

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

**Soutenu publiquement le 24 juin 2019
Par Mme Auriane LESIEUR**

**conformément aux dispositions réglementaires en vigueur
tient lieu de**

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

Suivi de la maladie résiduelle dans les
Leucémies Aigües Myéloïdes
par quantification des mutations rares de *NPM1*
par PCR digitale

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie POULAIN

Asseseurs : Monsieur le Docteur Olivier NIBOUREL
Monsieur le Docteur Nicolas DUPLOYEZ

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME



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 Stéphanie POULAIN
Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie moléculaire
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider le jury de cette thèse. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A mes juges :

Monsieur le Docteur Olivier NIBOUREL
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie moléculaire
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je te remercie pour l'intérêt que tu portes à ce travail et l'honneur que tu me fais de juger cette thèse. Merci pour ta gentillesse, ces échanges très constructifs, tes précieux conseils ainsi que pour ton aide et ton expertise technique. Sois assuré de toute ma gratitude.

Monsieur le Docteur Nicolas DUPLOYEZ
Praticien Hospitalier
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie moléculaire
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté d'évaluer cette thèse. Merci pour tes précieux conseils toujours pertinents, pour ton savoir en biologie moléculaire et pour ta relecture attentive de ce manuscrit. Sois assuré de ma sincère reconnaissance.

A mon directeur de thèse :

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

Je vous remercie de l'honneur que vous me faites en me confiant et en encadrant cette thèse. Je vous suis très reconnaissante pour votre soutien et pour la confiance que vous m'avez accordée en me confiant ce travail. Je vous remercie pour votre disponibilité, votre bienveillance et pour les opportunités que vous m'avez données à présenter dans des congrès ou des réunions régionales ou nationales. Soyez assuré de mon profond respect.

Je tiens également à remercier,

L'ensemble des biologistes du laboratoire d'Hématologie du CHRU de Lille, pour vos enseignements, votre sympathie et le partage de votre passion pour l'Hématologie. Ce fut un réel plaisir de travailler avec vous cette année.

Toute l'équipe des ingénieurs et des techniciens pour votre disponibilité, votre aide et votre bonne humeur durant ces 2 semestres passés au laboratoire. En particulier Nathalie Helevaut, pour son aide précieuse, ses conseils techniques et ses explications et Olivia, pour sa sympathie et son aide. Merci pour cette ambiance chaleureuse et accueillante.

Pascaline, pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire, pour tes enseignements, ton expertise et ta rigueur scientifique. Merci.

A mes co-internes,

De Rouen, de Lille et maintenant de Paris. C'était chouette !

A mes amis de la fac,

A Pauline, pour les soirées salsa, les soirées rock, les soirées tisanes, les soirées révisions et toutes ces soirées inopinées. Ces années pharma resteront un merveilleux souvenir !

A mes amis d'avant,

A Emilie, sans qui je n'aurais probablement pas choisi cette voie après le lycée.

A ma famille,

A ma petite Maman, pour ta présence, pour m'avoir donné cette volonté de bien faire, pour ton soutien et tes encouragements depuis le début de l'aventure. Je ne te remercierai jamais assez.

A Sophie, ma Soso, pour tout ce qu'on a traversé, de plaisant et de déplaisant, je peux compter sur toi. Je suis chanceuse d'être ta sœur.

A Cédric, mon Loulou, pour ta bonne humeur, ta générosité et ton altruisme. Je te souhaite le meilleur.

A Maxence, mon amour, pour avoir accepté la distance toutes ces années, pour ton soutien, ton réconfort et tes encouragements. Je te dois beaucoup !

