55].

C NPM1

NPM1 (nucléophosmine 1) est une phosphoprotéine nucléolaire, ubiquitaire qui permet le transport entre le nucléole et le cytoplasme [56]. Elle est traduite du gène *NPM1* localisé sur le chromosome 5 (position 5q23). Elle intervient dans la biogénèse des ribosomes [56], le

transport des histones, les mécanismes de réparation de l'ADN, la duplication du centrosome [57], et sur la voie de régulation TP53/ARF [58, 59].

Les LAM mutées pour *NPM1* sont des entités distinctes des autres LAM et sont les plus fréquemment rencontrées (30% des LAM et 50% des LAM-CN). Les mutations sont principalement retrouvées dans l'exon 11 : insertion de 4 bases entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'un codon stop. Les mutations sont hétérozygotes et entraînent la synthèse de 3 variants majoritaires : la mutation de type A (duplication TCTG) est retrouvée dans 70-80% des cas, suivie par la mutation de type B (insertion de CATG) et la mutation de type D (insertion de CCTG). La localisation cytoplasmique aberrante de la protéine *NPM1* mutée interfère dans ses fonctions biologiques et est responsable du phénomène d'oncogenèse [60].

Les LAM possédant une mutation pour *NPM1* sont très hétérogènes sur le plan clinique du fait de la forte prévalence d'autres mutations : au niveau des gènes de la régulation épigénétique (75%) tels que *DNMT3A* (50%), *TET2* (15%), *IDH1* et *IDH2R140* (15%), avec les mutations de *FLT3-ITD* (40%) et de *NRAS* (20%), et au niveau des gènes du complexe de la cohésine (20%). La valeur pronostique de la mutation de *NPM1* est donc dépendante des autres mutations (tableau 4).

Mutations	Valeur pronostique
<i>NPM1 seule</i>	Bon pronostic en terme d'EFS et d'OS [61, 62]
<i>NPM1/FLT3-ITD</i>	Mauvais pronostic en terme d'EFS et d'OS [62]
<i>NPM1/FLT3-ITD/DNMT3A</i>	Mauvaise survie globale [63]
<i>NPM1/DNMT3A</i>	<u>Les résultats sont controversés</u> Mauvaise survie globale [64] ou sans impact pronostique [63]
<i>NPM1/NRAS</i>	Aucun impact pronostique en terme d'OS, d'EFS et de DFS [65] Si mutation G12/G13 : meilleure survie globale [63]
<i>NPM1/TET2</i>	<u>Les résultats sont controversés</u> Mauvais pronostic en terme de mise en RC, d'EFS, de DFS et d'OS [66] Ou sans impact pronostique [64]

NPM1/IDH

IDH1 et IDH2R140

Les résultats sont controversés : les mutations sont de mauvais [67] ou de bon pronostic [68] en terme d'OS.

Tableau 4 : Valeurs pronostiques de la mutation de *NPM1* en fonction de l'association à d'autres mutations.

Ces mutations sont dites stables et persistent fréquemment à la rechute, c'est pourquoi elles sont utilisées comme marqueur de suivi de la MRD [22].

D Les mutations de classe I

1) FLT3

Le gène de *FLT3* (Fms tyrosine kinase 3) est présent sur le chromosome 13. Il code pour une protéine membranaire de 993 AA [69] (récepteur à activité tyrosine kinase de classe III), exprimée au sein des CSH. Sa stimulation diminue l'apoptose et active la prolifération des cellules via la voie de signalisation JAK/STAT5 [70].

Les mutations activatrices de cette protéine sont retrouvées dans de nombreuses hémopathies : les LAM (30%), les SMD et plus rarement dans les LAL. Deux types de mutations entraînant une activation constitutive de la protéine sont recensées : soit une duplication en tandem de taille très variable (9bp à >150 bp) (*FLT3-ITD*) dans le domaine juxta membranaire (exons 14-15) [69], soit une mutation ponctuelle (*FLT3-TKD*) dans le domaine tyrosine kinase (exon 20) affectant l'acide aminé D835 et I836 [71].

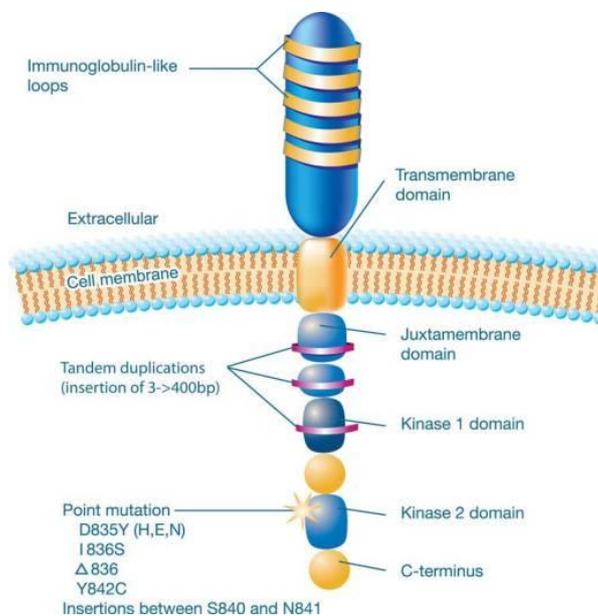


Figure 7 : Représentation schématique du récepteur FLT3 [72]

Les mutations *FLT3-ITD* sont fréquemment associées aux LAM-CN, aux LAM-CN mutées pour *NPM1*, aux LAM3 [73]. Elles sont sous clonales et de mauvais pronostic [74] en terme de DFS et d'OS [68]. De plus ces mutations sont instables : elles apparaissent ou disparaissent fréquemment lors des rechutes.

Les mutations *FLT3-TKD* sont quant à elles associées aux LAM avec inv(16) (15%), aux LAM3 (15%), aux mutations de *NPM1* (10%). Le pronostic des mutations *FLT3-TKD* reste controversé [75].

2) KIT

Le gène *KIT* présent sur le chromosome 4 (4q12) code pour une protéine c-KIT (ou CD117), décrite pour la première fois par un biochimiste allemand en 1987 [76]. Ce récepteur à activité tyrosine kinase est présent à la surface des CSH et est activé en présence de Stem Cell Factor (SCF).

Les mutations activatrices de ce proto-oncogène sont impliquées dans de nombreuses hémopathies myéloïdes : dans 25-35% des LAM CBF et les mastocytoses systémiques [77]. Elles sont classées en trois groupes : soit une mutation ponctuelle dans l'exon 17, soit une insertion ou une délétion sans décalage du cadre de lecture (de 3 à 12 pb) dans l'exon 8, soit une duplication en tandem dans l'exon 11. Ces mutations sont instables à la rechute. Au niveau de l'impact pronostique de ces mutations, les résultats restent controversés : elles sont de pronostic défavorable dans les LAM-CBF en terme de rechute et de RFS mais elles sont sans intérêt pronostique en terme de taux de RC et d'OS [78, 79].

3) RAS

Les protéines RAS appartiennent à une famille de petites protéines membranaires qui régulent les signaux de transduction de nombreux récepteurs dont FLT3 et c-KIT. Elles jouent un rôle primordial dans la régulation de la prolifération, de la différenciation et de l'apoptose cellulaire par instauration d'un équilibre entre la forme active (GTP) et la forme inactive (GDP). Il existe trois gènes fonctionnels : *NRAS*, *KRAS*, et *HRAS*. Les mutations de ces gènes ont été les premières décrites dans les hémopathies myéloïdes [80].

La protéine NRAS est codée par le gène *NRAS* localisé en position 1p13. Les mutations touchent préférentiellement les codons G12, G13 et Q61, entraînent une perte de l'activité GTPasique et provoquent ainsi une activation constitutive de la protéine et des voies de signalisation en aval (RAF, MAPK, ERK) [15]. Elles sont retrouvées à une fréquence de 8-10% dans les LAM. Les mutations du gène *KRAS* quant à elles, sont présentes dans 5% des LAM. Pour les deux protéines, elles ne semblent pas influencer le pronostic des LAM en terme d'OS, d'EFS et de DFS [65].

4) *PTPN11*

Le gène *PTPN11* (protein tyrosine standard phosphatase non receptor 11) est localisé sur le chromosome 12 et encode pour une protéine cytoplasmique à activité tyrosine phosphatase (encore appelée SHP-2). Cette protéine participe au signal de transduction des récepteurs aux facteurs de croissance, aux cytokines et aux hormones, via la cascade de phosphorylation des kinases RAS/MAP, affectant ainsi la prolifération cellulaire.

Les mutations de *PTPN11* sont localisées à plus de 50% dans l'exon 3 altérant préférentiellement les codons 72 et 76 mais également dans l'exon 13. Elles sont retrouvées dans de nombreuses hémopathies myéloïdes : LMMJ (35%), LAM (4% en pédiatrie vs 2.5% chez l'adulte) [81].

5) *JAK2 et JAK3*

La famille JAK (janus kinase) est constituée de protéines à activité tyrosine kinase qui interviennent dans les voies de signalisation des signaux de survie et de prolifération cellulaire. Elle est constituée de 4 protéines cytoplasmiques dont JAK2 et JAK3. L'activation des récepteurs aux facteurs de croissance (EPO, IL6 et IL3) entraîne une activation des protéines JAK2 qui vont à leur tour activer par phosphorylation les protéines STAT. La dimérisation des protéines STAT et leurs translocations nucléaires régulent l'expression de certains gènes [82]. Une dérégulation de la voie JAK/STAT joue un rôle dans la pathogénicité des hémopathies myéloïdes telles que les SMP [83] et les LAM (<10%) [82].

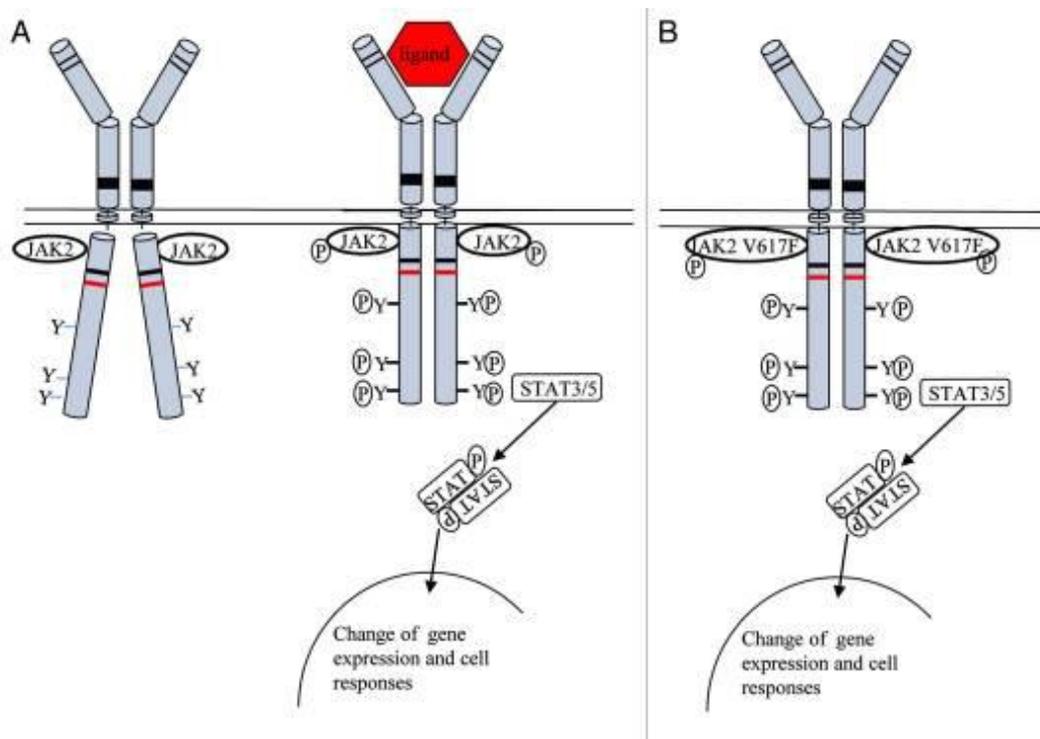


Figure 8 : signalisation via la voie JAK/STAT [84]

Cette protéine est codée par le gène situé sur le chromosome 9 en position 9p24.1. On recense deux grands types de mutations : soit une mutation ponctuelle dans le domaine pseudokinase JH2 à activité auto-inhibiteur (exon 14 c.1849G>T : p.V617F) ou dans l'exon 16 (R683G/S), soit une mutation ponctuelle ou une délétion « in frame » au niveau de l'exon 12.

Les mutations activatrices de JAK3 (chromosome 19p13.11), présentes dans le domaine pseudokinase JH2 et domaine JH6, sont à l'origine du développement des LAM mégacaryocytaires.

6) Autres gènes

Dans cette catégorie de gènes, les mutations entraînent un avantage prolifératif et/ou de survie des progéniteurs. Certaines anomalies sont moins fréquemment rencontrées dans les LAM, elles ont cependant été étudiées dans ce projet. On retrouve les mutations des gènes *RIT1*, *BRAF*, *MPL*, *CBL*, *SETBP1* et *CSF3R*. Les caractéristiques de ces mutations sont recensées dans le tableau 5.

Gène	Position	Fonctions	Mutations	Autres pathologies
RIT1	1q22	Protéine de la famille des petites protéines G à activité GTPasique Elle régule les signaux de prolifération, de survie cellulaire via la voie RAS/MAPKinase	exon 5 codons 81 et 82	LMMC SMD [85]
BRAF	7q34	Protéine de la famille RAF à activité sérine thréonine kinase. Elle régule la prolifération et la survie cellulaire via la voie RAS/RAF/MAPK [86]	Exons 11 et 15 (domaine kinase)	Leucémie à tricholeucocytes [87]
MPL	1p34.2	Récepteur transmembranaire à la thrombopoïétine Il participe à la prolifération et la survie cellulaire.	Mutation ponctuelle du codon 515	SMP (5-10%) : TE et MFP [88]
CBL	11q23.3	E3 ubiquitine ligase, régulateur négatif des voies de signalisation des récepteurs à activité tyrosine kinase [89].	Domaine catalytique (RING)	LMMC (10-20%) LMMJ [91].

		Les mutations sont responsables d'un effet gain de fonction entraînant une prolifération cellulaire et une survie accrues, ainsi qu'une augmentation du métabolisme du glucose des cellules cancéreuses [90].	Domaine de liaison aux récepteurs à activité tyrosine kinase	
SETBP1	18q12.3	L'hétérodimérisation entre deux protéines nucléaires SETBP1 et SET est à l'origine de l'inhibition du suppresseur de tumeur PP2A (protéine phosphatase de type 2A) et d'une augmentation de la prolifération [92]. Les mutations entraînent également un effet gain de fonction à l'origine d'une immortalisation des progéniteurs myéloïdes et une augmentation de leur capacité à proliférer [93]		LMMC SMD [94]
CSF3R	1p34.3	Récepteur du colony stimulating factor 3 (CSF3) qui intervient dans la croissance et la différenciation des granulocytes La présence d'un récepteur au CSF3 tronqué altère l'interaction avec des protéines cytoplasmiques telles que SHP1-2 et SOCS, augmentant ainsi la capacité proliférative des précurseurs granuleux [95].	Domaine extracellulaire (exon 14 T618I) Queue cytoplasmique (exon 17) = formation d'un codon stop	Neutropénie congénitale Leucémies chroniques à neutrophiles (>80%) [96].

Tableau 5 : Caractéristiques des mutations de classe I de faible fréquence

E Les mutations de classe II

1) CEBPA

Le gène *CEBPA* (CCAAT / enhancer binding protein A), localisé sur le chromosome 19 (19p23), est composé d'un seul exon. Il code pour un facteur de transcription ayant un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, la perte de l'auto-renouvellement, et la différenciation myéloïde lors de l'hématopoïèse normale [97]. Cette protéine est composée de deux domaines de transactivation en N terminal (TAD1 et TAD2), un domaine de liaison à l'ADN (DBD) et un domaine leucine zipper (bZIP) en C terminal.



Figure 9 : représentation schématique de la protéine CEBPA

Il existe deux types de mutations qui entraînent une diminution ou une perte de fonction de cette protéine : soit une insertion ou une délétion de 3,6 (ou plus) pb dans le domaine C terminal bZIP [98], soit une mutation non sens au niveau du domaine N terminal entraînant la formation d'une protéine tronquée [97]. Ces deux types de mutations ont permis de catégoriser les mutants *CEBPA* en deux groupes : simple ou double mutant. Elles sont retrouvées dans 6-15% des LAM, le plus souvent dans les LAM-CN ou dans le groupe cytogénétique intermédiaire et sont associées à un pronostic favorable. Des études récentes ont prouvé que seuls les doubles mutants du gène *CEBPA* sont de pronostic favorable [99, 100] et correspondent à une entité de LAM distincte. Ces mutations bi-alléliques sont retrouvées chez le sujet jeune et fréquemment associées aux mutations *de GATA2* (30%), *NRAS* (20%), *WT1* (20%) et *CSF3R* (20%).

On recense également des mutations germinales de *CEBPA* à l'origine d'une prédisposition de ces familles aux hémopathies [101].

2) ***RUNX1***

RUNX1 (runt related transcription factor 1) est un membre de la famille des facteurs de transcription *RUNX*, qui joue un rôle primordial dans le développement normal de l'hématopoïèse [102]. Le gène *RUNX1* est localisé sur le chromosome 21 (21q22). Il possède deux domaines conservés : le domaine RHD (RUNT homology domain) de liaison à l'ADN codé par les exons 3,4 et 5 [103] et un domaine de transactivation en position C terminale codé par les exons 6,7 et 8. Ce dernier permet de moduler l'expression des gènes cibles en recrutant des coactivateurs ou des corepresseurs.

Trois catégories d'altérations génétiques de *RUNX1* sont fréquemment décrites : les mutations intragéniques, les amplifications et les translocations. Les mutations sont dites inactivatrices et ont lieu principalement dans les exons 3 à 8 (mutation non sens, faux sens, insertion ou délétion entraînant un décalage de lecture et un codon stop) [104]. Des délétions partielles ou complètes du gène sont plus rarement décrites.

Ces anomalies sont retrouvées dans de nombreuses hémopathies myéloïdes : les LAM (M0, M7 et secondaires [105]) à une fréquence de 10%, les SMD[106], les LMMC et les thrombopénies familiales. Elles sont régulièrement associées à d'autres anomalies cytogénétiques (une monosomie 7 (10%) et une trisomie 13 (5%)), aux mutations de *SRSF2* (25%), *ASXL1* (20%) [107], *IDH1 et 2* (12%). Elles sont au contraire exclusives des mutations de *NPM1* [108].

Les LAM porteuses d'une mutation de *RUNX1* sont des entités distinctes provisoires par la classification OMS [7] et ont un pronostic défavorable en terme d'EFS, d'OS, et de DFS et entraînent une résistance à la chimiothérapie [109, 110].

3) GATA1 et GATA2

Les protéines de la famille GATA sont au nombre de 8, mais seuls GATA1, GATA2 et GATA3 sont des facteurs de transcription qui jouent un rôle clé dans l'hématopoïèse [111].

Le gène *GATA1* est localisé sur le chromosome X. Il code pour un facteur de transcription à deux domaines à doigt de zinc qui intervient dans la maturation mégacaryocytaire et érythroïde. Des mutations sont retrouvées dans les LAM chez les patients atteints de Down syndrome [112].

Le gène *GATA2*, localisé sur le bras long du chromosome 3, code pour une protéine caractérisée par deux domaines à doigt de zinc et deux domaines de transactivation.



Figure 10 : représentation schématique de la protéine GATA2

Le facteur de transcription GATA 2 coopère avec 6 autres protéines afin de réguler l'hématopoïèse. Les mutations somatiques de *GATA 2* sont très rares dans les LAM et régulièrement associées aux mutations bi-alléliques de *CEBPA* [113]. On recense également des mutations germinales à l'origine des syndromes monoMAC [114] et d'Emberger.

4) ETV6

L'oncogène *ETV6* (ETS variant 6) est un facteur de transcription de la grande famille des ETS, codé par le gène *ETV6* situé sur le chromosome 12. La famille des facteurs de transcription ETS est composée de 27 protéines chez l'homme. L'ensemble de ces protéines a en commun un domaine de fixation à l'ADN de 85 acides-aminés, qui permet la reconnaissance d'une séquence d'ADN spécifique de motif GGAA/T (domaine EBS (ETS binding site)).

Au niveau physiologique, les facteurs ETS ont un rôle important dans le développement et la différenciation tissulaire et cellulaire notamment au sein des CSH [115].

De nombreuses anomalies touchant le gène *ETV6* telles que les translocations sont retrouvées dans les LAL [116] et les SMD. On retrouve également des délétions et des mutations ponctuelles dans les LAM [117]. Récemment, des mutations germinales de *ETV6* ont été décrites à l'origine de thrombopénies familiales avec prédispositions aux LA [118].

5) Autres gènes

Dans les LAM, certains gènes dont les mutations entraînent un blocage de la différenciation des progéniteurs sont moins fréquemment rencontrés. Ils ont cependant été étudiés dans ce projet. On retrouve les mutations des gènes *NOTCH1* et *FBXW7*. Les caractéristiques de ces mutations sont recensées dans le tableau 6.

Gènes	Positions	Fonctions	Autres pathologies
<i>NOTCH1</i>	9q34	Récepteur membranaire ayant un rôle dans la prolifération, la différenciation cellulaire et l'apoptose [119]. L'activation du récepteur entraîne une cascade d'activations enzymatiques conduisant à la libération d'un facteur de transcription à domaine de localisation nucléaire (NCID). Cette protéine régule alors l'expression de nombreux gènes [120].	LAL-T [121] LAL-B [122] LLC [123]
<i>FBXW7</i>	4q31	Protéine de la famille des F-box, à activité E3 ubiquitine ligase. Elle régule la division, la croissance et la différenciation cellulaire [124]. Elle agit notamment en régulant négativement la voie de signalisation via NOTCH1 [125], c-MYC et la cycline E.	LAL-T pédiatrique (20%) [126].

Tableau 6 : Caractéristiques des mutations de classe II de faible fréquence dans les LAM

F La régulation épigénétique

1) DNMT3A

Le gène *DNMT3A* code pour une enzyme (DNA méthyltransférase) qui catalyse l'addition « de novo » d'un groupement méthyl sur les résidus cytosines des dinucléotides CpG de l'ADN. Ces îlots CpG sont concentrés dans les régions en amont de gènes et l'hyperméthylation de ces régions a pour conséquence une diminution de l'expression du gène en aval. DNMT3A joue un rôle crucial dans la différenciation et l'auto renouvellement des CSH [127].

La protéine DNMT3A possède trois domaines conservés : deux domaines régulateurs et un domaine catalytique à activité méthyltransférase.



Figure 11 : représentation schématique de la protéine DNMT3A

Les mutations hétérozygotes retrouvées sont de type non sens, faux sens ou une insertion/délétion. La plupart d'entre elles ont lieu dans le domaine catalytique au niveau du codon R882 [128]. Elles semblent être associées à l'âge avancé des patients, aux SMD, aux LAM-CN (30%-35%), de type M4/M5 et aux mutations de *NPM1*, *FLT3-ITD*, *TET2* et *IDH* [129]. L'impact pronostique de cette mutation est encore mal défini de nos jours [130, 131].

2) *TET2*

La famille TET est composée de trois membres : TET1, TET2, TET3. Le gène *TET2* est localisé sur le chromosome 4 et code pour une oxygénase dépendante du 2-oxoglutarate et du Fe(II). Cette enzyme hydroxyle les cytosines méthylées en 2-hydroxyméthylcytosine et intervient dans la régulation de la méthylation de l'ADN [132]. L'expression et le fonctionnement normal de TET2 est essentiel au maintien du pool de CSH et au contrôle de leurs différenciations.

Les mutations inactivatrices du gène *TET2* sont des phénomènes précoces dans la leucémogénèse et contribuent à la transformation myéloïde. Elles ont été décrites dans environ 20% des hémopathies myéloïdes: dans les LAM [68], les SMP, les SMD [133] et la LMMC. Elles sont fréquemment rencontrées dans les LAM-CN en association aux mutations de *NPM1*. L'impact pronostique reste encore controversé [66, 134].

3) *IDH*

La famille des IDH (isocitrate déshydrogénase) est composée d'enzymes du cycle de krebs qui catalysent la conversion de l'isocitrate en α céto-glutarate. Elle comprend trois isoformes IDH1, IDH2 et IDH3. IDH1 est localisée dans le cytoplasme alors qu'IDH2 est située préférentiellement dans les mitochondries. Elles sont codées respectivement par le gène *IDH1* situé sur le chromosome 2 et le gène *IDH2* sur le chromosome 15.

Les mutations somatiques leur confèrent une nouvelle activité enzymatique : la réduction de l' α céto-glutarate en 2 hydroxyglutarate, un puissant oncométabolite [135]. Elles entraînent également une hyperméthylation de l'ADN et une inhibition de la différenciation des CSH. Ce phénotype peut être expliqué par une interférence avec les enzymes dépendantes de l' α céto-glutarate telles que TET2. Ces mutations sont hétérozygotes et retrouvées à une fréquence de 17% dans les LAM et 27% dans les LAM-CN [136].

Elles sont principalement localisées sur le codon 132 pour *IDH1* et sur les codons 140 et 172 pour *IDH2*. Les mutations *IDH1* et *IDH2* sont mutuellement exclusives alors qu'elles sont fréquemment associées à un âge avancé, aux mutations *NPM1* et *FLT3-ITD* [68]. L'impact

+pronostique reste encore controversé [137, 138]: il semblerait que la mutation *IDH2* R172 soit de plus mauvais pronostic.

4) EZH2

EZH2 (histone lysine N methyl transferase) est une protéine, codée par le gène *EZH2* situé sur le chromosome 7, du complexe polycomb (PRC2). Ce complexe nucléaire intervient dans la méthylation de la lysine 27 des histones H3 [139], conduisant à la répression de l'expression des gènes cibles et confère un avantage prolifératif aux cellules.

Cette protéine possède un domaine conservé à l'origine de son activité enzymatique : histone méthyl transférase avec un motif NHS (asparagine, histidine, sérine). La présence de mutations somatiques dans ce domaine est à l'origine d'un effet perte de fonction de la protéine. Les mutations sont à l'origine de développement d'hémopathies myéloïdes telles que les SMD (10%), les formes frontières SMD/SMP et les MFP.

5) ASXL1

Le gène *ASXL1* (additional sex comb like 1) situé sur le bras court du chromosome 20, code pour une protéine membre du complexe polycomb PRC2 et thritorax *trxG*. Ces complexes sont à l'origine du remodelage chromatinien entraînant soit une augmentation soit une répression de la synthèse de certains gènes cibles [140].

Les mutations du gène *ASXL1* sont des événements précoces de la leucémogénèse et consistent en des altérations hétérozygotes de type non sens ou des insertions/délétions entraînant un décalage du cadre de lecture et la formation d'un codon stop prématurément. Elles surviennent le plus souvent dans le douzième exon du gène et conduisent à la perte du domaine PHD carboxyterminal.

Ces mutations sont fréquemment retrouvées chez les personnes âgées et dans les LAM à caryotype défavorable. Elles sont présentes dans les MFP (34.5%), dans les SMD au stade tardif de la maladie (30%), dans les LAM secondaires (30%) et les LMMC (45%) [141]. Les mutations d'*ASXL1* sont exclusives de *NPM1* et associées aux mutations de *RUNX1* (20%) et *IDH2R140* (13%). Elles semblent être de mauvais pronostic (taux de RC, de DFS, d'EFS et d'OS inférieurs) dans les LAM et les SMD [142] et notamment chez les patients classés dans le groupe cytogénétique favorable par la classification ELN [143].

6) BCOR et BCORL1

Les deux gènes *BCOR* (BCL6 co-represseur) et *BCORL1* sont présents sur le chromosome X [144]. *BCOR* est un co-represseur de BCL6 qui intervient dans la régulation de l'apoptose. Il agit également en association avec les histones désacétylases (HDACs) de classe I et II sur la désacétylation des histones et la régulation épigénétique [145]. De même, *BCORL1* est un facteur de transcription corépresseur qui interagit avec les HDACs de classe II et le corepresseur CTBP1.

Les mutations de *BCOR* sont fréquemment retrouvées dans les LAM à CN, elles sont cependant exclusives des mutations de *NPM1*. L'impact pronostique de ces mutations semble défavorable en terme d'EFS et d'OS [146].

Les mutations de *BCORL1* sont soit des mutations non-sens soit des insertions/délétions entraînant la synthèse d'une protéine tronquée de la région C-terminale, c'est-à-dire du domaine de recrutement nucléaire. Elles sont retrouvées dans 8% des LAM (plus particulièrement dans les LAM à caryotype complexe). Cependant, l'impact pronostique de ces mutations n'est pas encore connu [147].

G Les gènes suppresseurs de tumeur

1) TP53

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* est localisé sur le bras court du chromosome 17 [148] et comporte 11 exons. A l'état sauvage, il code pour une phosphoprotéine nucléaire, elle-même composée de six domaines : un domaine de transactivation, un domaine riche en proline, un domaine de fixation à l'ADN, un domaine de localisation nucléaire NLS, un domaine de tétramérisation et un domaine C terminal riche en lysine.

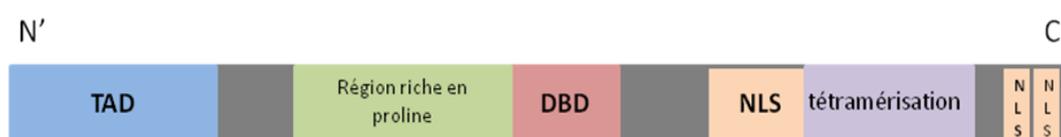


Figure 12 : Représentation schématique du gène *TP53*

Ce facteur de transcription découvert en 1979, permet une régulation stricte de l'expression des gènes impliqués dans l'arrêt du cycle cellulaire en phase G1 et G2, dans les mécanismes de réparation de l'ADN et dans l'apoptose. Le phénotype muté peut agir par effet dominant négatif en inhibant les fonctions de la protéine sauvage ou par effet gain de fonction [149].

Ce gène suppresseur de tumeur est le plus fréquemment muté dans les cancers solides (50%) et dans les hémopathies (10%). Les anomalies sont classées en deux types : soit une mutation somatique (mutation non sens, faux sens ou délétion/insertion) essentiellement dans les exons 4 à 10, soit une délétion du bras court du chromosome 17. Ces altérations sont souvent bi-alléliques avec soit une mutation sur chaque allèle, soit une mutation associée à une délétion de l'autre allèle. Plus rarement, il peut s'agir d'une double délétion.

On retrouve ces anomalies dans les LAM du sujet âgé, LAM secondaire à une chimiothérapie (t-AML) [150] et dans les LAM à caryotype complexe et monosomal. Ces anomalies sont associées à un pronostic péjoratif en terme du taux de RC, d'EFS et d'OS [110, 151].

2) ***WT1***

Le gène *WT1*, localisé sur le chromosome 11, code pour un facteur de transcription nécessaire au développement cellulaire normal et à la survie cellulaire. Cette protéine possède un double effet à l'origine de la cancérogénèse : une activité d'oncogène mais également un effet suppresseur de tumeur [152]. Récemment, une interaction a été mise en évidence entre *WT1* et *TET2* modifiant l'hydroxyméthylation de l'ADN et l'expression génique [153]. Il possède un domaine de transactivation en position N-terminale, riche en proline et glutamine, nécessaire à l'interaction avec l'ARN ainsi qu'un domaine C-terminal composé de quatre séquences (doigt-zinc) nécessaires à la fixation à l'ADN.

Les mutations du gène *WT1* sont situées soit dans l'exon 7 (insertion/délétion avec décalage du cadre de lecture) soit dans l'exon 9 (mutation faux sens). Elles sont fréquentes dans les LAM à caryotype normal au diagnostic et à la rechute chez les adultes jeunes (<60 ans) et les enfants et associées à des mutations *FLT3-ITD*. Elles sont également retrouvées dans les LAL-T. Ces mutations semblent de mauvais pronostic en terme d'OS [154].

3) ***Autres gènes***

PHF6 et *PTEN* sont également des gènes suppresseurs de tumeurs moins fréquemment rencontrés dans les LAM. Ils ont cependant été étudiés dans ce projet et les caractéristiques de ces mutations sont recensées dans le tableau 7.

Gènes	Position	Fonctions	Autres pathologies	Pronostic
<i>PHF6</i>	Xq26.2	Protéine ubiquitaire à 4 domaines NLS et 3 domaines à doigt de zinc nécessaires à la régulation de la transcription et au remodelage chromatinien [155]	LAL-T [156]	Pronostic défavorable
<i>PTEN</i>	10q23.31	Protéine intervenant dans la régulation du cycle cellulaire par déphosphorylation de l'inositol phosphatidyl-(3,4,5)-triphosphate. Ce substrat est nécessaire au métabolisme, à la prolifération cellulaire et à la croissance via la voie PI3K/AKT [157].	LAL-T [158] LAL-B [159]	Pronostic défavorable [160]

Tableau 7 : Caractéristiques des mutations des gènes suppresseurs de tumeurs de faible fréquence

H Le complexe de la cohésine

STAG2, *RAD21*, *SMC1A* et *SMC3* codent pour les différentes sous unités du complexe de la cohésine. Ce complexe de multimères protéiques est nécessaire à la cohésion des chromatides sœurs pendant la division mitotique et est ensuite clivé afin de permettre la

ségrégation chromosomique [161]. La fixation du complexe à la chromatine est dépendante d'une protéine NIPBL, le régulateur de la cohésine [162].

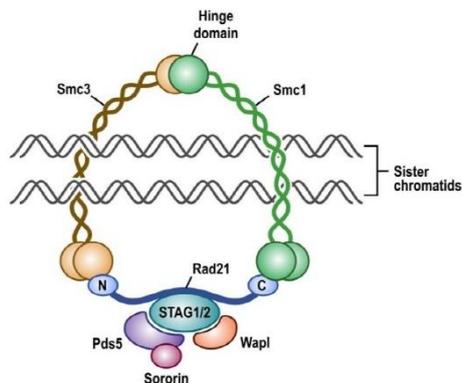


Figure 13 : Rôle du complexe de la cohésine dans la cohésion des chromatides sœurs

Ce complexe intervient également dans la réparation de l'ADN et la régulation de la transcription [163].

Gènes	Localisation	Domaines conservés
STAG2	Xq25	2 domaines conservés : STAG et stromaline
RAD21	8q24.11	2 domaines de liaison aux protéines SMC1A et SMC3
SMC1A	Xp11.22	
SMC3	10q25.2	
NIPBL	5p13.2	Domaine de localisation nucléaire, un domaine signal d'export nucléaire, 5 domaines HEAT répétés et un domaine de liaison à l'ADN.

Tableau 8 : Localisation des gènes du complexe de la cohésine

Des mutations somatiques sont retrouvées dans de nombreuses hémopathies telles que les LAM et les LAM t(8;21), les SMD, les LMMC et les SMP. Elles sont fréquemment associées aux mutations de *NPM1*, *TET2*, *ASXL1* et *EZH2* [164].

I Le splicéosome

Le complexe d'épissage ou splicéosome est un assemblage de 5 petites protéines nucléaires (SF3B1, SRSF2, ZRSR2, U2AF1 et U2AF65) nécessaires à l'excision des séquences codantes (exons) et non codantes (introns) exprimées dans le précurseur de l'ARN messager (pré-ARNm).

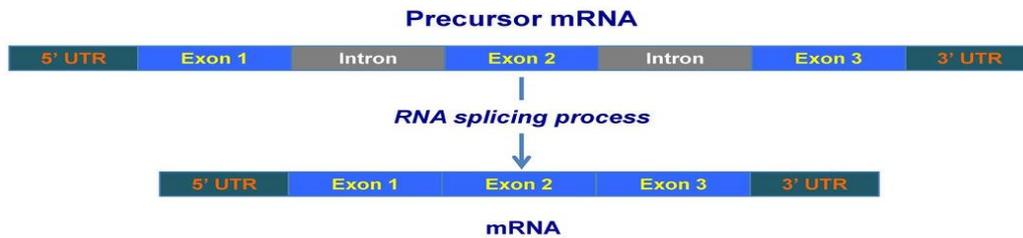


Figure 14 : Intérêt de l'épissage chez les eucaryotes [165]

1) U2AF1

U2AF1 est une petite sous unité de la protéine U2AF (U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor) qui forme un hétérodimère avec U2AF2 et se lie au dinucléotide accepteur d'épissage 3'AG de l'intron cible du pré-ARNm.

De nombreuses mutations somatiques sont retrouvées dans les hémopathies myéloïdes : SMD [166], LMMC, LAM avec myélodysplasie [167]. Elles touchent principalement les codons 34 et 157 des domaines CCCH à doigt de zinc de la protéine. Elles sont à l'origine d'un phénomène de perte de fonction (défaut de splicing) mais également d'un effet gain de fonction [166]. Les mutations sont associées aux mutations de *DNMT3A* et *ASXL1*.

2) SRSF2

SRSF2 (serin/arginine rich splicing factor 2) appartient à la famille des protéines riches en serine/arginine, et est encodée par le gène *SRSF2* situé sur le chromosome 17. Elle sélectionne le site d'épissage en 3', assemble le complexe et procède à l'épissage conventionnel et alternatif [168].

Des mutations somatiques du gène *SRSF2* sont fréquentes dans les SMD (20-30%) principalement les LMMC (50%) [169] mais également dans les LAM. On retrouve soit des mutations ponctuelles au niveau des codons 95 et 96 soit une délétion de 24 bp. Elles apparaissent précocement dans le phénomène d'ontogénèse et sont souvent associées à d'autres mutations et notamment *RUNX1*, *ASXL1* et *IDH* [170]. Les mutations de *SRSF2* sont associées à un mauvais pronostic dans les SMD et les LAM [169].

3) ***SF3B1***

Le gène *SF3B1* code pour la sous unité 1 du facteur d'épissage 3B, nécessaire à l'ancrage du complexe d'épissage au pré-ARNm. *SF3B1* comprend un domaine de liaison à l'ARN en position N-terminale et un domaine de liaison à d'autres protéines.

Les mutations de *SF3B1* sont fréquemment rencontrées dans les SMD (30%) et notamment en cas de myélodysplasie avec sidéroblastes en couronne [171], dans les LLC, dans les LAM et dans les SMP (MF et TE). Les mutations faux sens sont hétérozygotes et sont présentes dans les exons 12 à 16, principalement au niveau des codons 700 (K700E 50%), 666, 662, 622 et 625. Elles conduisent à un avantage prolifératif [172, 173] des cellules. Plusieurs études ont montré par des analyses multivariées le pronostic favorable de ces mutations [165].

4) ***ZRSR2***

Le gène *ZRSR2* (U2 small nuclear ribonucleoprotein auxiliary factor 35 kDa subunit-related protein 2) est localisé sur le chromosome X. Il code pour une protéine possédant deux domaines à doigt de zinc, un domaine de liaison à l'ARN, et un domaine riche en arginine et en sérine.

ZRSR2 appartient à la famille des protéines U2AF dont la fonction est l'assemblage précoce du spliceosome. Cependant son rôle précis dans l'épissage n'est pas encore connu.

Les mutations de ce gène (mutations faux sens ou mutations entraînant un décalage du cadre de lecture) entraînent une perte de fonction de la protéine. Elles sont fréquemment rencontrées dans les SMD (7%), les LMMC, les LAM, et les LLC. L'impact pronostique de ces mutations reste encore controversé.

J Autres

Gènes	Positions	Fonctions	Pathologies	Mutations
<i>CALR</i>	19p13.13	Localisée dans le réticulum endoplasmique, le cytoplasme et à la membrane cellulaire, cette protéine participe aux transports des ions calcium. Elle joue un rôle clé dans la croissance cellulaire, la prolifération, la migration, l'adhésion et l'apoptose. Les mutations entraînent la formation d'une protéine chargée positivement ou neutre, altérant ainsi sa liaison au Ca ²⁺ [174]	TE (20-25%)[175] MFP	Au niveau de l'exon 9 : -Délétion de 52 bp -Insertion de 5 bp

Tableau 9 : Caractéristiques du gène *CALR*

IV Objectifs

Les objectifs de notre étude sont d'approfondir nos connaissances sur le profil mutationnel des LAM *de novo* du sujet âgé :

- Estimer l'incidence des mutations chez le sujet âgé
- Considérer l'ensemble des corrélations biologiques et cliniques des mutations afin d'améliorer notre compréhension du phénomène de leucémogénèse
- Evaluer l'impact pronostique des mutations des 43 gènes impliqués dans les LAM afin d'essayer d'optimiser le traitement d'induction ou de post rémission

V Matériels et Méthodes

A Patients : essai ALFA-0701

L'essai ALFA-0701 a été mis en place par le groupe francophone ALFA de 2007 à 2010, dans le but de tester l'ajout de GO dans le traitement standard des LAM *de novo* chez les patients âgés de 50-70 ans.

Dans cette étude de phase III multicentrique, les patients étaient randomisés afin de recevoir une chimiothérapie d'induction : daunorubicine 60 mg/m² pendant 3 jours associée à la cytarabine 200 mg/m² pendant 7 jours et des doses fractionnées de GO dans le bras B (3 mg/m² au jour 1, 4 et 7) ou sans ajout de GO dans le bras A. Un prélèvement médullaire était réalisé à J15, en cas de persistance de blastes (>10%), une seconde cure de chimiothérapie était initié associant la daunorubicine (60 mg/m²/j) pendant 2 jours et la cytarabine (1000 mg/m²) pendant 2 jours. Les patients en RC ou en RCp (rémission complète avec normalisation incomplète de l'hémogramme) reçoivent par la suite une chimiothérapie de consolidation : 2 cures de cytarabine à dose intermédiaire associées à la daunorubicine +/- 1 dose de GO (3 mg/m² au jour 1). Certains patients ont reçu une intensification du traitement par allogreffe de CSH en fonction du pronostic de la LAM et de la disponibilité d'un donneur apparenté.

Dans ce protocole, la RC était définie par une proportion de blaste médullaire < 5% dans une moelle de richesse normale, un nombre de polynucléaires neutrophiles sanguins > 1 G/L, et un nombre de plaquettes sanguines > 100G/L. La RCp est quant à elle, caractérisée par une RC avec persistance d'une thrombopénie résiduelle (< 100G/L).

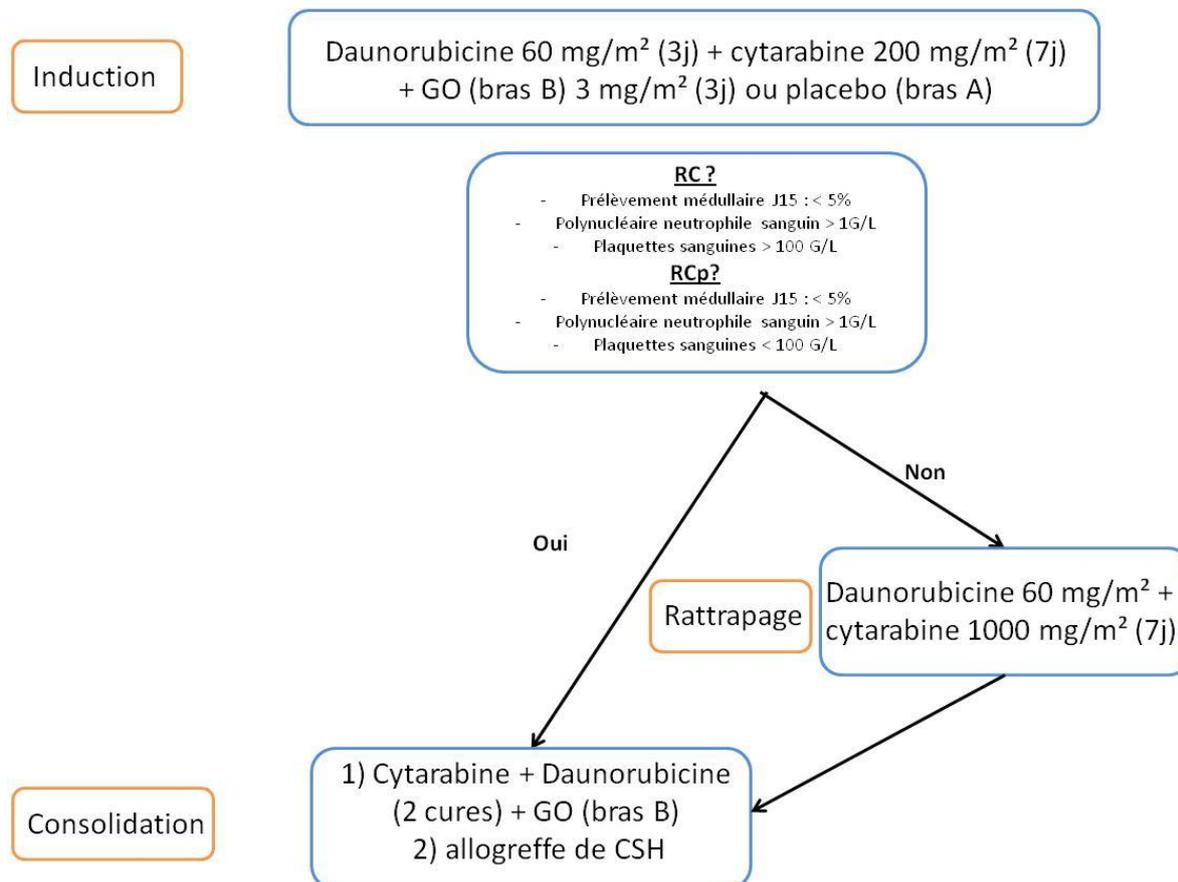


Figure 15 : Protocole thérapeutique de l'essai ALFA-0701

Sur une cohorte 278 patients inclus dans ce protocole de 2007 à 2010, l'analyse a été effectuée sur l'ADN issu de prélèvement de moelle osseuse ou à défaut de sang périphérique prélevé lors du diagnostic. Ces échantillons ont été conservés au centre de conservation des échantillons du Centre de Biologie et de Pathologie du CHRU de Lille.

Pour cette étude, nous avons décidé d'exclure les patients qui ne présentaient pas d'ADN disponible au diagnostic ou qui présentaient un ADN dégradé empêchant un séquençage à haut débit de bonne qualité. L'analyse a été possible pour n = 250 échantillons.

B Isolement cellulaire et extraction de l'ADN

Les culots nécessaires à l'extraction de l'ADN sont préparés à partir de prélèvements de moelle osseuse ou de sang périphérique récupérés sur tube EDTA. La première étape comprend la lyse des globules rouges et l'isolement des cellules mononuclées par gradient Ficoll. Les prélèvements subissent tout d'abord 10 min de centrifugation en présence d'un tampon de lyse afin de récupérer le culot cellulaire. Ce culot est remis en suspension deux fois dans une solution de lavage entrecoupée par des centrifugations de 10min à 3000tours/min. Une numération est effectuée par un automate (pentra®) sur un aliquot de 200µL. Ensuite, on réalise la répartition des cellules en culots sec de 5 à 10 millions de cellules qui seront conservés à -80°C.

L'ADN des culots est ensuite extrait à l'aide des colonnes : QIAmp® (DNA Mini Kit) de QUIAGEN®. Cette méthode permet de purifier rapidement l'ADN (élimination des inhibiteurs et des protéines) sans le détériorer et d'obtenir des fragments jusqu'à 50kb (essentiellement des fragments de 20-30kb). Chaque culot est repris dans 200µL de PBS, 20µL de protéinase K (afin de dégrader les membranes cellulaires et nucléaires) et 200µL de Buffer AL. Le mélange est conservé 2h à 56°C. Après vortex et centrifugation des échantillons, on ajoute 200µL d'éthanol absolu afin de précipiter l'ADN. L'ensemble de la solution sera transférée sur une colonne fournie par le fabricant. Chaque colonne subira successivement une centrifugation à 8000tours/min pendant 1min, l'ajout de 500µL de solution AW1, une centrifugation à 8000 tours pendant 1 minute, l'ajout de 500µL de solution AW2 et deux centrifugations de 13000 tours pendant 3 min. La dernière étape consiste en la récupération de l'ADN après élution dans du tampon AL (200µL) préalablement chauffé à 70°C. Les aliquots seront conservés à -20°C.

C Séquençage haut débit (NGS)

1) Préparation de la librairie haloplex (Agilent®)

Les ADN sont dosés préalablement par la méthode Picogreen. Cette technique utilise des molécules fluorescentes intercalantes de l'ADN et permet une sensibilité dans la mesure de la concentration d'ADN. Les ADN sont ensuite dilués afin d'obtenir 112.5ng d'ADN dans un volume de 22,5 µL. Seize enzymes de restriction vont ensuite digérer l'ADN de chaque patient en de nombreux fragments. Le design de ces enzymes a été réalisé préalablement par les ingénieurs du service afin d'obtenir une coupe franche, une meilleure couverture et profondeur de lecture possible. Cette digestion est réalisée à 37°C pendant 30min.

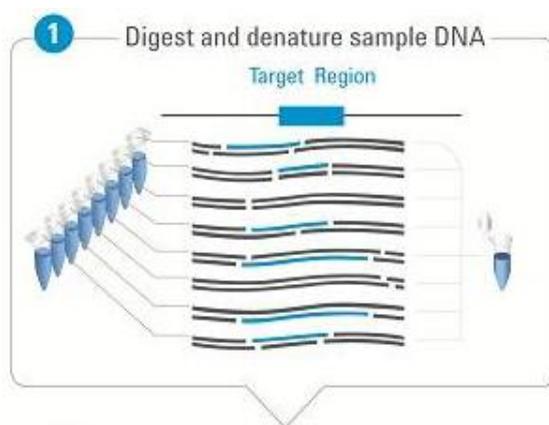


Figure 16 : Première étape de préparation de la librairie : la digestion

L'ADN digéré est ensuite hybridé avec 5000 sondes Haloplex®. Ces sondes sont composées de deux zones de reconnaissance de l'ADN, spécifique de la région désignée par les enzymes de restriction, entrecoupées par un index. Chaque index est un assemblage de 8 acides-aminés qui sera spécifique à chaque patient analysé. Enfin chaque sonde est associée à une

molécule de biotine en 5'. La première étape réalisée à 95°C pendant 10 min permet une dénaturation de l'ADN et une dégradation des enzymes de restriction. La seconde étape à 54°C pendant 3h consiste en l'hybridation et la circularisation de l'ADN.