Table des matières

INTRODUCTION	8
GENERALITES	9
I. Leucémogénèse.....	9
1) Notion de cellule souche leucémique	9
2) Mécanisme d'oncogénèse dans les LAM	9
a. Evènements oncogéniques	9
b. Evolution et architecture clonale	10
3) Leucémogénèse liée aux protéines NPM	11
a. Structure et rôle de NPM	11
b. Caractéristiques biologiques des mutations de <i>NPM1</i> dans les LAM	12
c. Leucémogénèse liée aux protéines NPM	15
d. Caractéristiques cliniques des mutations de <i>NPM1</i> dans les LAM	16
II. Généralités sur les LAM.....	17
1) Epidémiologie.....	17
2) Etiologies	18
3) Présentation clinique.....	18
4) Présentation biologique	18
a. Cytologie.....	18
b. Immunophénotypage.....	19
c. Cytogénétique	20
d. Biologie moléculaire	20
5) Classification des LAM.....	21
a. Classification FAB.....	21
b. Classification OMS.....	21
6) Facteurs pronostiques.....	23
a. Liés au patient	23
b. Liés aux altérations cytogénétiques	23
c. Liés à la biologie moléculaire	24
d. Liés à la réponse au traitement.....	24
7) Traitement des LAM.....	25
8) Suivi de la MRD dans les LAM	26
a. Marqueurs de suivi dans les LAM.....	26
b. Intérêt de la détection des mutations de <i>NPM1</i>	27

III.	Détection et quantification des mutations de <i>NPM1</i> au laboratoire.....	28
1)	Recherche des mutations du gène <i>NPM1</i>	28
2)	Identification de la mutation du gène <i>NPM1</i>	29
a.	Principe du séquençage par la méthode de Sanger	29
b.	Adaptation de la technique à la fluorescence.....	29
3)	Quantification de la mutation du gène <i>NPM1</i>	30
a.	Principe.....	30
b.	Mise en évidence de l'amplification.....	30
c.	Profils d'amplification.....	31
d.	Quantification après normalisation par un gène contrôle.....	32
	OBJECTIFS	33
	MATERIELS ET METHODES	34
I.	Préparation des acides nucléiques.....	34
1)	Isolements cellulaires	34
2)	Extraction de l'ARN.....	34
a.	Extraction manuelle par le TRIzol®	34
b.	Extraction automatisée par le Maxwell®	35
3)	Dosage et normalisation des ARN	35
4)	Rétro-transcription.....	35
II.	La PCR digitale (digital droplet PCR, ddPCR)	35
1)	Principe.....	35
2)	Génération des gouttelettes	36
3)	Amplification clonale par PCR	36
4)	Nature du signal	37
5)	Lecture du signal	37
6)	Analyse des données	38
7)	Loi de Poisson.....	39
III.	Expérimentation.....	40
1)	Echantillons	40
2)	Matériels	41
3)	Réactifs	42
4)	Protocole	43

RESULTATS.....	44
I. Mise au point et optimisation du protocole de PCR digitale	44
1) Détermination de la température d'hybridation optimale	44
2) Limites de mesure	45
a. Limite de blanc	45
b. Limite de linéarité.....	46
c. Limite de détection	47
d. Détection des contaminations	47
II. Validation de la méthode	47
1) Fidélité.....	47
a. Répétabilité	48
b. Fidélité intermédiaire	48
2) Exactitude.....	48
3) Comparaison de méthodes	49
III. Observations cliniques	50
1) Comparaison aux résultats de l'ALFA-0702.....	50
2) Quelques exemples intéressants.....	52
DISCUSSION	54
CONCLUSION	57
ANNEXES.....	58
BIBLIOGRAPHIE.....	64

INTRODUCTION

Les leucémies aigües myéloïdes (LAM) constituent un groupe hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par la prolifération clonale dans la moelle osseuse de précurseurs myéloïdes dont la différenciation est bloquée à un stade précoce. Elles sont alors définies par une multiplication incontrôlée de blastes dans la moelle osseuse et dans le sang associée à un déficit en cellules matures (insuffisance médullaire) dû au pouvoir proliférant très important de cette population qui inhibe l'hématopoïèse normale. Le caractère aigu est défini par l'apparition rapide des signes cliniques ou biologiques, en moins de quelques semaines, et le caractère rapidement létal des troubles viscéraux engendrés en l'absence de traitement efficace.

Il s'agit de maladies très hétérogènes dues à l'accumulation de modifications génétiques somatiques acquises dans les cellules progénitrices hématopoïétiques à l'origine de l'altération des mécanismes d'auto-renouvellement, de la prolifération et de la différenciation. Elles touchent majoritairement le sujet âgé. Le traitement repose essentiellement sur la chimiothérapie, éventuellement complétée d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en fonction du pronostic de la maladie et de la capacité du patient à en supporter la toxicité. Si la guérison est possible dans 30 à 50% des cas, les taux et durées de rémission sont très disparates.