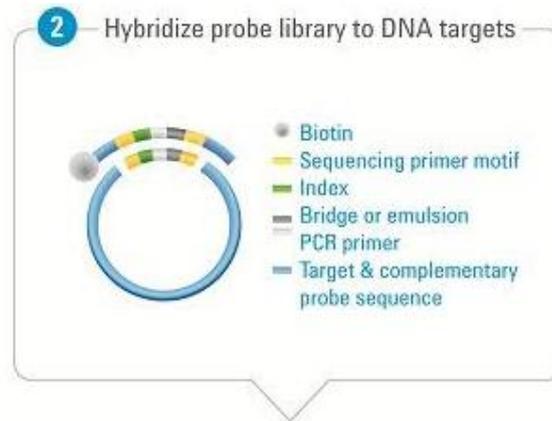


Figure 17 : Deuxième étape : hybridation de l'ADN avec les sondes Haloplex

Ces hybrides ADN/sondes sont ensuite capturés par des billes magnétiques marquées à la streptavidine par liaison non covalente entre la streptavidine et la biotine. L'ADN est relié à l'index par ligation à l'aide d'une ADN ligase.

Enfin, les hybrides sont élués des billes magnétiques par l'hydroxyde de sodium par dénaturation de la liaison streptavidine-biotine sans impacter l'ADN et purifiés. Cette étape est robotisée. Nous obtenons alors un ADN libre, circularisé et dépourvu de billes magnétiques (inhibiteurs de PCR).

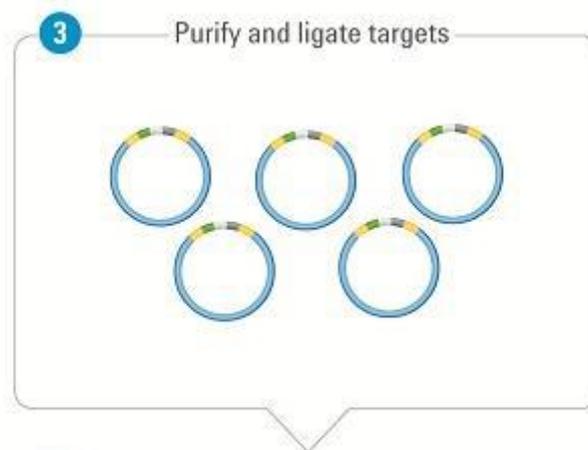


Figure 18 : Troisième étape : élution et purification des hybrides.

L'amplification de l'ADN est possible par PCR (Polymerase Chain réaction). Cette technique mise au point par Kary Mullis en 1985 et pour laquelle il obtient le prix Nobel en 1993, a pour but d'augmenter de façon exponentielle un fragment d'ADN d'intérêt. Pour cela, on utilise deux amorces spécifiques qui délimitent la zone à amplifier et une enzyme de

polymérisation thermostable : la Taq polymérase en présence de désoxyribonucléosides (dNTPs) et de MgCl₂. Chaque cycle de PCR se décompose en 3 étapes : tout d'abord une étape de dénaturation de l'ADN à 98°C, une hybridation des amorces aux extrémités à une température comprise entre 50-60°C puis une élongation à 72°C par incorporation des dNTPs. Après chaque cycle, les brins d'ADN nouvellement synthétisés servent de matrice pour la synthèse des suivants.

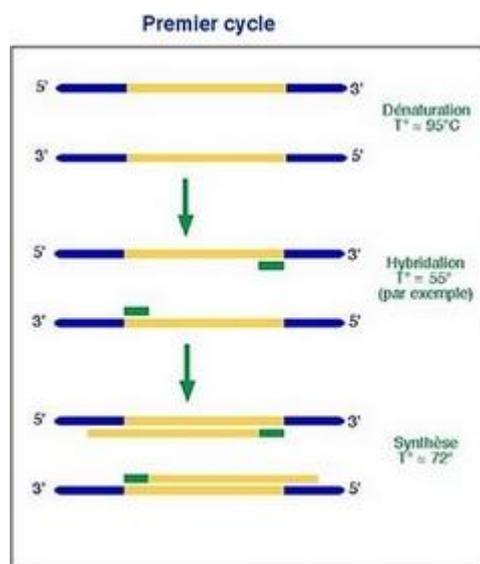


Figure 19 : Amplification de l'ADN par PCR

La PCR de notre librairie est réalisée à l'aide d'amorces universelles qui reconnaissent spécifiquement certaines bases dans l'index (une en 5' et une en 3'). Elles sont également liées à des adaptateurs.

Ensuite, on purifie les amplicons obtenus de taille comprise entre 75-675 bp afin d'éliminer les dimères d'amorces. Pour cela, on élimine les amplicons ou les débris de taille inférieure à 150 pb. La quantification des amplicons est ensuite réalisée sur TapeStation (Agilent Technologies®). On regroupe ensuite les solutions contenant afin de composer la librairie finale. Cette librairie est normalisée et quantifiée sur le Bioanalyzer (Agilent Technologies®).

2) Préparation de la matrice de séquençage (amplification clonale)

La librairie est mise directement dans le séquenceur Miseq d'Illumina®, et amplifiée afin de générer des clusters d'amplicons par bridge PCR. Les amplicons, possédant aux deux extrémités des adaptateurs, vont se fixer sur une surface solide (flow cell) et générer ainsi des ponts. Ensuite, l'incorporation des nucléotides puis la dénaturation du double brin permettent la génération de deux amplicons simple brin. Cette technique génère alors plusieurs millions de clusters denses.

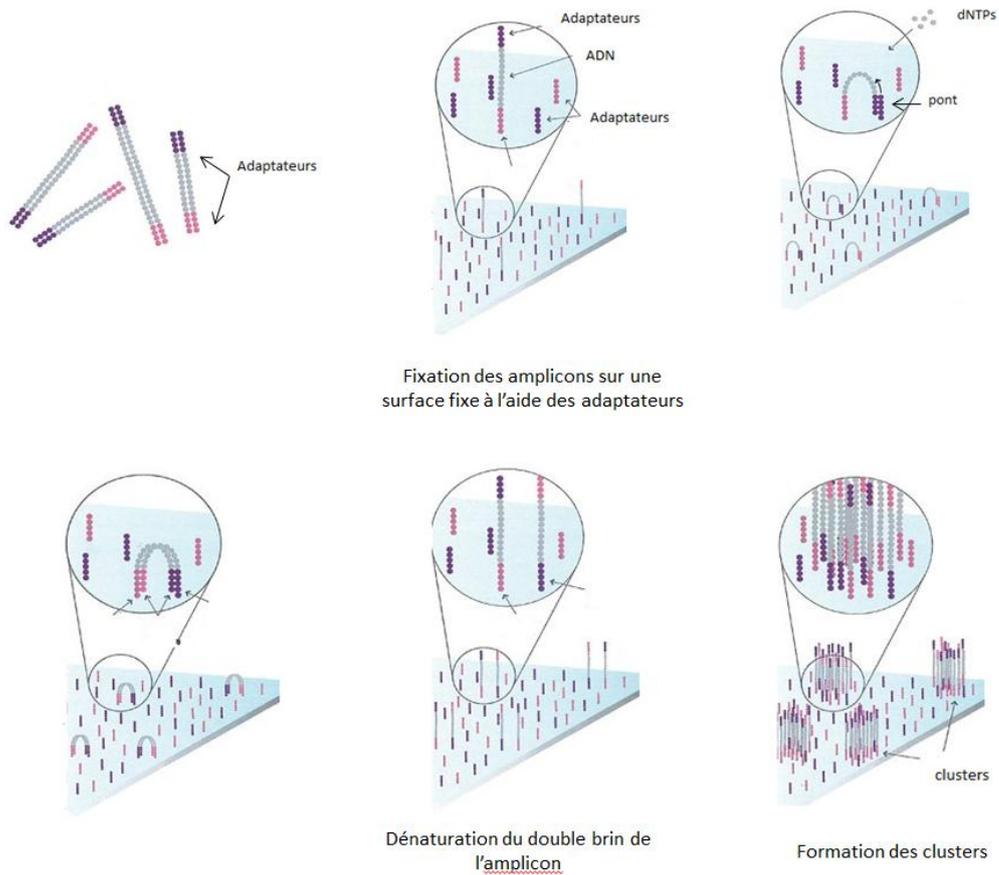


Figure 20 : Génération de clusters d'amplicons par bridge-PCR

3) Séquençage par synthèse (SBS)

Le séquençage de l'ADN est ensuite réalisé par la synthèse du brin complémentaire par incorporation de dNTPs fluorescents à l'aide d'une ADN polymérase et d'un terminateur de chaîne qui stoppe la réaction. Après chaque cycle, on détecte dans deux canaux, la base ajoutée par un capteur d'image de couleur de plusieurs millions de pixels. Une image verte correspond à l'incorporation d'un T, une image rouge correspond à l'incorporation d'un C, une image détectée en rouge et verte correspond à l'incorporation d'un A et enfin une image non détectée correspond à un G.

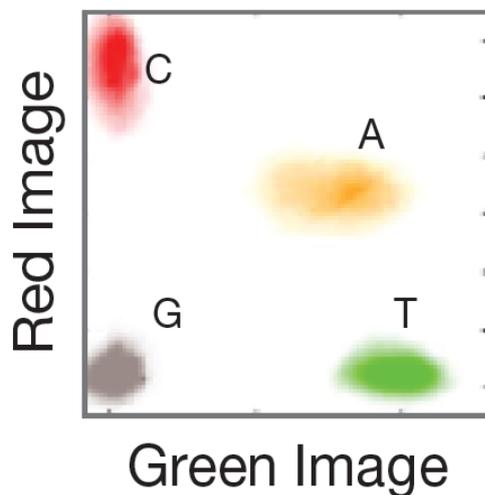


Figure 21 : Représentation de l'image observée par le capteur du séquenceur

Le terminateur de chaîne est ensuite clivé permettant l'insertion de la base suivante. Le signal est intégré à chaque cycle minimisant ainsi le taux d'erreur notamment en cas de séquence répétitive ou d'homopolymère.

4) Analyse des données

L'ensemble des données est ensuite récupéré par deux pipelines (Seqnext et Illumina reporter) qui permettent l'alignement des séquences et la comparaison à une séquence de référence. Chaque anomalie détectée est analysée d'un point de vue technique afin d'éliminer les artefacts potentiels de la technique.

D Panel mutationnel

Le panel de gènes a été créé au sein du laboratoire afin de d'étudier simultanément 43 gènes impliqués dans les pathologies myéloïdes. Le design a été réalisé sur les exons fréquemment mutés dans la littérature (tableau 10).

Gènes	Exons étudiés
<i>ASXL1</i>	Exons 11 et 12
<i>BCOR</i>	Exons 2 à 15
<i>BCORL1</i>	Exons 1 à 12
<i>BRAF</i>	Exon 15
<i>CALR</i>	Exon 9
<i>CBL</i>	Exons 8 et 9
<i>CEBPA</i>	Exon 1

<i>CSF3R</i>	Exon 14
<i>DNMT3A</i>	Exons 2 à 23
<i>ETV6</i>	Exons 1 à 8
<i>EZH2</i>	Exons 2 à 20
<i>FBXW7</i>	Exons 9 à 12
<i>FLT3</i>	Exons 14 à 20
<i>GATA1</i>	Exon 2
<i>GATA2</i>	Exons 2 à 6
<i>IDH1</i>	Exon 4
<i>IDH2</i>	Exon 4
<i>JAK2</i>	Exons 12 à 14
<i>JAK3</i>	Exon 13
<i>KIT</i>	Exons 8 à 17
<i>KRAS</i>	Exons 2 et 3
<i>MPL</i>	Exon 10
<i>NIPBL</i>	Exons 2 à 47
<i>NOTCH1</i>	Exons 26 à 34
<i>NPM1</i>	Exon 11
<i>NRAS</i>	Exons 2 et 3
<i>PHF6</i>	Exons 2 à 10
<i>PTEN</i>	Exons 5 à 7
<i>PTPN11</i>	Exons 3 à 13
<i>RAD 21</i>	Exons 2 à 14
<i>RIT1</i>	Exons 2 à 6
<i>RUNX1</i>	Exons 1 à 9

SETBP1	Exon 4
SF3B1	Exons 13 à 18
SMC1A	Exons 1 à 25
SMC3	Exons 1 à 29
SRSF2	Exon 1
STAG2	Exons 3 à 35
TET2	Exons 3 à 11
TP53	Exons 2 à 11
U2AF1	Exons 2 à 6
WT1	Exons 7 à 9
ZRSR2	Exons 1 à 11

Tableau 10 : Gènes et exons étudiés par séquençage NGS

E Analyse des variants détectés.

Chaque variant est analysé selon plusieurs règles (figure 22) afin de confirmer ou non leur caractère somatique :

Les variants retenus ont une profondeur de lecture suffisante, c'est-à-dire au minimum 50 reads. Toutes les mutations non-sens et les insertions ou délétions entraînant la formation d'un codon stop, sont délétères pour la protéine et sont considérés comme des mutations somatiques.

Les mutations faux sens et les autres insertions et délétions (« in frame ») sont étudiées selon plusieurs critères : elles sont décrites soit comme une mutation somatique dans la base de données COSMICS, soit comme un polymorphisme dans les bases de données eXac et dbSNP. La prédiction des conséquences fonctionnelles des variants est étudiée selon les logiciels MAPP, PhD-SNP, PolyPhen-1, PolyPhen-2, SIFT, SNAP et chaque VAF (variant allele frequency) est pris en compte dans l'hypothèse d'un SNP ou d'une mutation somatique. Enfin, il a été réalisé une analyse bibliographique des variants non décrits.

Certaines anomalies ont été vérifiées par une seconde technique de séquençage haut débit à l'aide de la librairie Ampliseq® et du séquenceur Ion Proton de ThermoFisher®, par séquençage Sanger et les mutations *FLT3-ITD* ont été confirmées par la technique d'analyse de fragment [176]. Enfin, le caractère somatique de certaines anomalies a été confirmé sur

un prélèvement de suivi des patients en RC. En effet, la disparition ou la diminution du VAF permet d'en déduire le caractère somatique de l'anomalie détectée.

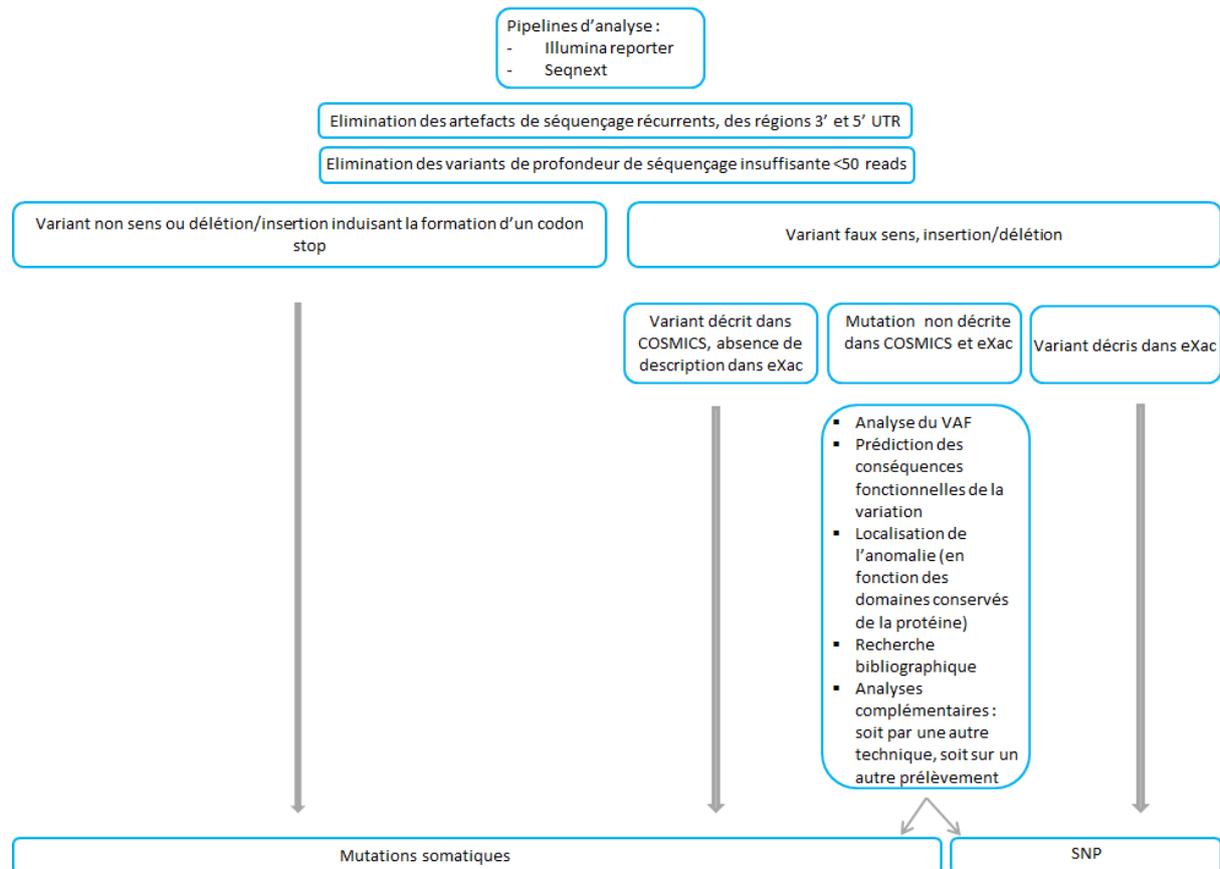


Figure 22 : Arbre décisionnel de la validation des variants détectés par séquençage NGS

F Statistiques

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel STATA®. Les corrélations entre les différentes mutations et avec les autres caractéristiques des patients ont été testées selon le *test de Fisher exacte* pour les variables qualitatives ou le *test de Mann Whitney* pour les variables continues. Les données de survie ont été analysées selon différents critères : la mise en RC, l'OS et la RFS. Pour cela, la p-value a été calculée selon le *modèle de Cox* et les courbes ont été tracées selon la *méthode de Kaplan-Meier*. La significativité des tests est évaluée à 5%.

VI Résultats

A Patients inclus

L'essai national de phase III ALFA-0701, mis en place dans 26 centres, a permis le recrutement de notre cohorte de 250 patients atteints de LAM *de novo*.

Les caractéristiques cliniques de notre cohorte et après randomisation sont présentées dans le tableau 11.

		Cohorte Globale (n=250)	Bras A Contrôle (n=122)	Bras B GO (n=128)	P
Age	Age médian	62.1	61.5	62.8	0.03*
	Age min	50.1	50.1	50.5	
	Age max	70.9	70.7	70.9	
Sexe	Homme	121	54	67	0.21
	Femme	129	68	61	
Leucocytose au diagnostic (G/L)	Leucocytose médiane	6.2	5.3	7.9	0.41
	Leucocytose min	0.4	0.4	0.5	
	Leucocytose max	319.9	319.9	187	
Caryotype	Caryotype Normal	127	63	64	0.90
	Autres	123	61	62	
Groupe Cytogénétique	Favorable	8	6	2	0.441
	Intermédiaire	163	78	85	
	Défavorable	53	27	26	
	Echec	26	11	15	
RC		176	86	90	1
Allogreffe en RC		43	25	18	0.19

Tableau 11 : Caractéristiques cliniques des patients de la cohorte globale et des patients après randomisation

B Fréquence des mutations

1) Sur la cohorte globale

On retrouve 709 mutations sur l'ensemble de la cohorte, soit en médiane 3 par patient. Le nombre maximal de mutations recensées est de 8 pour deux patients. Sur l'ensemble des 250 patients, 93% d'entre eux ont au moins une mutation et 78% en ont au minimum deux.

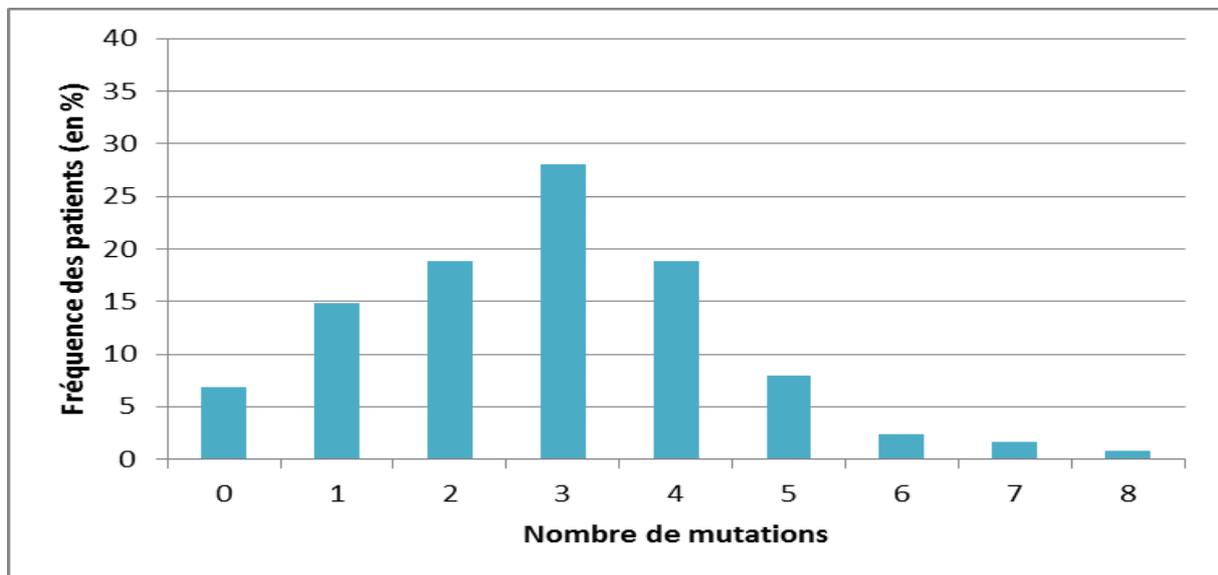


Figure 23 : Fréquence des patients (en %) en fonction du nombre de mutations.

L'incidence des mutations, retranscrite dans le tableau 12, est représentée sous forme de barcode (figure 24).

Cohorte (n=250)	
<i>NPM1, n (%)</i>	82 (32.8)
Classe I, n (%)	125 (50)
<i>FLT3-ITD, n (%)</i>	51 (20.4)
<i>FLT3-TKD, n (%)</i>	22 (8.8)
<i>KIT, n (%)</i>	4 (1.6)
<i>NRAS, n (%)</i>	34 (13.6)
<i>KRAS, n (%)</i>	21 (8.4)
<i>RIT1, n (%)</i>	3 (1.2)
<i>PTPN11, n (%)</i>	10 (4)
<i>JAK2, n (%)</i>	9 (3.6)
<i>JAK3, n (%)</i>	1 (0.4)
<i>MPL, n (%)</i>	0
<i>CBL, n (%)</i>	3 (1.2)

<i>CSF3R, n(%)</i>	1 (0.4)
<i>SETBP1, n (%)</i>	1 (0.4)
Classe II, n (%)	64 (25.6)
<i>CEBPA dm, n (%)</i>	8 (3.2)
<i>CEBAP sm, n (%)</i>	10 (4)
<i>RUNX1, n (%)</i>	37 (14.8)
<i>GATA1, n (%)</i>	0
<i>GATA2, n (%)</i>	6 (2.4)
<i>ETV6, n (%)</i>	5 (2)
<i>NOTCH1, n (%)</i>	4 (1.6)
<i>FBXW7, n (%)</i>	0
Gènes de la régulation épigénétique, n (%)	169 (67.6)
<i>DNMT3A, n (%)</i>	70 (28)
<i>TET2, n (%)</i>	50 (20)
<i>IDH1, n (%)</i>	26 (10.4)
<i>IDH2tot, n (%)</i>	34 (13.6)
<i>IDH2R140, n (%)</i>	22 (8.8)
<i>IDH2R172, n (%)</i>	12 (4.8)
<i>EZH2, n (%)</i>	11 (4.4)
<i>ASXL1, n (%)</i>	32 (12.8)
<i>BCOR, n (%)</i>	23 (9.2)
<i>BCORL1, n (%)</i>	9 (3.6)
Gènes suppresseur de tumeurs, n (%)	45 (18)
<i>TP53, n (%)</i>	26 (10.4)
<i>WT1, n (%)</i>	11 (4.4)
<i>PHF6, n (%)</i>	10 (4)

<i>PTEN, n (%)</i>	0
Gènes de la cohésine, n (%)	40 (16)
<i>U2AF1, n (%)</i>	13 (5.2)
<i>SRSF2, n (%)</i>	31 (12.4)
<i>SF3B1, n (%)</i>	11 (4.4)
<i>ZRSR2, n (%)</i>	0
Gènes du splicéosome, n (%)	55 (22)
<i>STAG2, n (%)</i>	16 (6.4)
<i>RAD21, n (%)</i>	6 (2.4)
<i>SMC1A, n (%)</i>	10 (4)
<i>SMC3, n (%)</i>	5 (2)
<i>NIPBL, n (%)</i>	4 (1.6)
Autres, n (%)	1 (0.4)
<i>CALR, n (%)</i>	1 (0.4)

Tableau 12 : Incidence des mutations sur la cohorte globale

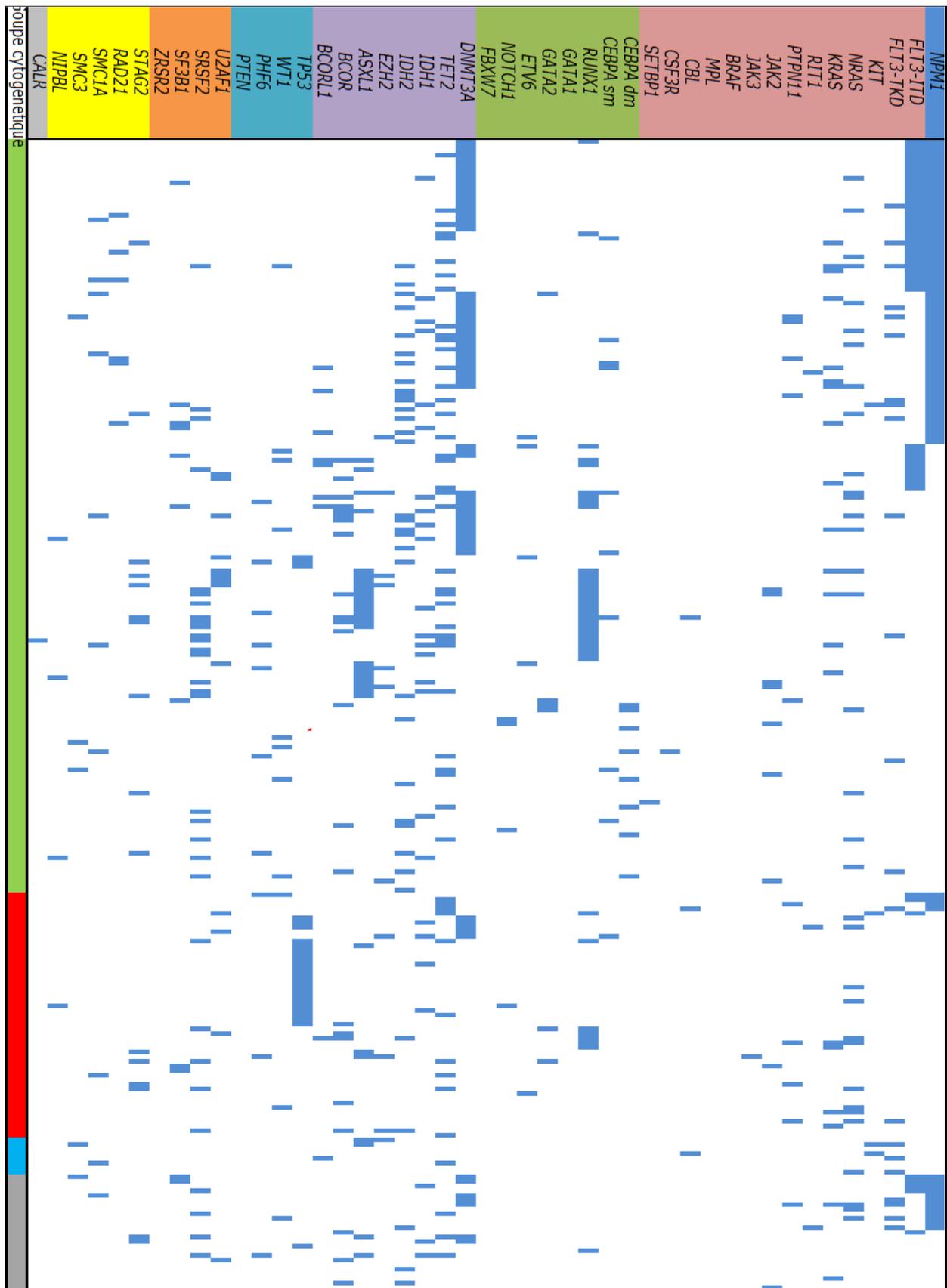


Figure 24 : Barcode de l'ensemble des mutations retrouvées chez les 250 patients en fonction du groupe cytogénétique (vert = intermédiaire, rouge = défavorable, bleu= favorable, gris = échec)

La figure 25 présente la fréquence des mutations retrouvées sur notre cohorte : 11 gènes sont mutés chez plus de 10% des patients : *NPM1* (33%), *DNMT3A* (28%), *FLT3-ITD* (20%), *TET2* (20%), *RUNX1* (15%), *NRAS* (14%), *IDH2* (14%), *ASXL1* (13%), *SRSF2* (12%), *IDH1* (10%), *TP53* (10%). On ne retrouve aucune mutation sur 6 gènes (*ZRSR2*, *PTEN*, *MPL*, *GATA1*, *FBXW7*, *BRAF*).

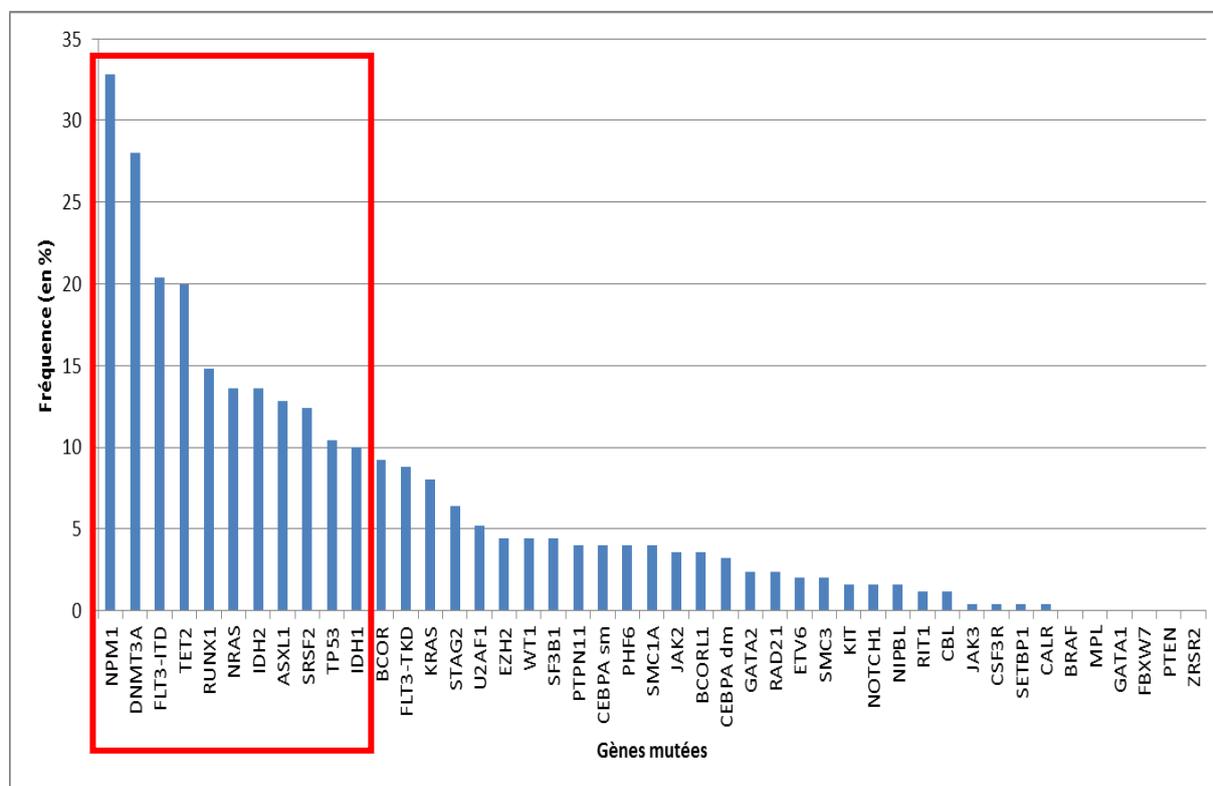


Figure 25 : Fréquence des mutations en fonction des gènes étudiés

Dans cette étude, les mutations des gènes impliqués dans la régulation épigénétique sont les plus fréquemment rencontrées (67,6%), suivies par les mutations de classe I (50%), *NPM1* (33%), les mutations de classe II (25,6%), les mutations touchant le splicéosome (22%) et enfin les mutations touchant les gènes suppresseurs de tumeur (18%), les mutations de la cohésine (16%) et les mutations inclassables : *CALR* (0,4%).

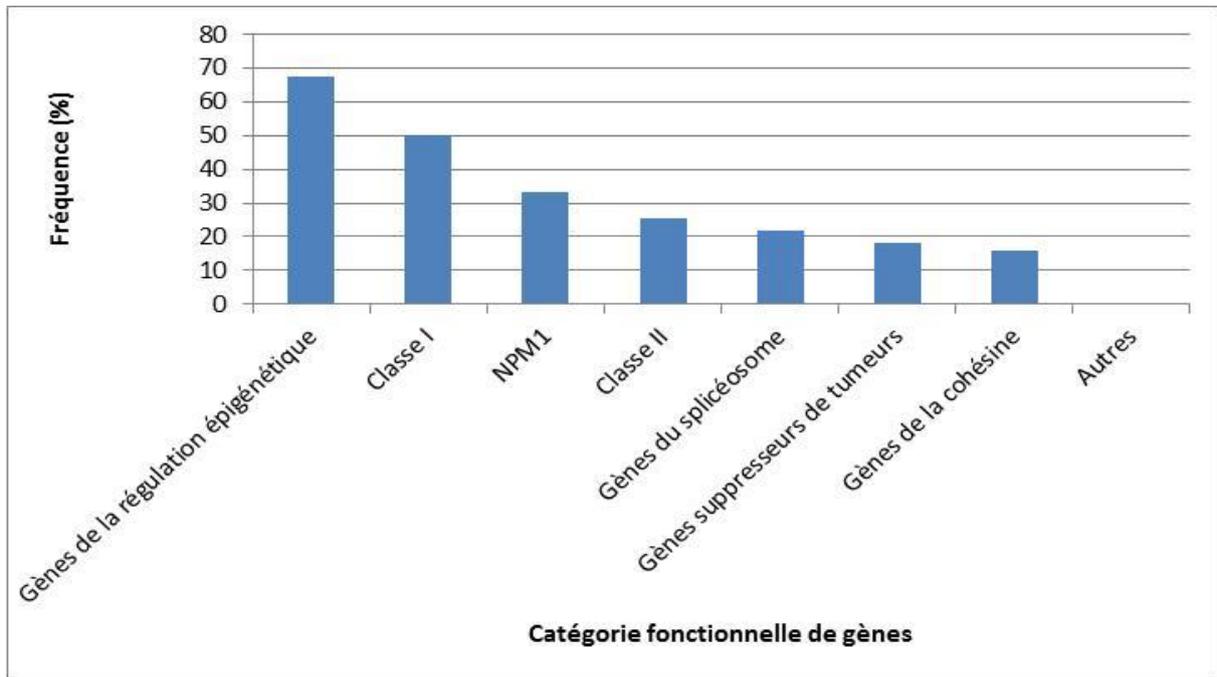


Figure 26 : Fréquence des mutations en fonction des gènes classés par catégorie fonctionnelle.

2) Dans les LAM-CN

Dans notre cohorte, 127 LAM sont à CN (tableau 11) et présentent 407 mutations, soit une médiane de 3 par patient.

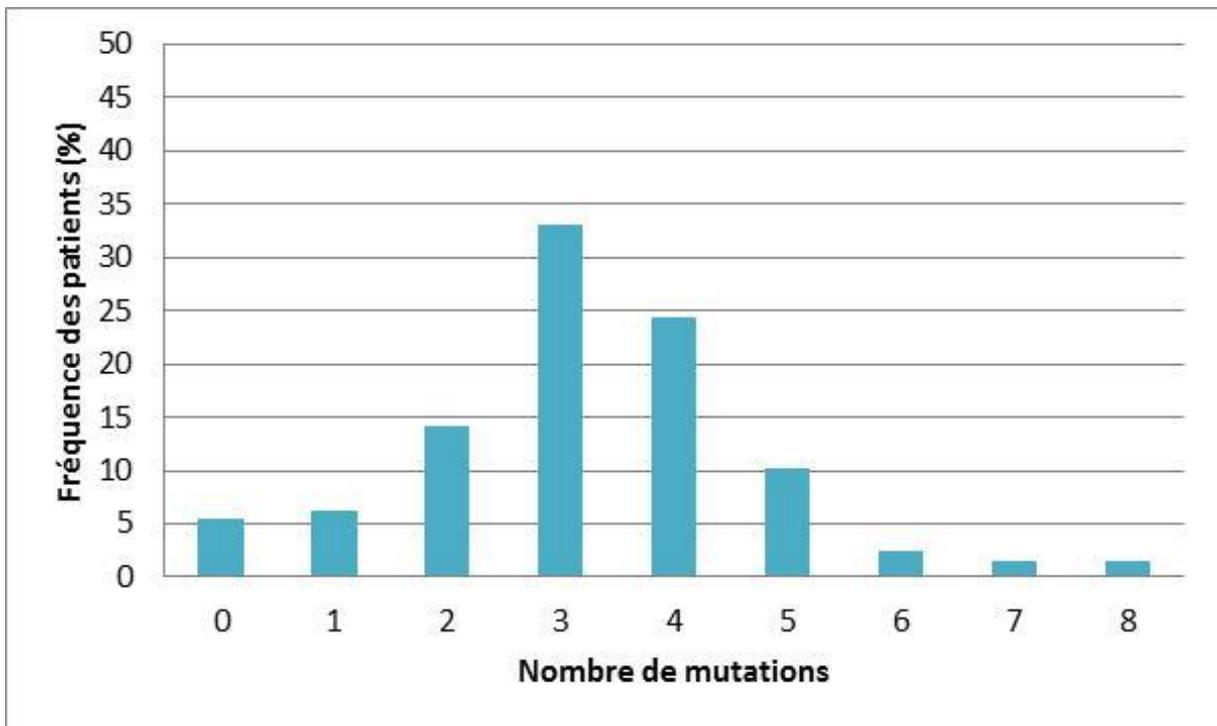


Figure 27 : Fréquence des patients (en %) en fonction du nombre de mutations

L'incidence des mutations dans les LAM à CN est représentée dans la figure 28.

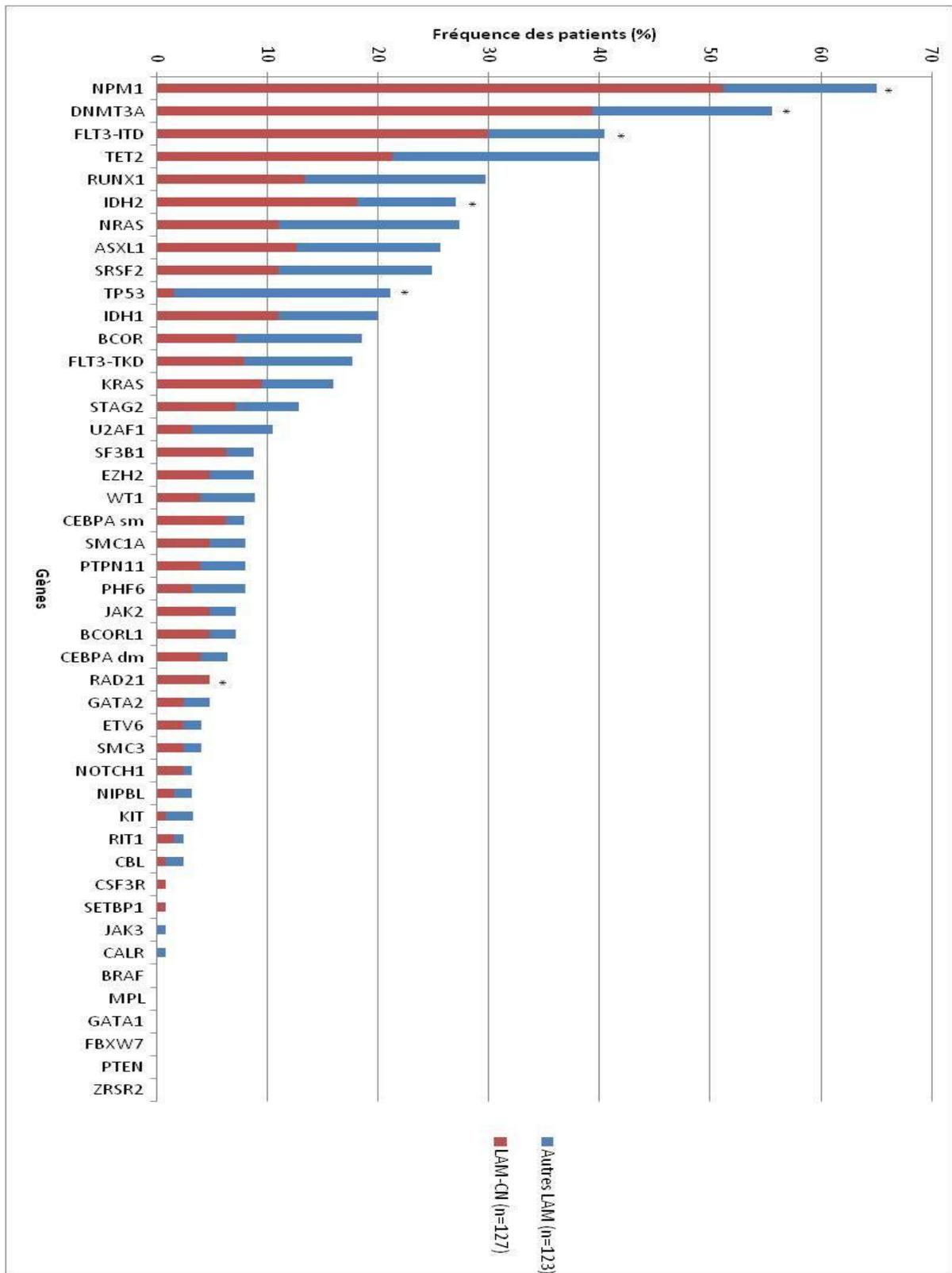


Figure 28 : Pourcentage de patients présentant une mutation en fonction des gènes étudiés dans les LAM-CN (rouge) et les autres LAM (bleu)

Les mutations de *NPM1* ($p < 0,001$), *DNMT3A* ($p < 0,001$), *FLT3-ITD* ($p < 0,001$) et *IDH2* ($p < 0,05$) sont significativement plus représentées dans les LAM-CN. Au contraire, les mutations de *TP53* ($p < 0,001$) et *RAD21* ($p < 0,05$) sont significativement plus fréquentes dans les autres LAM.

3) En fonction du groupe cytogénétique

L'étude de la fréquence des mutations a ensuite été réalisée en fonction des groupes cytogénétiques (favorable, intermédiaire, et défavorable). La classification a été possible pour 224 patients de notre cohorte (tableau 11) selon les critères révisés MRC [13].

On recense 522 mutations dans le groupe cytogénétique intermédiaire, 120 mutations dans le groupe cytogénétique défavorable et 14 mutations dans le groupe cytogénétique favorable. Le nombre moyen de mutations par patient est représenté sur la figure 29.

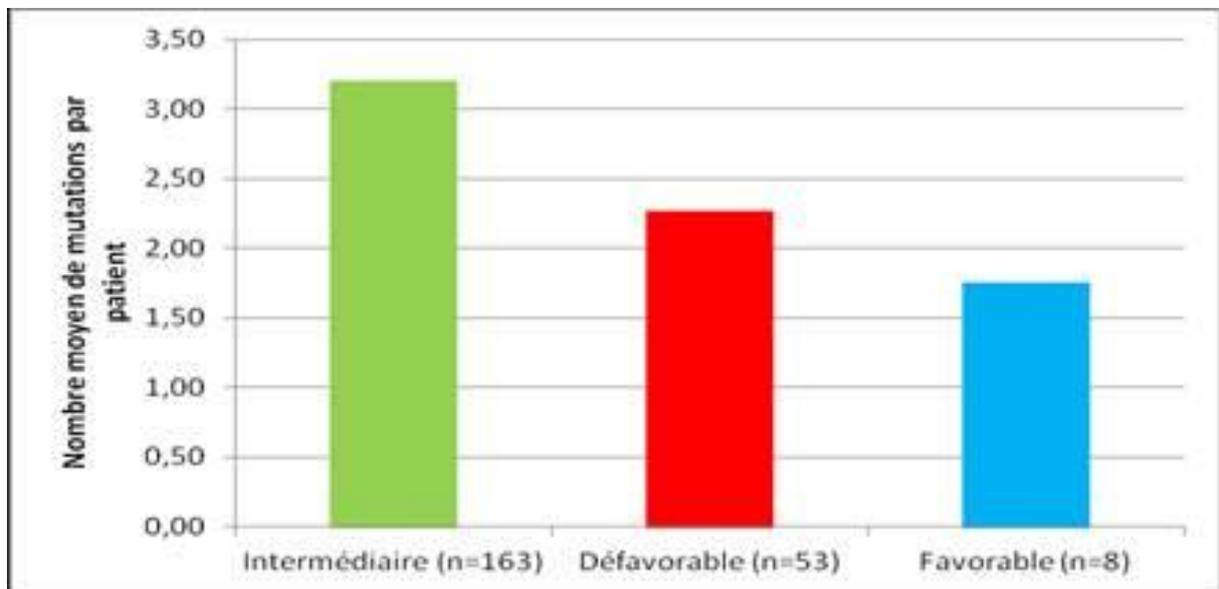


Figure 29 : Nombre de mutations par patient en fonction du groupe cytogénétique

L'incidence des mutations est retranscrite dans le tableau 13 en fonction des groupes cytogénétiques : intermédiaire et défavorable. L'analyse n'a pas été réalisée dans le groupe cytogénétique favorable à cause de la faible proportion de patient (n=8).

	Intermédiaire n=163	Défavorable n=53	p
<i>NPM1</i> , n (%)	66 (94.3)	4 (5.7)	<0.001*
Classe I, n (%)	89 (78.8)	20 (17.7)	0.04*

<i>FLT3-ITD, n (%)</i>	43 (93.5)	3 (6.5)	<0.001*
<i>FLT3-TKD, n (%)</i>	13 (75.2)	2 (11.1)	0.37
<i>KIT, n (%)</i>	1 (25)	1 (25)	0.43
<i>NRAS, n (%)</i>	20 (64.5)	10 (32.3)	0.25
<i>KRAS, n (%)</i>	14 (73.7)	5 (26.3)	0.79
<i>RIT1, n (%)</i>	1 (50)	1 (50)	0.43
<i>PTPN11, n (%)</i>	5 (55.6)	4 (44.4)	0.23
<i>JAK2, n (%)</i>	7 (87.5)	1 (12.5)	0.68
<i>JAK3, n (%)</i>	0	1 (1000)	0.24
<i>MPL, n (%)</i>	0	0	
<i>CBL, n (%)</i>	1 (33.3)	1 (33.3)	0.43
<i>CSF3R, n(%)</i>	1 (100)	0	1
<i>SETBP1, n (%)</i>	1 (100)	0	1
Classe II, n (%)	52 (82.5)	11 (17.5)	0.16
<i>CEBPA dm, n (%)</i>	8 (100)	0	0.20
<i>CEBAP sm, n (%)</i>	9 (90)	1 (10)	0.46
<i>RUNX1, n (%)</i>	29 (80.6)	7 (19.4)	0.53
<i>GATA1, n (%)</i>	0	0	
<i>GATA2, n (%)</i>	4 (66.7)	2 (33.3)	0.64
<i>ETV6, n (%)</i>	4 (80)	1 (20)	1
<i>NOTCH1, n (%)</i>	3 (75)	1 (25)	1
<i>FBXW7, n (%)</i>	0	0	
Gènes de la régulation épigénétique, n (%)	125 (81.2)	25 (16.2)	<0.001*
<i>DNMT3A, n (%)</i>	58 (92.1)	5 (7.9)	<0.001*
<i>TET2, n (%)</i>	36 (76.6)	10 (21.3)	0.70

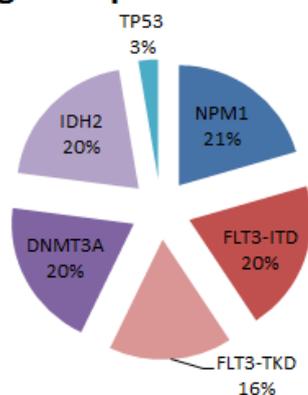
<i>IDH1, n (%)</i>	19 (82.6)	4 (17.4)	0.61
<i>IDH2tot, n (%)</i>	29 (93.5)	2 (6.5)	0.01*
<i>IDH2R140, n (%)</i>	19 (90.5)	2 (9.5)	0.11
<i>IDH2R172, n (%)</i>	10 (100)	0	0.12
<i>EZH2, n (%)</i>	7 (63.6)	3 (27.3)	0.71
<i>ASXL1, n (%)</i>	25 (83.3)	3 (10)	0.10
<i>BCOR, n (%)</i>	15 (75)	5 (25)	1
<i>BCORL1, n (%)</i>	7 (77.8)	1 (11.1)	0.70
Gènes suppresseur de tumeurs, n (%)	17 (40.5)	25 (59.5)	<0.001*
<i>TP53, n (%)</i>	3 (12)	22 (88)	<0.001*
<i>WT1, n (%)</i>	8 (80)	2 (20)	1
<i>PHF6, n (%)</i>	7 (77.8)	2 (22.2)	1
<i>PTEN, n (%)</i>	0	0	
Gènes de la cohésine, n (%)	28 (77.8)	6 (16.7)	0.40
<i>U2AF1, n (%)</i>	9 (75)	3 (25)	1
<i>SRSF2, n (%)</i>	22 (81.5)	5 (18.5)	0.63
<i>SF3B1, n (%)</i>	7 (77.8)	2 (22.2)	1
<i>ZRSR2, n (%)</i>	0	0	
Gènes du splicéosome, n (%)	39 (79.2)	10 (20.8)	0.57
<i>STAG2, n (%)</i>	10 (71.4)	4 (28.6)	0.75
<i>RAD21, n (%)</i>	6 (100)	0	0.34
<i>SMC1A, n (%)</i>	7 (77.8)	1 (11.1)	1
<i>SMC3, n (%)</i>	3 (75)	0	1

<i>NIPBL, n (%)</i>	3 (75)	1 (0)	1
<i>Autres, n (%)</i>	1 (100)	0	1
<i>CALR, n (%)</i>	1 (100)	0	1

Tableau 13 : Incidence des mutations en fonction des groupes cytogénétiques (intermédiaire et défavorable).

Les mutations de *NPM1* ($p < 0.001$), les mutations de classe I ($p < 0,05$) telles que *FLT3-ITD* ($p < 0.001$), ainsi que les gènes impliqués dans la régulation épigénétique ($p < 0.001$) et notamment *DNMT3A* ($p < 0.001$) et *IDH2* ($p < 0.05$) sont significativement plus fréquentes dans le sous groupe cytogénétique intermédiaire. Au contraire les mutations des gènes suppresseurs de tumeur ($p < 0.001$) et notamment de *TP53* ($p < 0.001$) sont significativement plus représentées dans le groupe cytogénétique défavorable.

Cytogénétique Intermédiaire



Cytogénétique défavorable

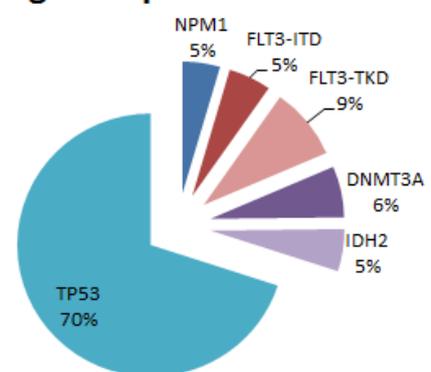


Figure 30 : Représentation schématique des mutations en fonction du groupe cytogénétique

C Analyse des VAFs

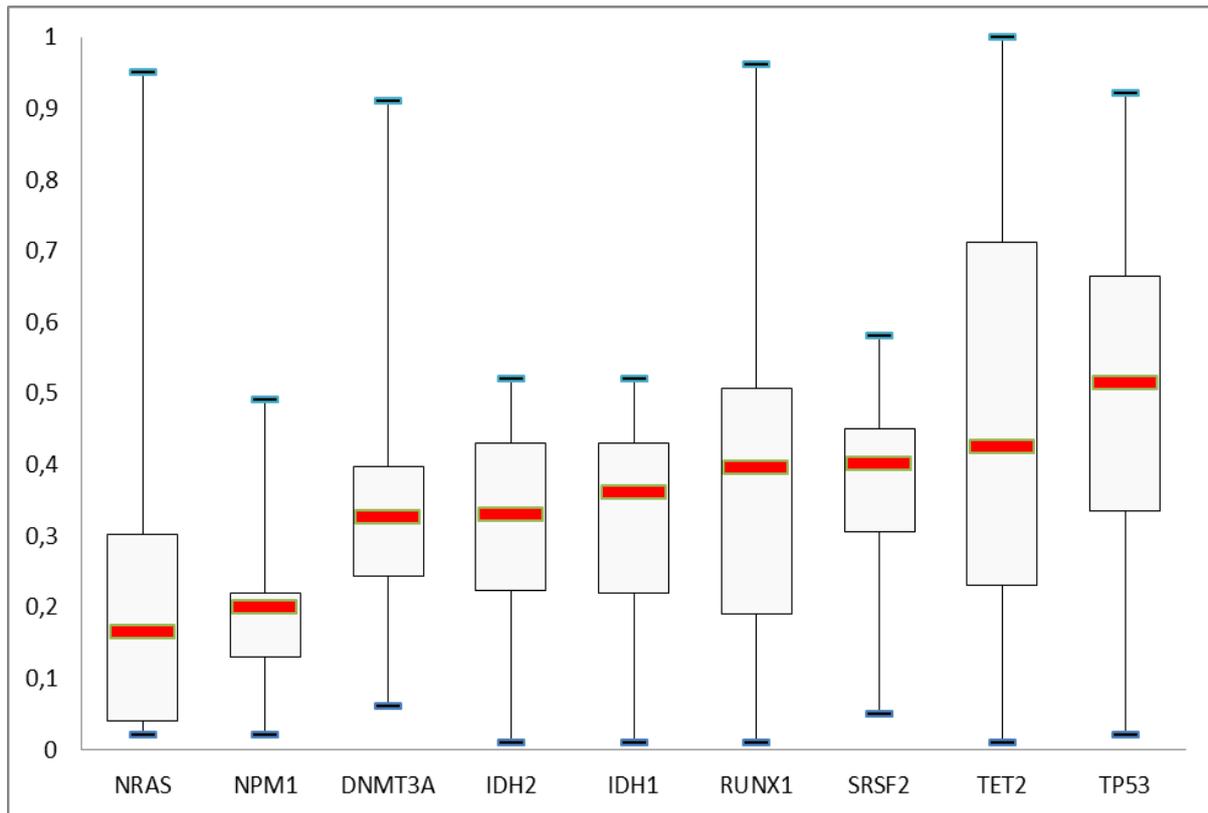


Figure 31 : Analyse des VAFs des différentes mutations sur la cohorte globale

L'analyse des VAFs a été réalisée sur les gènes mutés à une fréquence de 10% dans notre cohorte à l'exception d'*ASXL1* et de *FLT3-ITD*. En effet, au vu de nos résultats, les duplications en tandem de *FLT3* ont été vérifiées par analyse de fragment et rendues sous forme de ratio (*FLT3mut/FLT3wt*). De plus, les VAFs des mutations d'*ASXL1* et notamment la duplication d'une guanine au sein d'un homopolymère de 8 guanines (exon 13 c.1934dupG : p.G646WfsX12) ne semblent pas fiables. Les mutations de *NPM1* et de *NRAS* ont des VAFs moyens inférieurs à ceux des mutations impliquant une dérégulation de l'épigénétique (*DNMT3A*, *IDH2*, *IDH1* et *TET2*), les mutations de *RUNX1*, de *SRSF2* et de *TP53*. Cela suggère que les altérations des gènes de la régulation épigénétique, de *RUNX1*, *SRSF2* et *TP53* sont des événements précoces dans la leucémogénèse. Un biais peut être néanmoins identifié pour les VAFs des mutations de *NPM1* car les indels sont moins bien détectés par le NGS ainsi que pour les mutations de *TP53* qui sont fréquemment associées aux UPD.

D Corrélations entre les mutations

La corrélation biologique entre les mutations est représentée schématiquement sur la figure 32.

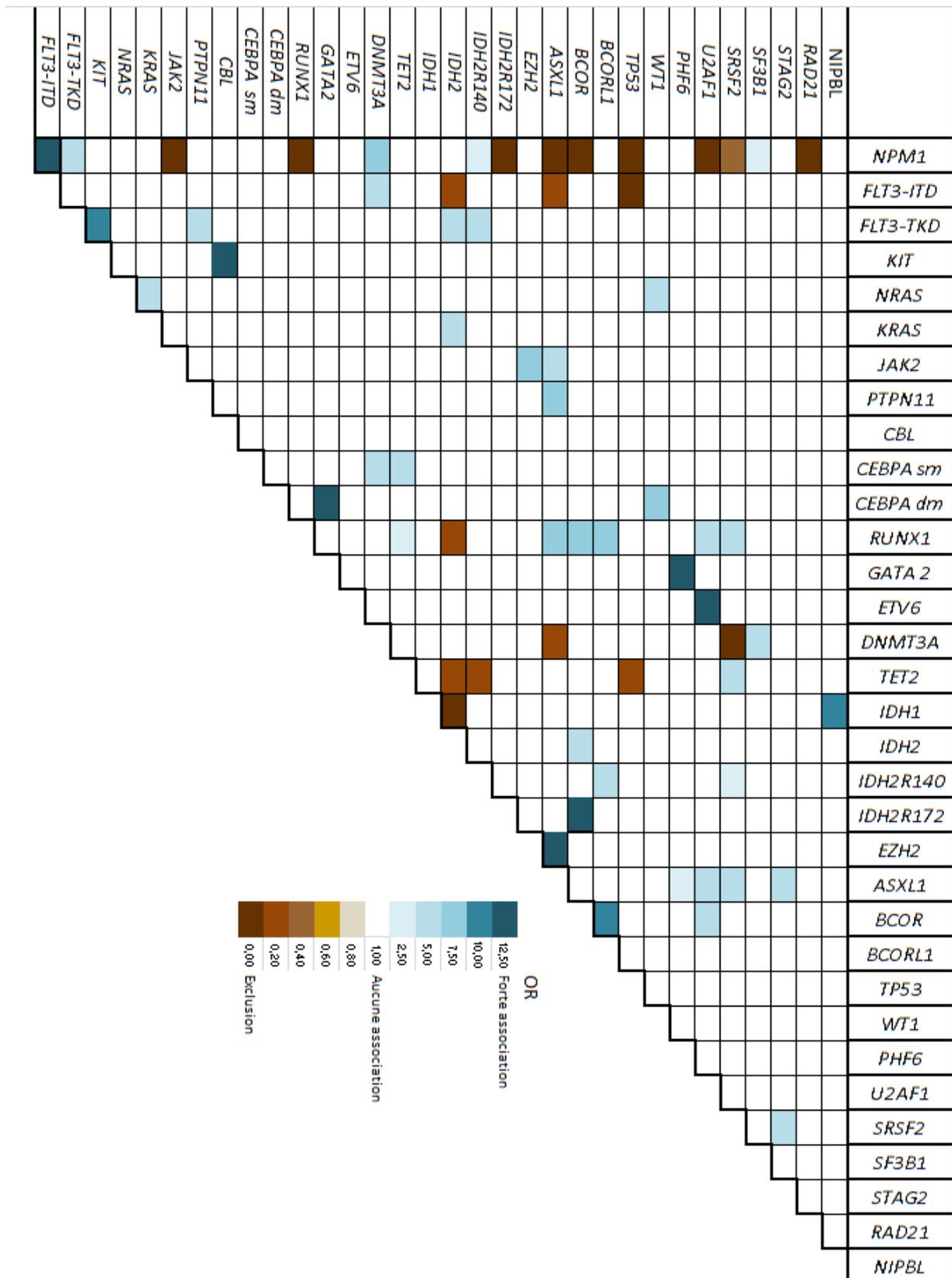


Figure 32 : Corrélation biologique significative ($p < 0.05$ et $p < 0.001$) entre les différents gènes étudiés, mise en évidence par Odds ratio. La couleur bleue correspond à une association alors que la couleur marron correspond à une exclusion.

E Données générales de survie

1) Suivi médian

Le suivi médian des 250 patients est de 3.82 ans soit 3 ans et 9 mois (intervalle de confiance à 95% ou IC95% à [3.60; 4.15]).

2) Impact sur la mise en RC

a) Analyse univariée

Certains paramètres résumés dans le tableau 14, ont démontré par une analyse univariée leur impact sur la mise ou non en RC dans la cohorte globale : notamment les mutations de *NPM1* ($p < 0.05$) et de *FLT3-ITD* ($p < 0.05$) favorisent la mise en RC au contraire des mutations de *TP53* ($p < 0.001$) et d'*U2AF1* ($p < 0.05$).

	Mise en RC	Echec d'induction	p
Age	176	74	0.09
Leucocytose au diagnostic (G/L)	175	74	0.89
<i>NPM1</i> , n (%)	67 (81.7)	15 (18.3)	0.008*
Classe I, n (%)	95 (76)	30 (24)	0.07
<i>FLT3-ITD</i> , n (%)	43 (84.3)	8 (15.7)	0.016*
<i>FLT3-TKD</i> , n (%)	16 (72.7)	6 (27.3)	1
<i>NRAS</i> , n (%)	23 (67.6)	11 (32.4)	0.69
<i>KRAS</i> , n (%)	15 (71.4)	6 (28.6)	1
Classe II, n (%)	48 (75)	16 (25)	0.43
<i>CEBPA dm</i> , n (%)	7 (87.5)	1 (12.5)	0.44
<i>CEBPA sm</i> , n (%)	6 (60)	4 (40)	0.50
<i>RUNX1</i> , n (%)	26 (70.3)	11 (29.7)	1

Gènes de régulation de l'épigénétique, n (%)	117 (69.2)	52 (30.8)	0.66
<i>DNMT3A, n (%)</i>	54 (77.1)	54 (22.9)	0.17
<i>TET2, n (%)</i>	33 (66)	17 (34)	0.49
<i>IDH1, n (%)</i>	18 (69.2)	8 (30.8)	1
<i>IDH2tot, n (%)</i>	26 (76.5)	8 (23.5)	0.54
<i>IDH2R140, n (%)</i>	19 (86.4)	3 (13.6)	0.09
<i>IDH2R172, n (%)</i>	7 (58.3)	5 (41.7)	0.35
<i>ASXL1, n (%)</i>	22 (68.7)	10 (31.3)	0.84
<i>BCOR, n (%)</i>	15 (65.2)	8 (34.8)	0.63
Gènes suppresseurs de tumeurs, n (%) (sans mutations de TP53)	15 (79)	4 (21)	0.60
<i>TP53, n (%)</i>	9 (34.6)	17 (65.4)	<0.001*
Gènes de la cohésine, n (%)	26 (65)	14 (35)	0.45
<i>U2AF1, n (%)</i>	5 (38.5)	8 (61.5)	0.02*
<i>SRSF2, n (%)</i>	21 (67.7)	10 (32.3)	0.83
Gènes du splicéosome, n (%)	35 (63.6)	20 (36.4)	0.24
<i>STAG2, n (%)</i>	9 (56.2)	7 (43.8)	0.26

Tableau 14 : Impact des mutations sur la mise en RC des patients dans la cohorte globale

b) Analyse multivariée

Sur la cohorte globale, l'analyse multivariée montre que seules les mutations de *TP53* et d'*U2AF1* impactent significativement ($p < 0.05$) la mise en RC (tableau 15).

	Odds Ratio	P	IC95%
Âge	0.96	0.16	[0.91-1.01]
<i>NPM1</i>	1.04	0.93	[0.47-2.30]
<i>FLT3-ITD</i>	2.18	0.11	[0.84-5.69]
<i>IDH2R140</i>	2.34	0.21	[0.62-8.79]
<i>TP53</i>	0.22	0.001*	[0.087-0.53]
<i>U2AF1</i>	0.23	0.02*	[0.069-0.80]

Tableau 15 : Impact sur la mise en RC des paramètres de l'étude en analyse multivariée

Dans le groupe cytogénétique intermédiaire (n=163) seule la mutation de *NPM1* influence significativement la mise en RC ($p < 0.05$).

	Mise en RC	Echec d'induction	p
<i>NPM1, n (%)</i>	59 (89.4)	7 (10.6)	0.02*
<i>FLT3-ITD, n (%)</i>	38 (88.4)	5 (11.6)	0.18

Tableau 16 : Impact des mutations de *NPM1* et *FLT3-ITD*, dans le groupe cytogénétique intermédiaire, sur la mise en RC

Nous avons mis en évidence l'effet bénéfique de l'introduction du GO lors de la chimiothérapie d'induction sur la mise en RC des patients porteurs de la mutation *FLT3-ITD* ($p < 0.05$).

	Mise en RC	Echec d'induction	p
<i>FLT3-ITD, n (%)</i>	22 (95.7)	1 (4.3)	0.002*
Bras B (GO)			
<i>FLT3-ITD, n (%)</i>	21 (75)	7 (25)	0.64
Bras A (Contrôle)			

Tableau 17 : Intérêt de l'introduction du GO chez les patients porteurs de la mutation *FLT3-ITD*

3) RFS

La RFS à 4 ans est de 29% sur la cohorte totale. En fonction du bras de l'étude, elle est de 20% dans le bras A et de 36% dans le bras B. Plusieurs paramètres de notre étude ont été

testés afin de connaître leurs impacts positifs ou négatifs sur la RFS dans la cohorte globale mais également après randomisation.

Sur la cohorte globale, le risque de rechute à 4 ans est significativement diminué en cas de mutation d'*IDH2* et notamment la mutation d'*IDH2R140* ($p < 0.05$). Au contraire, le risque est augmenté en cas de mutation d'*IDH1* ($p < 0.05$), de *JAK2* ($p < 0.05$), *TP53* ($p < 0.001$), *SF3B1* ($p < 0.05$) ou d'un caryotype défavorable. Ces résultats sont résumés dans le tableau 18 et les figures 33 et 34.

	Cohorte Globale			Fonction du bras de randomisation		
	HR	P	IC95%	HR	p	IC95%
Age	1.01	0.52	[0.98-1.04]	ND		
Leucocytose au diagnostic (G/L)	1.00	0.59	[0.99-1.00]	ND		
<i>NPM1</i>	0.90	0.56	[0.63-1.29]	0.57	0.13	[0.28-1.17]
Classe I	1.34	0.09	[0.95-1.88]	0.39	0.007*	[0.19-0.78]
<i>FLT3-ITD</i>	1.20	0.37	[0.80-1.80]	0.50	0.10	[0.22-1.13]
<i>FLT3-TKD</i>	0.84	0.58	[0.45-1.56]	0.28	0.06	[0.08-1.03]
<i>NRAS</i>	1.09	0.73	[0.67-1.80]	0.41	0.09	[0.15-1.13]
<i>KRAS</i>	1.06	0.86	[0.58-1.91]	0.6	0.41	[0.18-2.00]
<i>JAK2</i>	3.19	0.001*	[1.61-6.33]	0.41	0.23	[0.10-1.74]
Classe II	1.00	0.97	[0.69-1.47]	1.92	0.09	[0.90-4.09]
<i>CEBPA dm</i>	0.48	0.21	[0.15-1.50]	1.14	0.91	[0.10-12.9]
<i>CEBPA sm</i>	0.49	0.23	[0.15-1.55]	ND		
<i>RUNX1</i>	1.23	0.36	[0.79-1.91]	1.32	0.54	[0.55-3.21]
Gènes de régulation épigénétique	1.02	0.96	[0.45-2.32]	1.02	0.97	[0.49-2.09]
<i>DNMT3A</i>	1.29	0.17	[0.89-1.87]	0.75	0.47	[0.35-1.61]
<i>TET2</i>	1.14	0.55	[0.74-1.73]	1.22	0.65	[0.52-2.85]

<i>IDH1</i>	1.76	0.03*	[1.07-2.91]	1.65	0.33	[0.61-4.48]
<i>IDH2tot</i>	0.54	0.03*	[0.32-0.93]	1.09	0.88	[0.37-3.19]
<i>IDH2R140</i>	0.54	0.05*	[0.29-1.00]	0.86	0.81	[0.25-2.96]
<i>IDH2R172</i>	0.62	0.35	[0.23-1.68]	1.95	0.51	[0.27-14.3]
<i>EZH2</i>	1.22	0.64	[0.54-2.76]	ND		
<i>ASXL1</i>	1.13	0.61	[0.70-1.82]	2.15	0.12	[0.83-5.60]
<i>BCOR</i>	1.05	0.87	[0.57-1.95]	1.47	0.56	[0.41-5.29]
<i>BCORL1</i>	0.61	0.33	[0.22-1.65]	ND		
Gènes suppresseurs de tumeur (sans mutations de TP53)	1.02	0.96	[0.55-1.88]	0.48	0.25	[0.14-1.67]
<i>TP53</i>	4.17	<0.001*	[2.21-7.86]	1.91	0.31	[0.55-6.61]
<i>WT1</i>	1.15	0.72	[0.54-2.46]	ND		
<i>PHF6</i>	0.85	0.74	[0.31-2.29]	ND		
Gènes de la cohésine	1.29	0.26	[0.83-2.00]	1.51	0.36	[0.62-3.67]
<i>SRSF2</i>	1.19	0.49	[0.73-1.93]	0.68	0.46	[0.24-1.91]
<i>U2AF1</i>	1.19	0.64	[0.58-2.43]	1.73	0.51	[0.34-8.94]
<i>SF3B1</i>	2.33	0.01*	[1.18-4.60]	ND		
Gène du spliceosome	1.44	0.06	[0.98-2.12]	1.0	0.99	[0.46-2.22]
<i>STAG2</i>	1.20	0.59	[0.61-2.37]	1.68	0.46	[0.43-6.56]
<i>SMC1A</i>	0.79	0.70	[0.25-2.50]	ND		
Cytogénétique défavorable	3.02	0.04*	[1.04-8.78]	ND		

Tableau 18 : Impact des mutations et du bras de traitement sur la RFS à 4 ans

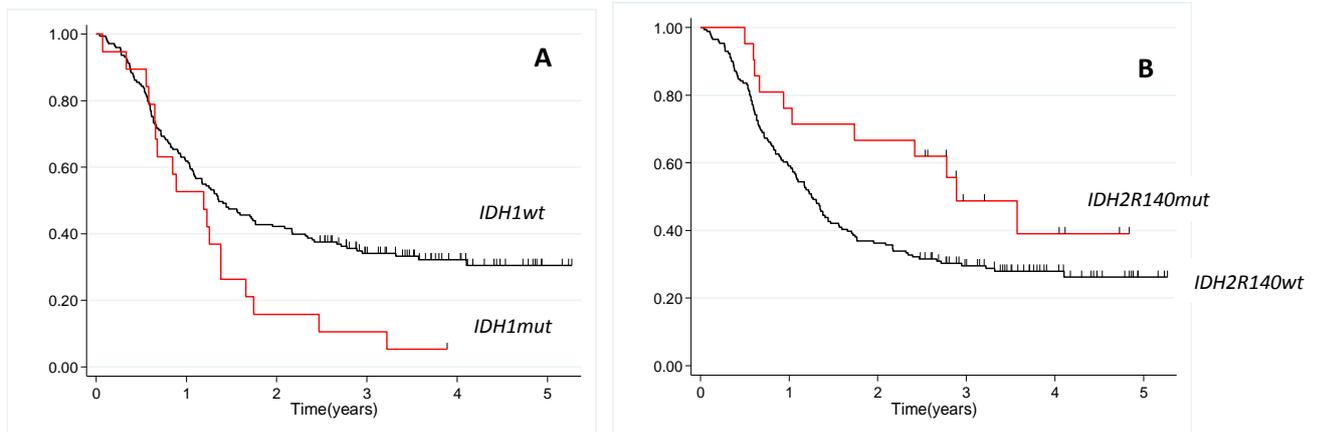


Figure 33 : RFS en fonction de la mutation d'*IDH1* (A) et d'*IDH2R140* (B).

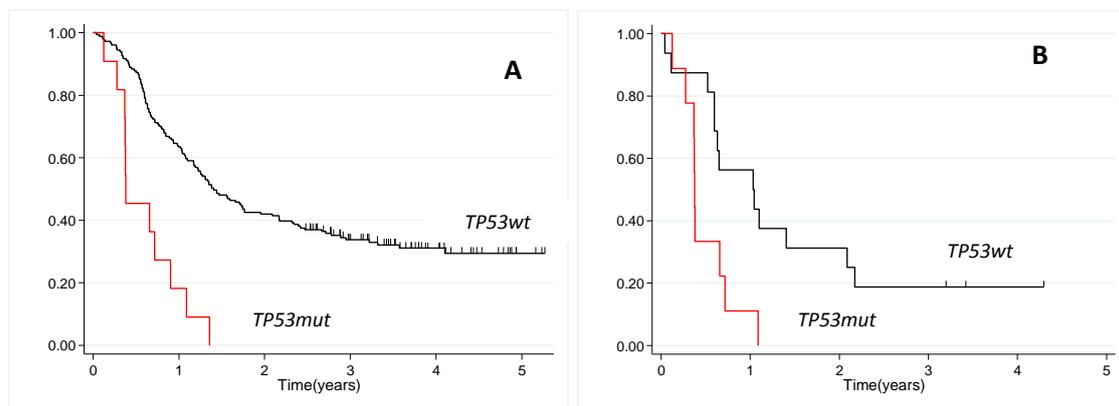


Figure 34 : RFS en fonction de la mutation de *TP53* dans la cohorte globale (A) et dans le groupe de patients à caryotype défavorable (B).

Nous mettons également en évidence sur notre cohorte que l'association des mutations *NPM1*, *FLT3-ITD* et *DNMT3A* diminue significativement la RFS à 4 ans ($p < 0,05$).

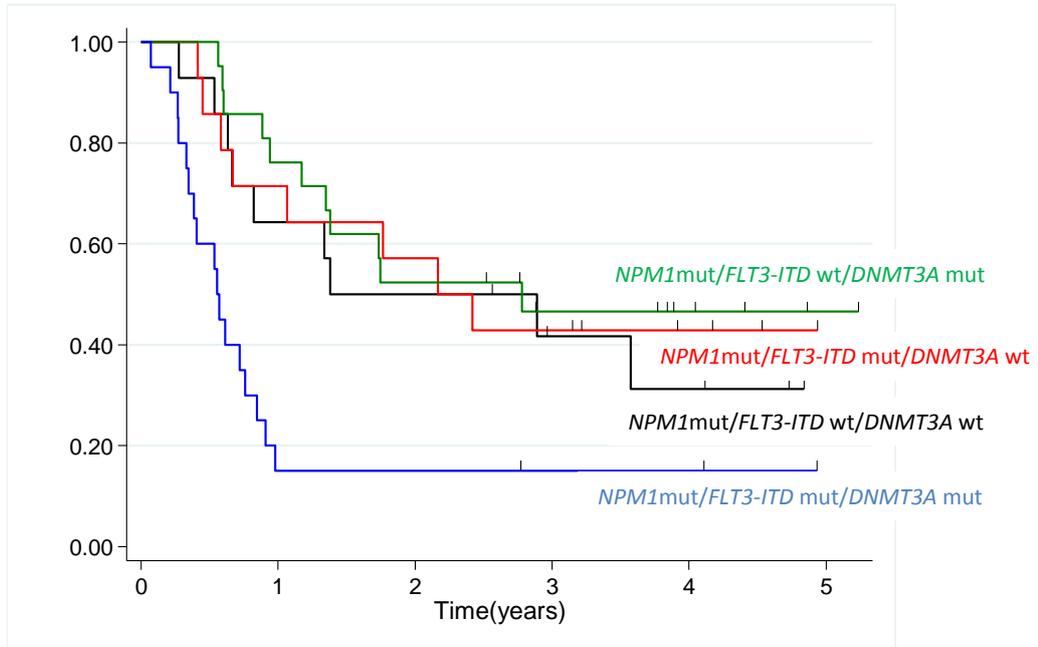


Figure 35 : RFS à 4 ans en fonction de l'association des mutations *NPM1*, *FLT3-ITD*, et *DNMT3A*

L'inclusion d'un second paramètre : le bras de l'étude a permis de visualiser l'intérêt de l'introduction du GO (tableau 18), diminuant ainsi significativement le risque de rechute à 4 ans ($p < 0.05$). En présence de la mutation de *FLT3-ITD*, la RFS à 4 ans est de 45% en présence du traitement par le GO (vs 33%). Ce résultat est visualisé par les courbes de survie (figure 36) et une représentation graphique : forest plot (figure 37).

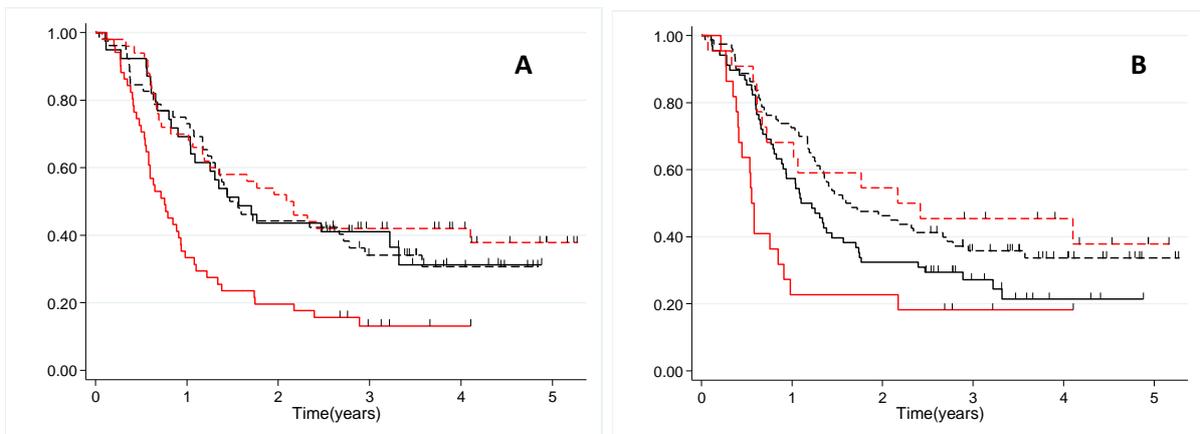


Figure 36 : RFS en fonction du bras de traitement (bras A= trait plein et bras B= traits pointillés) et des mutations (rouge) de classe I (A) et de *FLT3-ITD* (B).

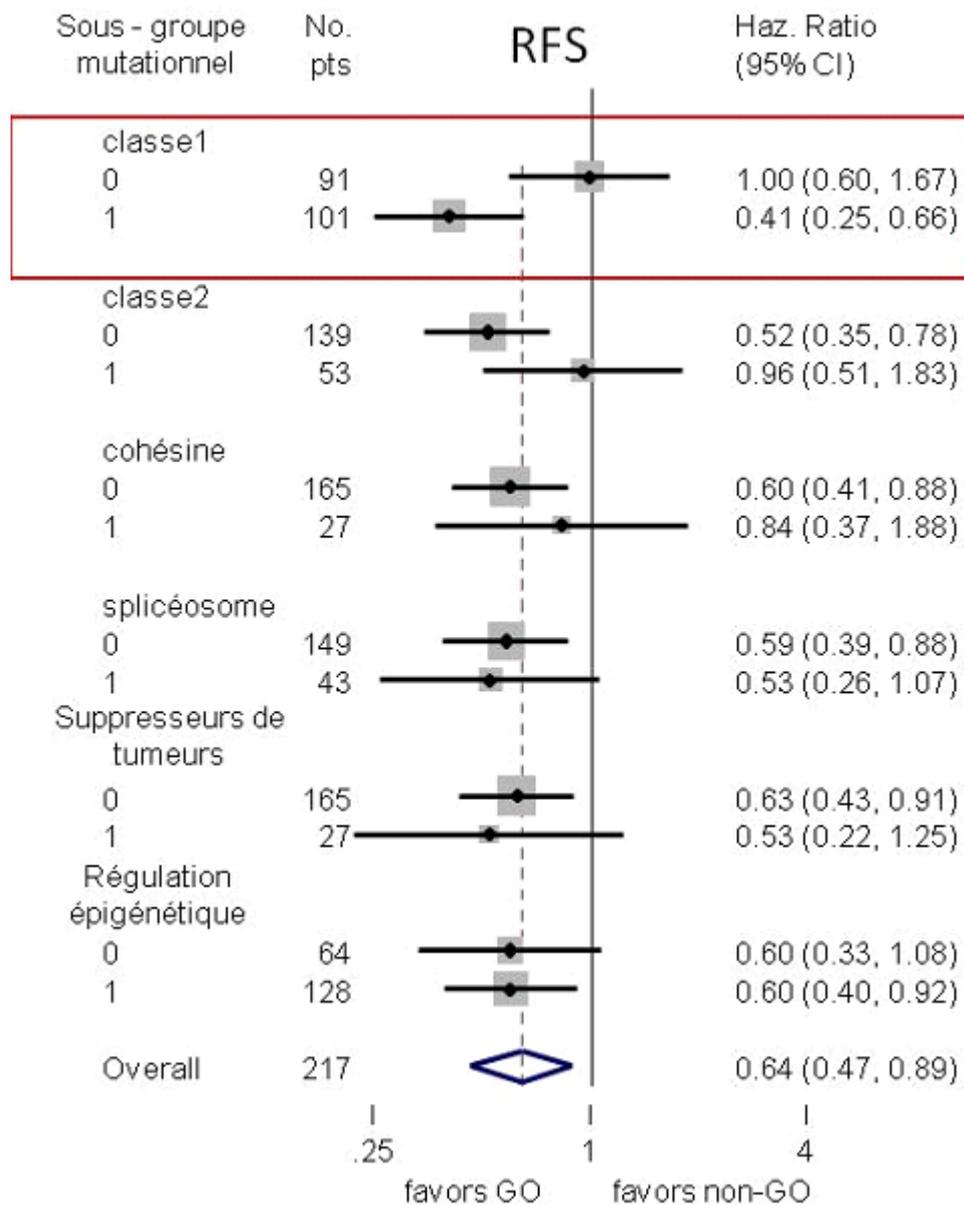


Figure 37 : forest plot de la RFS en fonction du bras de traitement et du sous groupe mutationnel

4) Survie globale

L'OS à 4 ans est de 33% sur la cohorte totale. En fonction du bras de l'étude, elle est de 28% dans le bras A et de 37% dans le bras B.

L'analyse univariée de l'OS des différents paramètres de l'étude est résumée dans le tableau 19. Elle est significativement augmentée en cas de mutation d'*IDH2*, principalement la mutation *IDH2R140* ($p < 0.05$; figure 38). Au contraire, la survie des patients porteurs d'une mutation pour *TP53* est très diminuée dans la cohorte globale ($p < 0.001$) et dans le groupe cytogénétique défavorable ($p < 0.05$; figure 39).

	Cohorte Totale n=250			Fonction du bras de randomisation (intérêt de l'ajout de GO)		
	HR	P	IC95%	HR	p	IC95%
Age	1.02	0.25	[0.99-1.05]	ND		
Leucocytose au diagnostic (G/L)	1.00	0.15	[0.99-1.00]	ND		
<i>NPM1</i>	0.71	0.06	[0.50-1.00]	0.55	0.09	[0.27-1.10]
Classe I	1.08	0.061	[0.80-1.48]	0.5	0.03*	[0.27-0.94]
<i>FLT3-ITD</i>	1.13	0.53	[0.77-1.65]	0.039	0.02*	[0.18-0.85]
<i>FLT3-TKD</i>	0.083	0.52	[0.47-1.46]	0.69	0.94	[0.28-3.25]
<i>NRAS</i>	1.10	0.68	[0.70-1.70]	0.62	0.30	[0.26-1.51]
<i>KRAS</i>	1.10	0.99	[0.58-1.74]	0.82	0.72	[0.27-2.47]
<i>PTPN11</i>	0.88	0.77	[0.39-2.00]	ND		
<i>JAK2</i>	1.82	0.08	[0.93-3.57]	0.98	0.98	[0.24-4.06]
Classe II	0.9	0.58	[0.63-1.29]	1.84	0.10	[0.90-3.78]
<i>CEBPA dm</i>	0.46	0.1	[0.15-1.44]	4.11	0.25	[0.37-46.3]
<i>CEBPA sm</i>	0.69	0.42	[0.28-1.69]	ND		
<i>RUNX1</i>	1.13	0.56	[0.75-1.71]	1.22	0.64	[0.53-2.80]
Gènes de régulation épigénétique	0.97	0.84	[0.70-1.34]	0.83	0.59	[0.43-1.61]
<i>DNMT3A</i>	1.12	0.53	[0.79-1.57]	0.91	0.80	[0.46-1.82]
<i>TET2</i>	1.40	0.07	[0.97-2.00]	0.93	0.84	[0.45-1.91]
<i>IDH1</i>	1.29	0.29	[0.81-2.06]	1.83	0.21	[0.71-4.67]
<i>IDH2tot</i>	0.50	0.012*	[0.29-0.86]	0.67	0.49	[0.21-2.08]

<i>IDH2R140</i>	0.34	0.006*	[0.16-0,73]	0.78	0.75	[0.17-3.60]
<i>IDH2R172</i>	0.99	0.98	[0.46-2.11]	0.73	0.71	[0.14-3.89]
<i>EZH2</i>	1.17	0.67	[0.57-2.38]	ND		
<i>ASXL1</i>	1.12	0.63	[0.72-1.74]	1.29	0.58	[0.53-3.11]
<i>BCOR</i>	1.47	0.14	[0.89-2.42]	0.91	0.86	[0.33-2.54]
<i>BCORL1</i>	0.71	0.44	[0.29-1.72]	ND		
Gènes suppresseurs de tumeur (sans mutations de TP53)	0.76	0.39	[0.41-1.41]	0.54	0.34	[0.15-1.91]
<i>TP53</i>	4.52	<0.001*	[2.91-7.02]	0.93	0.87	[0.40-2.16]
<i>WT1</i>	0.93	0.85	[0.44-1.98]	ND		
<i>PHF6</i>	0.89	0.78	[0.39-2.00]	ND		
Gènes de la cohésine	1.14	0.53	[0.76-1.71]	1.19	0.68	[0.52-2.68]
<i>SRSF2</i>	1.16	0.50	[0.75-1.80]	0.70	0.42	[0.29-1.69]
<i>U2AF1</i>	1.28	0.45	[0.68-2.43]	1.85	0.45	[0.38-9.03]
<i>SF3B1</i>	0.76	0.50	[0.33-1.71]	ND		
Gène du spliceosome	1.11	0.56	[0.78-1.60]	1.34	0.44	[0.64-2.80]
<i>STAG2</i>	1.10	0.75	[0.61-1.98]	1.38	0.60	[0.42-4.55]
<i>SMC1A</i>	1.66	0.16	[0.81-3.38]	ND		
Cytogénétique défavorable	3.55	0.02*	[1.28-9.88]	ND		

Tableau 19 : Impact des mutations et du bras de traitement sur l'OS

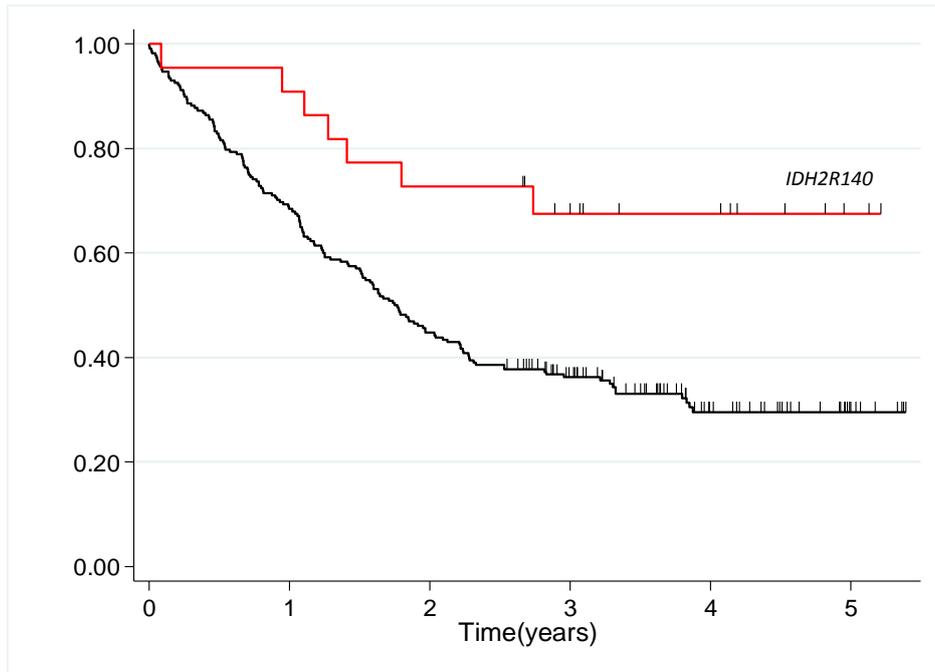


Figure 38 : OS en fonction de la mutation d'*IDH2R140*

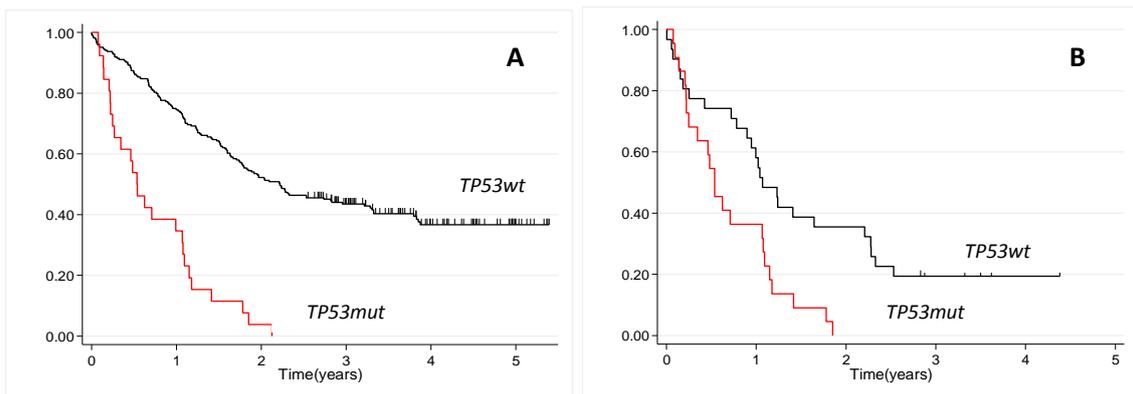


Figure 39 : OS en fonction de la mutation de *TP53* dans la cohorte totale (A, n=250) et dans le groupe de patients à caryotype défavorable (B, n=(53)).

Nous mettons également en évidence sur notre cohorte que l'association des mutations *NPM1*, *FLT3-ITD* et *DNMT3A* diminue significativement l'OS ($p < 0,05$).

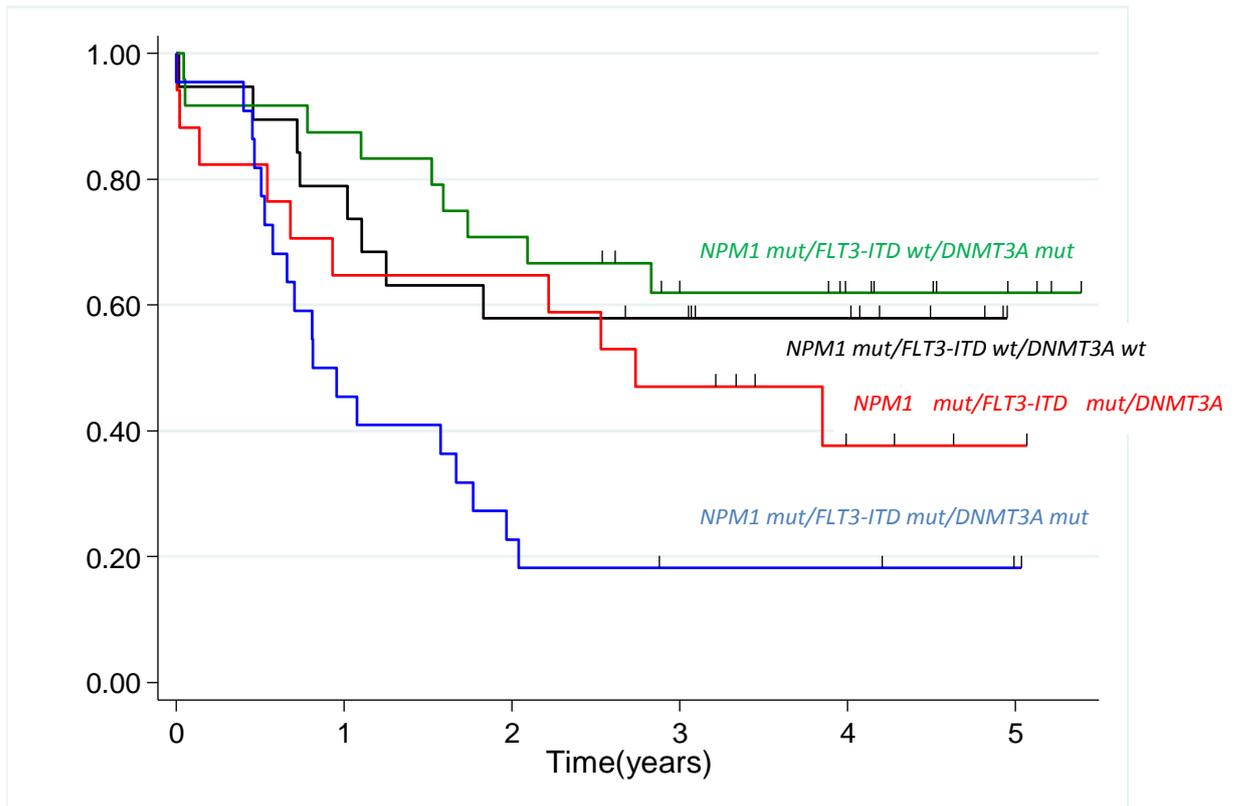


Figure 40 : OS en fonction de l'association des mutations *NPM1*, *FLT3-ITD*, et *DNMT3A*

L'inclusion d'un second paramètre : le bras de l'étude permet de visualiser l'intérêt d'introduire le GO en cas de mutations de classe I (plus particulièrement *FLT3-ITD*). Cette adjonction d'une nouvelle thérapie ciblée au traitement standard augmente ainsi significativement ($p < 0.05$) l'OS (tableau 19). Ce résultat a été représenté sous formes de courbe de survie (figure 41) et de forest plot (figure 42).

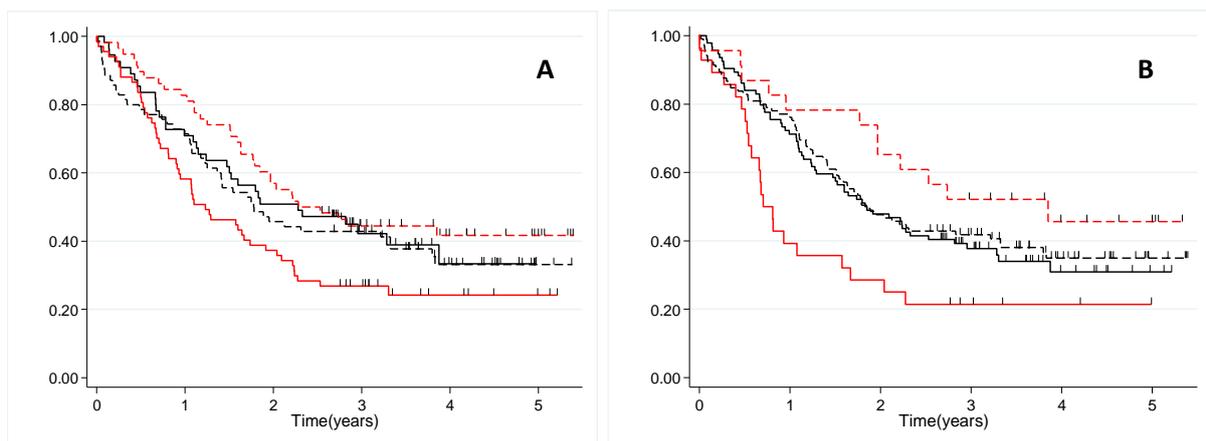


Figure 41 : OS en fonction du bras de traitement (bras A= trait plein et bras B= traits pointillés) et des mutations (rouge) de classe I (A) et de *FLT3-ITD* (B).

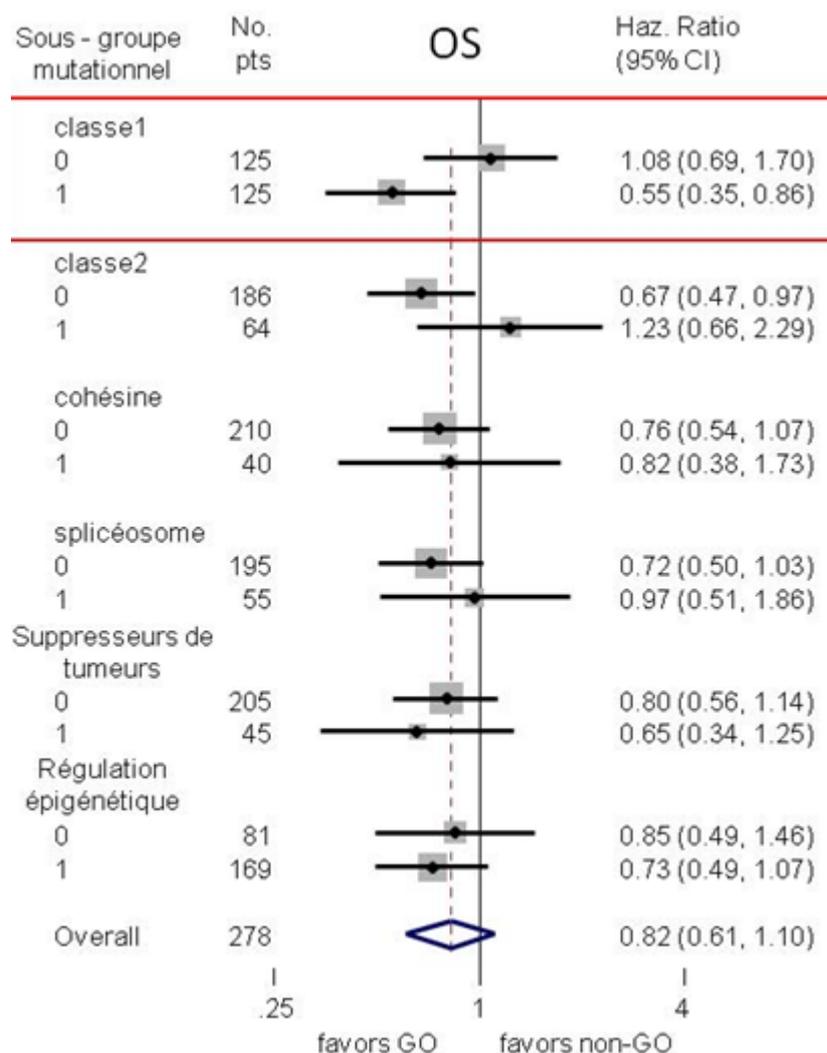


Figure 42 : forest plot sur l'OS en fonction du bras de traitement et du sous groupe mutationnel

VII Discussion

Les LAM constituent un groupe très hétérogène d'hémopathies. Comme de nombreux cancers, elles sont caractérisées par l'acquisition de multiples mutations somatiques affectant les gènes de différentes catégories fonctionnelles. En effet, ces mutations dites « drivers » [48] sont à l'origine d'une architecture clonale complexe et responsables de l'hétérogénéité phénotypique et de l'évolution de la pathologie. L'apport des nouvelles technologies de séquençage a permis de développer nos connaissances sur la pathogénèse moléculaire des LAM.

L'objectif de cette étude est de compléter nos connaissances sur l'incidence, les corrélations biologiques et cliniques ainsi que d'évaluer l'impact pronostique des mutations de 43 gènes impliqués dans les LAM, d'améliorer la compréhension du phénomène de leucémogénèse et d'optimiser le traitement d'induction ou de post rémission.

Notre cohorte est composée de patients âgés de 50 à 70 ans atteints de LAM *de novo* et inclus dans l'essai randomisé de phase III ALFA-0701. L'analyse mutationnelle a été réalisée par séquençage NGS au diagnostic de la LAM.

A Performance du séquençage NGS

Malgré la très bonne couverture attendue par la technique de préparation de la librairie Haloplex et du séquençage d'Illumina®, nous avons mis en évidence l'absence de couverture des exons 6 et 9 du gène de *RUNX1*, du gène de *CEBPA*, et de l'exon 3 de *TET2*. Les duplications en tandem du gène *FLT3* dans l'exon 14 ne sont pas détectées dans tous les cas. Il serait nécessaire d'utiliser une alternative de séquençage pour ces gènes lors de l'utilisation de ce panel en routine (Sanger, analyse de fragment...).

B Incidence des mutations

Dans notre cohorte, l'étude de la fréquence des mutations a révélé que 93% des patients ont au moins une mutation «driver» et 78% ont au moins deux mutations. Cette fréquence paraît plus faible que dans les LAM du sujet jeune (<60ans) [63, 68]. Cette différence peut être expliquée par l'augmentation soit du nombre de LAM à CN et de LAM-CBF chez les sujets jeunes, soit de mutation isolée (*TP53*) chez les sujets âgés, soit par le caractère *de novo* de la LAM.

Chez les sujets âgés [177], les mutations de *RUNX1* [107], *TET2* [66], *IDH2*, *ASXL1* [143], *SRSF2*, *TP53* [151], *BCOR* et *SF3B1* sont plus fréquentes. Au contraire, on retrouve chez le sujet jeune les mutations de *CEBPA* [64, 68] et *WT1*. Dans notre cohorte, les gènes *RUNX1*, *TET2*, *IDH2*, *ASXL1*, *SRSF2* et *TP53* sont mutés à plus de 10% alors que *CEBPA* et *WT1* sont mutés respectivement à une fréquence de 7% et de 4%. Le profil mutationnel semble donc différent entre les sujets âgés et les sujets jeunes. Il serait intéressant de confirmer les différences sur une grande cohorte nationale en comparant les résultats de séquençage des patients inclus dans l'ALFA et ceux de l'ELAM.

On retrouve également une différence avec la classification déjà publiée [48] qui montre une fréquence plus importante des mutations dans les gènes suppresseurs de tumeurs (16%) par rapport aux gènes du splicéosome (14%). Dans notre cohorte, l'ordre de fréquence des mutations est : les gènes du splicéosome (22%) par rapport aux gènes suppresseurs de tumeurs (18%).

En fonction du sous-groupe cytogénétique, comme précédemment décrit, les mutations *de NPM1*, *DNMT3A* et *FLT3* sont plus fréquentes dans le sous groupe intermédiaire alors que la mutation de *TP53* est plus fréquente dans le sous groupe défavorable [64, 129, 177].

Nous n'avons pas retrouvé d'association entre le caryotype défavorable et les mutations de *RUNX1* et d'*ASXL1* confirmant l'intérêt de les classer comme des entités distinctes des autres LAM selon l'ELN [4].

C Corrélations biologiques

De nombreux événements mutationnels coopèrent au développement de la LAM. Le deuxième objectif de mon travail est de mettre en évidence les corrélations biologiques entre les mutations afin de mieux comprendre ce phénomène de leucémogénèse. La puissante corrélation entre *NPM1*, *DNMT3A* et *FLT3* est à nouveau mise en évidence sur notre cohorte, mais on peut également y trouver d'autres associations précédemment décrites : par exemple entre *NPM1/RAD21* [177], *CEBPA dm/GATA2* [113], *RUNX1/U2AF1*, *BCOR* [64] et *ASXL1* [107]. Au contraire, d'autres associations n'ont pas été retrouvées comme par exemple la mutation de *NPM1* et les mutations de *TET2*, *IDH*, *PTPN11* et *NRAS* [53, 63]. Il en est de même au niveau de l'exclusion de certaines mutations, *NPM1* est significativement exclusive des mutations de *RUNX1*, *ASXL1*, et *IDH2R172* [53, 63, 64]. De nouvelles corrélations biologiques ont été retrouvées significatives ($p < 0.001$) sur notre cohorte telles que l'association entre les mutations de *SRSF2* et *RUNX1/TET2*, *IDH2R172* et *BCOR*, *ASXL1* et *EZH2/SRSF2* alors que la mutation de *NPM1* semble exclusive des mutations de *BCOR* et de *TP53* et la mutation de *DNMT3A* de celle de *SRSF2*. Ces nouvelles corrélations biologiques devront être confirmées sur une plus grande cohorte. Les mutations du spliceosome et de la cohésine ont une tendance à être exclusives. Dans notre cohorte, seul un patient présente deux mutations sur les gènes de la cohésine (*RAD21* et *SMC1A*) [178].

D Données générales de survie

Les caractéristiques cliniques du patient mais également les caractéristiques biologiques de la LA sont à l'origine des variations du pronostic de la pathologie. L'impact pronostique des nouvelles mutations est encore mal connu aujourd'hui, il est donc nécessaire de les étudier sur de grandes cohortes afin de pouvoir adapter les traitements et d'augmenter les chances de survie des patients nouvellement diagnostiqués. L'impact pronostique est donc l'un des objectifs majeurs de notre étude.

La première phase du traitement consiste en une réduction tumorale et l'obtention d'une RC. Dans l'ensemble de la cohorte, elle semble facilitée en cas de mutation de *NPM1* et contre toute attente en cas de mutation de *FLT3-ITD*. Dans le sous-groupe cytogénétique intermédiaire, comme l'avait décrit d'autres équipes, seule la mutation de *NPM1* aurait un impact sur la mise en RC [64]. Au contraire, la présence des mutations de *TP53* et d'*U2AF1* aurait un impact péjoratif : le nombre de patient en RC est diminué. [179]. Ces nouvelles données pour *U2AF1* devront être confirmées sur une plus large cohorte.

Concernant l'OS, nous mettons en évidence comme d'autres équipes, un impact pronostique favorable des mutations d'*IDH2R140* [68] et au contraire, une cytogénétique défavorable et la mutation de *TP53* entraînent une OS nettement inférieure [151, 180]. La mutation de *TP53* est également à l'origine d'une OS inférieure dans le sous groupe cytogénétique défavorable [177]. Dans notre cohorte, aucune autre mutation n'a d'impact sur l'OS. Au niveau de la RFS, en analyse univariée, la mutation d'*IDH2R140* semble de bon pronostic

alors que les mutations d'*IDH1*, de *JAK2*, de *TP53*, de *SF3B1* ou un caryotype défavorable semble de pronostic défavorable.

Les mutations de *RUNX1*, *ASXL1*, *TET2*, *BCOR*, *SRSF2*, *FLT3-ITD* et de *DNMT3A* ont été identifiées comme un facteur indépendant de mauvais pronostic chez le sujet jeune (<60ans) [107, 177, 179, 181]. Cet impact négatif sur la survie n'est pas retrouvé sur notre cohorte de sujets âgés.

Nous nous sommes ensuite intéressés plus particulièrement à l'impact pronostique controversé de certaines mutations dans la littérature afin d'essayer de clarifier leur impact sur la survie des patients. Pour les mutations d'*IDH*, il avait été reporté que celles touchant indifféremment les protéines 1 et 2 étaient un marqueur pronostique favorable chez les patients porteurs de la mutation de *NPM1* isolément [68]. Dans d'autres études, les mutations d'*IDH1* sont associées soit à un mauvais pronostic, soit n'affectent pas la survie [67, 182]. Les mutations d'*IDH2* quant à elles dans ces trois études, sont de pronostic favorable. Cependant, il semble nécessaire maintenant de diviser les mutations d'*IDH2* en deux catégories en fonction du codon impacté : R140 et R172. En effet, le pronostic diffère : la mutation d'*IDH2R140* serait de pronostic favorable contrairement à la *R172* [183]. Dans notre cohorte, les mutations d'*IDH1* et d'*IDH2R140* influencent significativement la RFS à 4 ans : mauvais et bon pronostic respectivement.

Le pronostic défavorable sur l'OS des mutations de *DNMT3A* [129] n'a pas été retrouvé sur notre cohorte. Des équipes ont mis en évidence l'intérêt de classer les mutations de *DNMT3A* en fonction du codon atteint (R882 vs les autres), ayant un impact différent sur la survie des patients [177]. Nous ne mettons pas en évidence de différence significative de la présence de la mutation touchant le codon R882 versus les autres mutations sur la survie des patients de notre cohorte. Enfin, l'association d'une mutation de *DNMT3A* aux mutations de *NPM1* et *FLT3-ITD* (patients triple positifs) serait de pronostic plus péjoratif [63]. Ces résultats semblent être confirmés sur notre cohorte en terme d'OS et de RFS.

Enfin, si nous étudions l'impact pronostique de l'association des mutations d'*ASXL1* et de *SRSF2* [63]. Nous montrons sur notre cohorte que les mutations d'*ASXL1* et de *SRSF2* sont significativement corrélées ($p < 0,001$ et OR = 6,21) mais aucun impact n'est mis en évidence sur l'OS et la RFS.

E Etude de l'évolution clonale

Les LAM sont des pathologies complexes et évolutives, causées par l'acquisition par étape de multiples mutations somatiques « drivers ». Le séquençage NGS a permis de mettre en évidence la coexistence de clones compétitifs chez plus de 50% des patients [48] responsable des évolutions de la pathologie. Cette technique de séquençage et l'analyse des VAFs ont montré l'émergence de nouveaux clones porteurs des mutations différentes lors de l'évolution de la pathologie [51].

Les VAFs moyens des mutations retrouvés sur notre cohorte confirment que les mutations des gènes de la régulation épigénétique (*DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1*) qui ont une VAF élevée, apparaissent précocement au sein des progéniteurs pré leucémiques. Au contraire, les mutations de *NPM1* ou les mutations de classe I, qui ont une VAF plus faible sont des événements secondaires responsables de la leucémogénèse [55, 178]. En ce qui concerne les mutations de *TP53* et *TET2*, les VAFs peuvent être surestimées par l'association fréquente à la délétion du bras court du chromosome 17 et d'UPDs et à l'addition des VAFs des mutations multiples de *TET2* et les UPDs fréquents sur le chromosome 4 [184].

Des études portant sur l'analyse du génome par SNP array, ont montré que 2-3% de sujets sains et d'un âge avancé (70-80 ans), étaient porteurs d'anomalies du nombre de copie du gène *DNMT3A* et *TET2* [185]. Des mutations récurrentes de *TET2* ont également été mises en évidence dans le sang de femmes âgées et sans hémopathies [186] et des mutations de *DNMT3A* ont été retrouvées dans des cellules non leucémiques [54]. En conclusion, ces mutations semblent être des événements précoces initiateurs des hémopathies malignes alors que d'autres (*NPM1*, *RUNX1*...) sont importantes pour la progression de la pathologie [187].

F Optimisation thérapeutique

Les caractéristiques du paysage moléculaire sont fondamentales au développement de nouvelles approches thérapeutiques et offrent de nouvelles opportunités d'individualisation des traitements. Grâce au séquençage NGS et à la compréhension de phénomène de leucémogénèse, de nouvelles thérapeutiques ont été développées ciblant les altérations génétiques mis en évidence. L'utilisation d'inhibiteurs de tyrosine kinase, de modulateurs épigénétiques, des immunothérapies, des inhibiteurs mitochondriaux et des thérapies ciblant spécifiquement les oncogènes et le microenvironnement médullaire vont permettre d'améliorer la survie des patients.

Dans notre cohorte, nous confirmons l'intérêt d'utiliser un traitement ciblé : le GO lors de la chimiothérapie d'induction et de consolidation sur la mise en RC, l'OS et la RFS sur notre cohorte, en cas de présence d'une mutation de classe I et notamment la mutation de *FLT3-ITD* [29]. Cette étude suggérerait que le GO serait l'un des meilleurs inhibiteurs de FLT3.

Le pronostic très péjoratif de la présence d'une mutation de *TP53* [188] est confirmé sur notre cohorte (médiane de survie d'environ 6mois). Cette OS est catastrophique malgré l'utilisation d'une chimiothérapie intensive. Il semble nécessaire de proposer une alternative thérapeutique à ces patients : une allogreffe de CSH, un agent déméthylant, ou un analogue de la pyrimidine (décitabine) [189]. Cette proposition devra faire l'objet d'essais thérapeutiques protocolaires afin de confirmer ces hypothèses.

VIII Conclusion et perspective

L'étude du profil mutationnel sur cette cohorte a permis d'approfondir nos connaissances sur les LAM *de novo* du sujet âgé, c'est à dire l'incidence, les corrélations biologiques et cliniques ainsi que l'impact pronostique des mutations de 43 gènes impliqués dans les pathologies myéloïdes. Elle est l'une des premières études nationales qui regroupe un grand nombre d'échantillons d'ADN au diagnostic de la pathologie (n=250) et le séquençage de plus de 40 gènes.

Nous avons confirmé que les mutations des gènes impliqués dans la régulation épigénétique (*DNMT3A*, *TET2* ...) sont liées à l'âge, au contraire d'autres mutations telles que *WT1* et *CEBPA*. La comparaison de ce profil mutationnel à d'autres essais, notamment chez les enfants (ELAM) et les sujets plus jeunes (ALFA-0702) est l'un des projets du laboratoire afin de poursuivre la compréhension du phénomène de leucémogénèse.

Il serait intéressant de poursuivre en étudiant, par la même technique de séquençage, les prélèvements de suivi des patients qui sont disponibles au centre de conservation des échantillons du CHRU de Lille afin de déterminer le marqueur le plus robuste dans l'évaluation de la MRD et de comprendre les mécanismes impliqués dans la rechute (évolution d'un sous clone minoritaire, acquisition de nouvelles mutations somatiques...).

Deux messages axés sur l'optimisation des traitements de la LAM se dégagent de cette étude. Premièrement, malgré l'utilisation d'une chimiothérapie intensive (médiane de survie de 6 mois), le pronostic très péjoratif de la présence d'une mutation de *TP53* justifie la nécessité de trouver la meilleure alternative thérapeutique pour ces patients (allogreffe de CSH, utilisation d'un agent déméthylant). Deuxièmement, nous confirmons le grand bénéfice de l'utilisation du GO chez les patients porteurs de la mutation de *FLT3-ITD*, suggérant que le GO est peut être l'un des meilleurs inhibiteurs de *FLT3*.

Bibliographie

1. Rowe, J.M. and M.S. Tallman, *How I treat acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **116**(17): p. 3147-56.
2. Deschler, B. and M. Lubbert, *Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology*. Cancer, 2006. **107**(9): p. 2099-107.
3. Escobar, P.A., et al., *Leukaemia-specific chromosome damage detected by comet with fluorescence in situ hybridization (comet-FISH)*. Mutagenesis, 2007. **22**(5): p. 321-7.
4. Dohner, H., et al., *Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel*. Blood, 2017. **129**(4): p. 424-447.
5. Gondek, L.P., et al., *Chromosomal lesions and uniparental disomy detected by SNP arrays in MDS, MDS/MPD, and MDS-derived AML*. Blood, 2008. **111**(3): p. 1534-42.
6. Bennett, J.M., et al., *Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group*. Ann Intern Med, 1985. **103**(4): p. 620-5.
7. Arber, D.A., et al., *The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2391-405.
8. Greenwood, M.J., et al., *Leukocyte count as a predictor of death during remission induction in acute myeloid leukemia*. Leuk Lymphoma, 2006. **47**(7): p. 1245-52.
9. Kayser, S., et al., *The impact of therapy-related acute myeloid leukemia (AML) on outcome in 2853 adult patients with newly diagnosed AML*. Blood, 2011. **117**(7): p. 2137-45.
10. Weinberg, O.K., et al., *Clinical characterization of acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes as defined by the 2008 WHO classification system*. Blood, 2009. **113**(9): p. 1906-8.
11. Miesner, M., et al., *Multilineage dysplasia (MLD) in acute myeloid leukemia (AML) correlates with MDS-related cytogenetic abnormalities and a prior history of MDS or MDS/MPN but has no independent prognostic relevance: a comparison of 408 cases classified as "AML not otherwise specified" (AML-NOS) or "AML with myelodysplasia-related changes" (AML-MRC)*. Blood, 2010. **116**(15): p. 2742-51.
12. Grimwade, D., et al., *The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties*. Blood, 1998. **92**(7): p. 2322-33.
13. Grimwade, D., et al., *Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials*. Blood, 2010. **116**(3): p. 354-65.
14. Breems, D.A., et al., *Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype*. J Clin Oncol, 2008. **26**(29): p. 4791-7.
15. Renneville, A., et al., *Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature*. Leukemia, 2008. **22**(5): p. 915-31.
16. Falini, B. and M.P. Martelli, *Impact of genomics in the clinical management of patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia*. Best Pract Res Clin Haematol, 2015. **28**(2-3): p. 90-7.
17. Gerstung, M., et al., *Precision oncology for acute myeloid leukemia using a knowledge bank approach*. Nat Genet, 2017. **49**(3): p. 332-340.
18. Grimwade, D. and S.D. Freeman, *Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for "prime time"?* Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2014. **2014**(1): p. 222-33.

19. Balsat, M., et al., *Postinduction Minimal Residual Disease Predicts Outcome and Benefit From Allogeneic Stem Cell Transplantation in Acute Myeloid Leukemia With NPM1 Mutation: A Study by the Acute Leukemia French Association Group*. J Clin Oncol, 2017. **35**(2): p. 185-193.
20. Jourdan, E., et al., *Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(12): p. 2213-23.
21. Cilloni, D., et al., *Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study*. J Clin Oncol, 2009. **27**(31): p. 5195-201.
22. Kronke, J., et al., *Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group*. J Clin Oncol, 2011. **29**(19): p. 2709-16.
23. Ivey, A., et al., *Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML*. N Engl J Med, 2016. **374**(5): p. 422-33.
24. Rowe, J.M., *Optimal induction and post-remission therapy for AML in first remission*. Hematology Am Soc Hematol Educ Program, 2009: p. 396-405.
25. Burnett, A.K., et al., *A randomized comparison of daunorubicin 90 mg/m² vs 60 mg/m² in AML induction: results from the UK NCRI AML17 trial in 1206 patients*. Blood, 2015. **125**(25): p. 3878-85.
26. Willemze, R., et al., *High-dose cytarabine in induction treatment improves the outcome of adult patients younger than age 46 years with acute myeloid leukemia: results of the EORTC-GIMEMA AML-12 trial*. J Clin Oncol, 2014. **32**(3): p. 219-28.
27. Lancet, J.E., et al., *Phase 2 trial of CPX-351, a fixed 5:1 molar ratio of cytarabine/daunorubicin, vs cytarabine/daunorubicin in older adults with untreated AML*. Blood, 2014. **123**(21): p. 3239-46.
28. Hills, R.K., et al., *Addition of gemtuzumab ozogamicin to induction chemotherapy in adult patients with acute myeloid leukaemia: a meta-analysis of individual patient data from randomised controlled trials*. Lancet Oncol, 2014. **15**(9): p. 986-96.
29. Castaigne, S., et al., *Effect of gemtuzumab ozogamicin on survival of adult patients with de-novo acute myeloid leukaemia (ALFA-0701): a randomised, open-label, phase 3 study*. Lancet, 2012. **379**(9825): p. 1508-16.
30. Kantarjian, H.M., et al., *Phase II study of clofarabine monotherapy in previously untreated older adults with acute myeloid leukemia and unfavorable prognostic factors*. J Clin Oncol, 2010. **28**(4): p. 549-55.
31. Koreth, J., et al., *Allogeneic stem cell transplantation for acute myeloid leukemia in first complete remission: systematic review and meta-analysis of prospective clinical trials*. JAMA, 2009. **301**(22): p. 2349-61.
32. Cornelissen, J.J., et al., *Comparative therapeutic value of post-remission approaches in patients with acute myeloid leukemia aged 40-60 years*. Leukemia, 2015. **29**(5): p. 1041-50.
33. Grimwade, D., A. Ivey, and B.J. Huntly, *Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance*. Blood, 2016. **127**(1): p. 29-41.
34. Levis, M., et al., *Results from a randomized trial of salvage chemotherapy followed by lestaurtinib for patients with FLT3 mutant AML in first relapse*. Blood, 2011. **117**(12): p. 3294-301.
35. Wander, S.A., M.J. Levis, and A.T. Fathi, *The evolving role of FLT3 inhibitors in acute myeloid leukemia: quizartinib and beyond*. Ther Adv Hematol, 2014. **5**(3): p. 65-77.
36. Levis, M., *Midostaurin approved for FLT3-mutated AML*. Blood, 2017.
37. Daver, N., et al., *Secondary mutations as mediators of resistance to targeted therapy in leukemia*. Blood, 2015. **125**(21): p. 3236-45.
38. Wang, F., et al., *Targeted inhibition of mutant IDH2 in leukemia cells induces cellular differentiation*. Science, 2013. **340**(6132): p. 622-6.

39. Kernytsky, A., et al., *IDH2 mutation-induced histone and DNA hypermethylation is progressively reversed by small-molecule inhibition*. Blood, 2015. **125**(2): p. 296-303.
40. Dombret, H., et al., *International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts*. Blood, 2015. **126**(3): p. 291-9.
41. Kantarjian, H.M., et al., *Multicenter, randomized, open-label, phase III trial of decitabine versus patient choice, with physician advice, of either supportive care or low-dose cytarabine for the treatment of older patients with newly diagnosed acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2012. **30**(21): p. 2670-7.
42. Reya, T., et al., *Stem cells, cancer, and cancer stem cells*. Nature, 2001. **414**(6859): p. 105-11.
43. Rosenbauer, F. and D.G. Tenen, *Transcription factors in myeloid development: balancing differentiation with transformation*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(2): p. 105-17.
44. Weiss, L. and H. Sakai, *The hematopoietic stroma*. Am J Anat, 1984. **170**(3): p. 447-63.
45. Lapidot, T., et al., *A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice*. Nature, 1994. **367**(6464): p. 645-8.
46. Valk, P.J., et al., *Prognostically useful gene-expression profiles in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2004. **350**(16): p. 1617-28.
47. Figueroa, M.E., et al., *DNA methylation signatures identify biologically distinct subtypes in acute myeloid leukemia*. Cancer Cell, 2010. **17**(1): p. 13-27.
48. *Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2013. **368**(22): p. 2059-74.
49. Grove, C.S. and G.S. Vassiliou, *Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer?* Dis Model Mech, 2014. **7**(8): p. 941-51.
50. Dohner, K., P. Paschka, and H. Dohner, *[Acute myeloid leukemia]*. Internist (Berl), 2015. **56**(4): p. 354-63.
51. Ding, L., et al., *Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing*. Nature, 2012. **481**(7382): p. 506-10.
52. Welch, J.S., et al., *The origin and evolution of mutations in acute myeloid leukemia*. Cell, 2012. **150**(2): p. 264-78.
53. Patel, J.L., et al., *Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia*. Leuk Res, 2017. **56**: p. 7-12.
54. Shlush, L.I., et al., *Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia*. Nature, 2014. **506**(7488): p. 328-33.
55. Corces-Zimmerman, M.R., et al., *Preleukemic mutations in human acute myeloid leukemia affect epigenetic regulators and persist in remission*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(7): p. 2548-53.
56. Borer, R.A., et al., *Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm*. Cell, 1989. **56**(3): p. 379-90.
57. Okuda, M., et al., *Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication*. Cell, 2000. **103**(1): p. 127-40.
58. Bertwistle, D., M. Sugimoto, and C.J. Sherr, *Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23*. Mol Cell Biol, 2004. **24**(3): p. 985-96.
59. Lindstrom, M.S., *NPM1/B23: A Multifunctional Chaperone in Ribosome Biogenesis and Chromatin Remodeling*. Biochem Res Int, 2011. **2011**: p. 195209.
60. Falini, B., et al., *Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications*. Leukemia, 2009. **23**(10): p. 1731-43.
61. Zidan, M., H. Shaaban, and D. El Ghannam, *Prognostic Impact of Nucleophosmin 1 (NPM1) Gene Mutations in Egyptian Acute Myeloid Leukemia Patients*. Turk J Haematol, 2013. **30**(2): p. 129-36.
62. Dohner, K., et al., *Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3740-6.

63. Papaemmanuil, E., H. Dohner, and P.J. Campbell, *Genomic Classification in Acute Myeloid Leukemia*. N Engl J Med, 2016. **375**(9): p. 900-1.
64. Kihara, R., et al., *Comprehensive analysis of genetic alterations and their prognostic impacts in adult acute myeloid leukemia patients*. Leukemia, 2014. **28**(8): p. 1586-95.
65. Bacher, U., et al., *Implications of NRAS mutations in AML: a study of 2502 patients*. Blood, 2006. **107**(10): p. 3847-53.
66. Metzeler, K.H., et al., *TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study*. J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1373-81.
67. Paschka, P., et al., *IDH1 and IDH2 mutations are frequent genetic alterations in acute myeloid leukemia and confer adverse prognosis in cytogenetically normal acute myeloid leukemia with NPM1 mutation without FLT3 internal tandem duplication*. J Clin Oncol, 2010. **28**(22): p. 3636-43.
68. Patel, J.P., et al., *Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia*. N Engl J Med, 2012. **366**(12): p. 1079-89.
69. Nakao, M., et al., *Internal tandem duplication of the flt3 gene found in acute myeloid leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(12): p. 1911-8.
70. Hayakawa, F., et al., *Tandem-duplicated Flt3 constitutively activates STAT5 and MAP kinase and introduces autonomous cell growth in IL-3-dependent cell lines*. Oncogene, 2000. **19**(5): p. 624-31.
71. Abu-Duhier, F.M., et al., *Identification of novel FLT-3 Asp835 mutations in adult acute myeloid leukaemia*. Br J Haematol, 2001. **113**(4): p. 983-8.
72. Pemmaraju, N., et al., *FLT3 inhibitors in the treatment of acute myeloid leukemia: the start of an era?* Cancer, 2011. **117**(15): p. 3293-304.
73. Yokota, S., et al., *Internal tandem duplication of the FLT3 gene is preferentially seen in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome among various hematological malignancies. A study on a large series of patients and cell lines*. Leukemia, 1997. **11**(10): p. 1605-9.
74. Mrozek, K., *Cytogenetic, molecular genetic, and clinical characteristics of acute myeloid leukemia with a complex karyotype*. Semin Oncol, 2008. **35**(4): p. 365-77.
75. Moreno, I., et al., *Incidence and prognostic value of FLT3 internal tandem duplication and D835 mutations in acute myeloid leukemia*. Haematologica, 2003. **88**(1): p. 19-24.
76. Andre, C., et al., *Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes*. Genomics, 1997. **39**(2): p. 216-26.
77. Furitsu, T., et al., *Identification of mutations in the coding sequence of the proto-oncogene c-kit in a human mast cell leukemia cell line causing ligand-independent activation of c-kit product*. J Clin Invest, 1993. **92**(4): p. 1736-44.
78. Mrozek, K., et al., *Advances in molecular genetics and treatment of core-binding factor acute myeloid leukemia*. Curr Opin Oncol, 2008. **20**(6): p. 711-8.
79. Duployez, N., et al., *Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia*. Blood, 2016. **127**(20): p. 2451-9.
80. Janssen, J.W., et al., *RAS gene mutations in acute and chronic myelocytic leukemias, chronic myeloproliferative disorders, and myelodysplastic syndromes*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(24): p. 9228-32.
81. Nomdedeu, J., et al., *Low frequency of exon 3 PTPN11 mutations in adult de novo acute myeloid leukemia. Analysis of a consecutive series of 173 patients*. Haematologica, 2005. **90**(3): p. 412-3.
82. Yu, H. and R. Jove, *The STATs of cancer--new molecular targets come of age*. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(2): p. 97-105.
83. James, C., et al., *A unique clonal JAK2 mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera*. Nature, 2005. **434**(7037): p. 1144-8.

84. Staerk, J. and S.N. Constantinescu, *The JAK-STAT pathway and hematopoietic stem cells from the JAK2 V617F perspective*. JAKSTAT, 2012. **1**(3): p. 184-90.
85. Gomez-Segui, I., et al., *Novel recurrent mutations in the RAS-like GTP-binding gene RIT1 in myeloid malignancies*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1943-6.
86. Lee, J.W., et al., *BRAF mutations in acute leukemias*. Leukemia, 2004. **18**(1): p. 170-2.
87. Tiacci, E., et al., *BRAF mutations in hairy-cell leukemia*. N Engl J Med, 2011. **364**(24): p. 2305-15.
88. Pardanani, A.D., et al., *MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients*. Blood, 2006. **108**(10): p. 3472-6.
89. Thien, C.B. and W.Y. Langdon, *Negative regulation of PTK signalling by Cbl proteins*. Growth Factors, 2005. **23**(2): p. 161-7.
90. Fernandes, M.S., et al., *Novel oncogenic mutations of CBL in human acute myeloid leukemia that activate growth and survival pathways depend on increased metabolism*. J Biol Chem, 2010. **285**(42): p. 32596-605.
91. Loh, M.L., et al., *Mutations in CBL occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia*. Blood, 2009. **114**(9): p. 1859-63.
92. Cristobal, I., et al., *SETBP1 overexpression is a novel leukemogenic mechanism that predicts adverse outcome in elderly patients with acute myeloid leukemia*. Blood, 2010. **115**(3): p. 615-25.
93. Makishima, H., et al., *Somatic SETBP1 mutations in myeloid malignancies*. Nat Genet, 2013. **45**(8): p. 942-6.
94. Fernandez-Mercado, M., et al., *Mutations in SETBP1 are recurrent in myelodysplastic syndromes and often coexist with cytogenetic markers associated with disease progression*. Br J Haematol, 2013. **163**(2): p. 235-9.
95. Beekman, R., et al., *Sequential gain of mutations in severe congenital neutropenia progressing to acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **119**(22): p. 5071-7.
96. Pardanani, A., et al., *CSF3R T618I is a highly prevalent and specific mutation in chronic neutrophilic leukemia*. Leukemia, 2013. **27**(9): p. 1870-3.
97. Quintana-Bustamante, O., et al., *Overexpression of wild-type or mutants forms of CEBPA alter normal human hematopoiesis*. Leukemia, 2012. **26**(7): p. 1537-46.
98. Taskesen, E., et al., *Prognostic impact, concurrent genetic mutations, and gene expression features of AML with CEBPA mutations in a cohort of 1182 cytogenetically normal AML patients: further evidence for CEBPA double mutant AML as a distinctive disease entity*. Blood, 2011. **117**(8): p. 2469-75.
99. Fasan, A., et al., *The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML*. Leukemia, 2014. **28**(4): p. 794-803.
100. Li, H.Y., et al., *Favorable prognosis of biallelic CEBPA gene mutations in acute myeloid leukemia patients: a meta-analysis*. Eur J Haematol, 2015. **94**(5): p. 439-48.
101. Tawana, K., et al., *Disease evolution and outcomes in familial AML with germline CEBPA mutations*. Blood, 2015. **126**(10): p. 1214-23.
102. Swiers, G., M. de Bruijn, and N.A. Speck, *Hematopoietic stem cell emergence in the conceptus and the role of Runx1*. Int J Dev Biol, 2010. **54**(6-7): p. 1151-63.
103. Ito, Y., *Oncogenic potential of the RUNX gene family: 'overview'*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4198-208.
104. Osato, M., *Point mutations in the RUNX1/AML1 gene: another actor in RUNX leukemia*. Oncogene, 2004. **23**(24): p. 4284-96.
105. Christiansen, D.H., M.K. Andersen, and J. Pedersen-Bjergaard, *Mutations of AML1 are common in therapy-related myelodysplasia following therapy with alkylating agents and are significantly associated with deletion or loss of chromosome arm 7q and with subsequent leukemic transformation*. Blood, 2004. **104**(5): p. 1474-81.

106. Harada, H., et al., *High incidence of somatic mutations in the AML1/RUNX1 gene in myelodysplastic syndrome and low blast percentage myeloid leukemia with myelodysplasia*. Blood, 2004. **103**(6): p. 2316-24.
107. Mendler, J.H., et al., *RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures*. J Clin Oncol, 2012. **30**(25): p. 3109-18.
108. Gaidzik, V.I., et al., *RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group*. J Clin Oncol, 2011. **29**(10): p. 1364-72.
109. Schnittger, S., et al., *RUNX1 mutations are frequent in de novo AML with noncomplex karyotype and confer an unfavorable prognosis*. Blood, 2011. **117**(8): p. 2348-57.
110. Grossmann, V., et al., *A novel hierarchical prognostic model of AML solely based on molecular mutations*. Blood, 2012. **120**(15): p. 2963-72.
111. Bresnick, E.H., et al., *GATA switches as developmental drivers*. J Biol Chem, 2010. **285**(41): p. 31087-93.
112. Banno, K., et al., *Systematic Cellular Disease Models Reveal Synergistic Interaction of Trisomy 21 and GATA1 Mutations in Hematopoietic Abnormalities*. Cell Rep, 2016. **15**(6): p. 1228-41.
113. Greif, P.A., et al., *GATA2 zinc finger 1 mutations associated with biallelic CEBPA mutations define a unique genetic entity of acute myeloid leukemia*. Blood, 2012. **120**(2): p. 395-403.
114. Pasquet, M., et al., *High frequency of GATA2 mutations in patients with mild chronic neutropenia evolving to MonoMac syndrome, myelodysplasia, and acute myeloid leukemia*. Blood, 2013. **121**(5): p. 822-9.
115. Hock, H., et al., *Tel/Etv6 is an essential and selective regulator of adult hematopoietic stem cell survival*. Genes Dev, 2004. **18**(19): p. 2336-41.
116. Mullighan, C.G., et al., *Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia*. Nature, 2007. **446**(7137): p. 758-64.
117. Barjesteh van Waalwijk van Doorn-Khosrovani, S., et al., *Somatic heterozygous mutations in ETV6 (TEL) and frequent absence of ETV6 protein in acute myeloid leukemia*. Oncogene, 2005. **24**(25): p. 4129-37.
118. Noetzli, L., et al., *Germline mutations in ETV6 are associated with thrombocytopenia, red cell macrocytosis and predisposition to lymphoblastic leukemia*. Nat Genet, 2015. **47**(5): p. 535-8.
119. Capaccione, K.M. and S.R. Pine, *The Notch signaling pathway as a mediator of tumor survival*. Carcinogenesis, 2013. **34**(7): p. 1420-30.
120. Borggreffe, T. and F. Oswald, *The Notch signaling pathway: transcriptional regulation at Notch target genes*. Cell Mol Life Sci, 2009. **66**(10): p. 1631-46.
121. Weng, A.P., et al., *Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia*. Science, 2004. **306**(5694): p. 269-71.
122. Zweidler-McKay, P.A., et al., *Notch signaling is a potent inducer of growth arrest and apoptosis in a wide range of B-cell malignancies*. Blood, 2005. **106**(12): p. 3898-906.
123. Rossi, D., et al., *Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia*. Blood, 2012. **119**(2): p. 521-9.
124. Takeishi, S. and K.I. Nakayama, *Role of Fbxw7 in the maintenance of normal stem cells and cancer-initiating cells*. Br J Cancer, 2014. **111**(6): p. 1054-9.
125. Malyukova, A., et al., *The tumor suppressor gene hCDC4 is frequently mutated in human T-cell acute lymphoblastic leukemia with functional consequences for Notch signaling*. Cancer Res, 2007. **67**(12): p. 5611-6.
126. Thompson, B.J., et al., *The SCFFBW7 ubiquitin ligase complex as a tumor suppressor in T cell leukemia*. J Exp Med, 2007. **204**(8): p. 1825-35.
127. Challen, G.A., et al., *Dnmt3a is essential for hematopoietic stem cell differentiation*. Nat Genet, 2011. **44**(1): p. 23-31.

128. Roller, A., et al., *Landmark analysis of DNMT3A mutations in hematological malignancies. Leukemia*, 2013. **27**(7): p. 1573-8.
129. Ley, T.J., et al., *DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. N Engl J Med*, 2010. **363**(25): p. 2424-33.
130. Marcucci, G., et al., *Age-related prognostic impact of different types of DNMT3A mutations in adults with primary cytogenetically normal acute myeloid leukemia. J Clin Oncol*, 2012. **30**(7): p. 742-50.
131. Yan, X.J., et al., *Exome sequencing identifies somatic mutations of DNA methyltransferase gene DNMT3A in acute monocytic leukemia. Nat Genet*, 2011. **43**(4): p. 309-15.
132. Cimmino, L., et al., *TET family proteins and their role in stem cell differentiation and transformation. Cell Stem Cell*, 2011. **9**(3): p. 193-204.
133. Delhommeau, F., et al., *Mutation in TET2 in myeloid cancers. N Engl J Med*, 2009. **360**(22): p. 2289-301.
134. Gaidzik, V.I., et al., *TET2 mutations in acute myeloid leukemia (AML): results from a comprehensive genetic and clinical analysis of the AML study group. J Clin Oncol*, 2012. **30**(12): p. 1350-7.
135. Lu, C., et al., *IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. Nature*, 2012. **483**(7390): p. 474-8.
136. Mardis, E.R., et al., *Recurring mutations found by sequencing an acute myeloid leukemia genome. N Engl J Med*, 2009. **361**(11): p. 1058-66.
137. DiNardo, C.D., et al., *Characteristics, clinical outcome, and prognostic significance of IDH mutations in AML. Am J Hematol*, 2015. **90**(8): p. 732-6.
138. Marcucci, G., et al., *IDH1 and IDH2 gene mutations identify novel molecular subsets within de novo cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a Cancer and Leukemia Group B study. J Clin Oncol*, 2010. **28**(14): p. 2348-55.
139. Ernst, T., et al., *Inactivating mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myeloid disorders. Nat Genet*, 2010. **42**(8): p. 722-6.
140. Abdel-Wahab, O., et al., *ASXL1 mutations promote myeloid transformation through loss of PRC2-mediated gene repression. Cancer Cell*, 2012. **22**(2): p. 180-93.
141. Gelsi-Boyer, V., et al., *Mutations of polycomb-associated gene ASXL1 in myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukaemia. Br J Haematol*, 2009. **145**(6): p. 788-800.
142. Schnittger, S., et al., *ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. Leukemia*, 2013. **27**(1): p. 82-91.
143. Metzeler, K.H., et al., *ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. Blood*, 2011. **118**(26): p. 6920-9.
144. Tiacci, E., et al., *The corepressors BCOR and BCORL1: two novel players in acute myeloid leukemia. Haematologica*, 2012. **97**(1): p. 3-5.
145. Huynh, K.D., et al., *BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. Genes Dev*, 2000. **14**(14): p. 1810-23.
146. Grossmann, V., et al., *Whole-exome sequencing identifies somatic mutations of BCOR in acute myeloid leukemia with normal karyotype. Blood*, 2011. **118**(23): p. 6153-63.
147. Li, M., et al., *Somatic mutations in the transcriptional corepressor gene BCORL1 in adult acute myelogenous leukemia. Blood*, 2011. **118**(22): p. 5914-7.
148. Isobe, M., et al., *Localization of gene for human p53 tumour antigen to band 17p13. Nature*, 1986. **320**(6057): p. 84-5.
149. Muller, P.A. and K.H. Vousden, *Mutant p53 in cancer: new functions and therapeutic opportunities. Cancer Cell*, 2014. **25**(3): p. 304-17.
150. Wong, T.N., et al., *Role of TP53 mutations in the origin and evolution of therapy-related acute myeloid leukaemia. Nature*, 2015. **518**(7540): p. 552-5.

151. Rucker, F.G., et al., *TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome.* Blood, 2012. **119**(9): p. 2114-21.
152. Yang, L., et al., *A tumor suppressor and oncogene: the WT1 story.* Leukemia, 2007. **21**(5): p. 868-76.
153. Rampal, R., et al., *DNA hydroxymethylation profiling reveals that WT1 mutations result in loss of TET2 function in acute myeloid leukemia.* Cell Rep, 2014. **9**(5): p. 1841-55.
154. Hou, H.A., et al., *WT1 mutation in 470 adult patients with acute myeloid leukemia: stability during disease evolution and implication of its incorporation into a survival scoring system.* Blood, 2010. **115**(25): p. 5222-31.
155. Todd, M.A., D. Ivanochko, and D.J. Picketts, *PHF6 Degrees of Separation: The Multifaceted Roles of a Chromatin Adaptor Protein.* Genes (Basel), 2015. **6**(2): p. 325-52.
156. Van Vlierberghe, P., et al., *PHF6 mutations in T-cell acute lymphoblastic leukemia.* Nat Genet, 2010. **42**(4): p. 338-42.
157. Sulis, M.L. and R. Parsons, *PTEN: from pathology to biology.* Trends Cell Biol, 2003. **13**(9): p. 478-83.
158. Jenkinson, S., et al., *Impact of PTEN abnormalities on outcome in pediatric patients with T-cell acute lymphoblastic leukemia treated on the MRC UKALL2003 trial.* Leukemia, 2016. **30**(1): p. 39-47.
159. Shojaee, S., et al., *PTEN opposes negative selection and enables oncogenic transformation of pre-B cells.* Nat Med, 2016. **22**(4): p. 379-87.
160. Trinquand, A., 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, 2013. **31**(34): p. 4333-42.
161. Solomon, D.A., et al., *Mutational inactivation of STAG2 causes aneuploidy in human cancer.* Science, 2011. **333**(6045): p. 1039-43.
162. Liu, J., et al., *Transcriptional dysregulation in NIPBL and cohesin mutant human cells.* PLoS Biol, 2009. **7**(5): p. e1000119.
163. Wendt, K.S., et al., *Cohesin mediates transcriptional insulation by CCCTC-binding factor.* Nature, 2008. **451**(7180): p. 796-801.
164. Kon, A., et al., *Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms.* Nat Genet, 2013. **45**(10): p. 1232-7.
165. Cazzola, M., M. Rossi, and L. Malcovati, *Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms.* Blood, 2013. **121**(2): p. 260-9.
166. Graubert, T.A., et al., *Recurrent mutations in the U2AF1 splicing factor in myelodysplastic syndromes.* Nat Genet, 2011. **44**(1): p. 53-7.
167. Yoshida, K., et al., *Frequent pathway mutations of splicing machinery in myelodysplasia.* Nature, 2011. **478**(7367): p. 64-9.
168. Long, J.C. and J.F. Caceres, *The SR protein family of splicing factors: master regulators of gene expression.* Biochem J, 2009. **417**(1): p. 15-27.
169. Papaemmanuil, E., et al., *Clinical and biological implications of driver mutations in myelodysplastic syndromes.* Blood, 2013. **122**(22): p. 3616-27; quiz 3699.
170. Wu, S.J., et al., *The clinical implication of SRSF2 mutation in patients with myelodysplastic syndrome and its stability during disease evolution.* Blood, 2012. **120**(15): p. 3106-11.
171. Malcovati, L., et al., *SF3B1 mutation identifies a distinct subset of myelodysplastic syndrome with ring sideroblasts.* Blood, 2015. **126**(2): p. 233-41.
172. Papaemmanuil, E., et al., *Somatic SF3B1 mutation in myelodysplasia with ring sideroblasts.* N Engl J Med, 2011. **365**(15): p. 1384-95.
173. Dolatshad, H., et al., *Disruption of SF3B1 results in deregulated expression and splicing of key genes and pathways in myelodysplastic syndrome hematopoietic stem and progenitor cells.* Leukemia, 2015. **29**(8): p. 1798.

174. Klampfl, T., et al., *Somatic mutations of calreticulin in myeloproliferative neoplasms*. N Engl J Med, 2013. **369**(25): p. 2379-90.
175. Rumi, E., et al., *JAK2 or CALR mutation status defines subtypes of essential thrombocythemia with substantially different clinical course and outcomes*. Blood, 2014. **123**(10): p. 1544-51.
176. Renneville, A., et al., *Prognostic significance of DNA methyltransferase 3A mutations in cytogenetically normal acute myeloid leukemia: a study by the Acute Leukemia French Association*. Leukemia, 2012. **26**(6): p. 1247-54.
177. Metzeler, K.H., et al., *Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia*. Blood, 2016. **128**(5): p. 686-98.
178. Bullinger, L., K. Dohner, and H. Dohner, *Genomics of Acute Myeloid Leukemia Diagnosis and Pathways*. J Clin Oncol, 2017. **35**(9): p. 934-946.
179. Lin, P.H., et al., *A targeted next-generation sequencing in the molecular risk stratification of adult acute myeloid leukemia: implications for clinical practice*. Cancer Med, 2017. **6**(2): p. 349-360.
180. Mrozek, K., et al., *Prognostic significance of the European LeukemiaNet standardized system for reporting cytogenetic and molecular alterations in adults with acute myeloid leukemia*. J Clin Oncol, 2012. **30**(36): p. 4515-23.
181. Hou, H.A., et al., *Integration of cytogenetic and molecular alterations in risk stratification of 318 patients with de novo non-M3 acute myeloid leukemia*. Leukemia, 2014. **28**(1): p. 50-8.
182. Chotirat, S., et al., *Molecular alterations of isocitrate dehydrogenase 1 and 2 (IDH1 and IDH2) metabolic genes and additional genetic mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia patients*. J Hematol Oncol, 2012. **5**: p. 5.
183. Green, C.L., et al., *The prognostic significance of IDH2 mutations in AML depends on the location of the mutation*. Blood, 2011. **118**(2): p. 409-12.
184. Hemmat, M., et al., *Submicroscopic deletion of 5q involving tumor suppressor genes (CTNNA1, HSPA9) and copy neutral loss of heterozygosity associated with TET2 and EZH2 mutations in a case of MDS with normal chromosome and FISH results*. Mol Cytogenet, 2014. **7**: p. 35.
185. Laurie, C.C., et al., *Detectable clonal mosaicism from birth to old age and its relationship to cancer*. Nat Genet, 2012. **44**(6): p. 642-50.
186. Busque, L., et al., *Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis*. Nat Genet, 2012. **44**(11): p. 1179-81.
187. Xie, M., et al., *Age-related mutations associated with clonal hematopoietic expansion and malignancies*. Nat Med, 2014. **20**(12): p. 1472-8.
188. Desoutter, J., et al., *Molecular prognostic factors in acute myeloid leukemia receiving first-line therapy with azacitidine*. Leukemia, 2016. **30**(6): p. 1416-8.
189. Welch, J.S., A.A. Petti, and T.J. Ley, *Decitabine in TP53-Mutated AML*. N Engl J Med, 2017. **376**(8): p. 797-8.

DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Année Universitaire 2016/2017

Nom : Fournier

Prénom : Elise

Titre de la thèse : Etude du profil mutationnel des leucémies aiguës myéloïdes du sujet âgé par séquençage haut débit : résultats de l'essai ALFA-0701

Mots-clés : Leucémie aiguë myéloïde, sujet âgé, séquençage NGS

Résumé : Les LAM constituent un groupe très hétérogène d'hémopathies. Comme de nombreux cancers, elles sont caractérisées par l'acquisition de multiples mutations somatiques à l'origine d'une architecture clonale complexe. L'apport des nouvelles technologies de séquençage haut débit a permis de comprendre le phénomène de leucémogénèse et de proposer une stratification pronostique moléculaire. Le profil mutationnel des LAM du sujet âgé est encore mal établi. L'objectif de ce travail est de compléter nos connaissances sur l'incidence, les corrélations biologiques et cliniques ainsi que d'évaluer l'impact pronostique de ces mutations. Pour cela, nous avons réalisé le profil mutationnel de 250 patients âgés de 50-70 ans, atteints de LAM *de novo* et inclus dans le protocole ALFA-0701. Pour cela, 43 gènes impliqués dans les hémopathies ont été séquencés : librairie Haloplex (Agilent®) et séquenceur Miseq (Illumina®). On retrouve 709 mutations sur l'ensemble de la cohorte. Onze gènes sont mutés chez plus de 10% des patients : *NPM1* (33%), *DNMT3A* (28%), *FLT3-ITD* (20%), *TET2* (20%), *RUNX1* (15%), *NRAS* (14%), *IDH2* (14%), *ASXL1* (13%), *SRSF2* (12%), *IDH1* (10%) et *TP53* (10%). Les mutations entraînant une dérégulation de l'épigénétique sont les plus fréquemment rencontrées (67,6%). Les mutations d'*IDH2R140* sont de pronostic favorable en terme d'OS et de RFS ($p < 0,05$). Au contraire, les mutations de *TP53* sont de pronostic défavorable en terme de mise en RC, de RFS et d'OS ($p < 0,001$) dans la cohorte totale et dans le groupe cytogénétique défavorable. La mutation d'*U2AF1* est l'un des facteurs indépendants de mauvais pronostic sur la mise en RC ($p < 0,05$). Sur cette cohorte, nous confirmons le grand bénéfice de l'utilisation du GO chez les patients porteurs d'une mutation de *FLT3-ITD*.

Président : Madame le Professeur Annabelle Dupont (CHRU Lille)

Assesseurs : Monsieur le Professeur Bruno Quesnel (CHRU Lille)

Monsieur le Professeur Nicolas Boissel (Hôpital Saint-Louis Paris)

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Preudhomme Claude (CHRU Lille)