Le classement des patients en groupes de pronostic conditionnant leur prise en charge est indispensable. Il intègre des facteurs pronostiques liés au patient et à la pathologie. La réponse au traitement évaluée par la mesure de la maladie résiduelle (*Mesurable Residual Disease*, MRD) en cours de traitement est un facteur pronostique de choix. Les marqueurs de MRD valides ne sont pas présents dans toutes les LAM et leur qualité varie.

Les mutations du gène *NPM1* sont retrouvées dans 35% des LAM, et dans 60% des LAM à caryotype normal pour lesquelles elles constituent un facteur pronostique majeur [1]. Plus de 50 mutations localisées dans l'exon 11 du gène *NPM1* ont été identifiées [2]. En pratique clinique la quantification des transcrits *NPM1*-mutés est réalisée par RT-PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR) pour les formes A, B et D qui prédominent chez 95% des patients. Cette quantification n'est pas réalisée pour les autres variants, dits rares, à défaut de calibrant existant. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'aptitude de la PCR digitale à quantifier les mutations rares de *NPM1* afin de valider cette technique pour une utilisation prospective.

GENERALITES

I. Leucémogénèse

1) Notion de cellule souche leucémique

Les leucémies sont des maladies clonales et acquises de la CSH ou d'un précurseur déjà commis vers les lignées lymphoïdes ou myéloïdes. On parle alors de cellules souches leucémiques (CSL). L'existence des CSL a été mise en évidence par des travaux de l'équipe de John Dick sur des modèles murins. La transplantation de cellules primaires de LAM dans des souris immunodéficientes a permis de démontrer que seule une fraction minoritaire de cellules est susceptible d'initier une LAM et de maintenir la croissance du clone leucémique à long terme *in vivo* [3], [4]. En plus de leur capacité à se différencier et proliférer, ces cellules possèdent un fort potentiel d'auto-renouvellement.

L'hématopoïèse leucémique se développe en parallèle de l'hématopoïèse normale et conserve certaines caractéristiques, notamment la résistance à l'apoptose induite par les agents de chimiothérapie. Cette haute résistance résulte de la propension à la quiescence et de l'expression de plusieurs gènes de multi-résistance aux traitements [5]. Les thérapeutiques actuelles restent ainsi peu efficaces sur le compartiment souche responsable des rechutes. Une meilleure caractérisation et une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires régulant les CSL sont nécessaires à la mise en place de thérapeutiques susceptibles d'éradiquer définitivement ce pool minoritaire de cellules.

2) Mécanisme d'oncogénèse dans les LAM

a. Evènements oncogéniques

L'étude des mécanismes moléculaires aboutissant au phénotype leucémique a permis de mettre en évidence un processus en plusieurs étapes, nécessitant la collaboration d'au moins deux évènements oncogéniques mutationnels. Une mutation qui confère un avantage sélectif à une cellule est appelée mutation « driver », à l'inverse de la mutation « passager ». Les sous-clones tumoraux sont en compétition entre eux et contre les cellules normales pour occuper l'espace et les ressources du microenvironnement tissulaire. Une modification de cet écosystème peut conférer un avantage sélectif à une mutation initialement « passager » (par exemple une mutation de chimiorésistance). Cette classification binaire des mutations dépend donc du contexte.

Parmi les cancers, les LAM possèdent l'un des plus faibles nombres de mutations par cas, malgré une grande hétérogénéité entre les individus [6]. Ces mutations, rares, surviennent de façon aléatoire et sont puissantes sur le plan oncogénique [7]. Selon le « two-hit model » de la leucémogénèse, la coopération d'au moins deux types de mutations différents est nécessaire à la transformation leucémique. Une mutation de classe I qui active la transduction du signal et confère un avantage prolifératif, et une mutation de classe II qui affecte les facteurs de transcription et cause un blocage de la différenciation et l'apoptose [8]. L'événement initiateur serait de classe II et la mutation de classe I plus tardive. De nombreuses autres mutations géniques ont été identifiées et de nouvelles catégories sont apparues (Figure 1) ce

qui a permis de mieux préciser la complexité de la leucémogénèse et de mieux caractériser l'hétérogénéité (Figure 2) et l'évolution clonale des LAM [6].

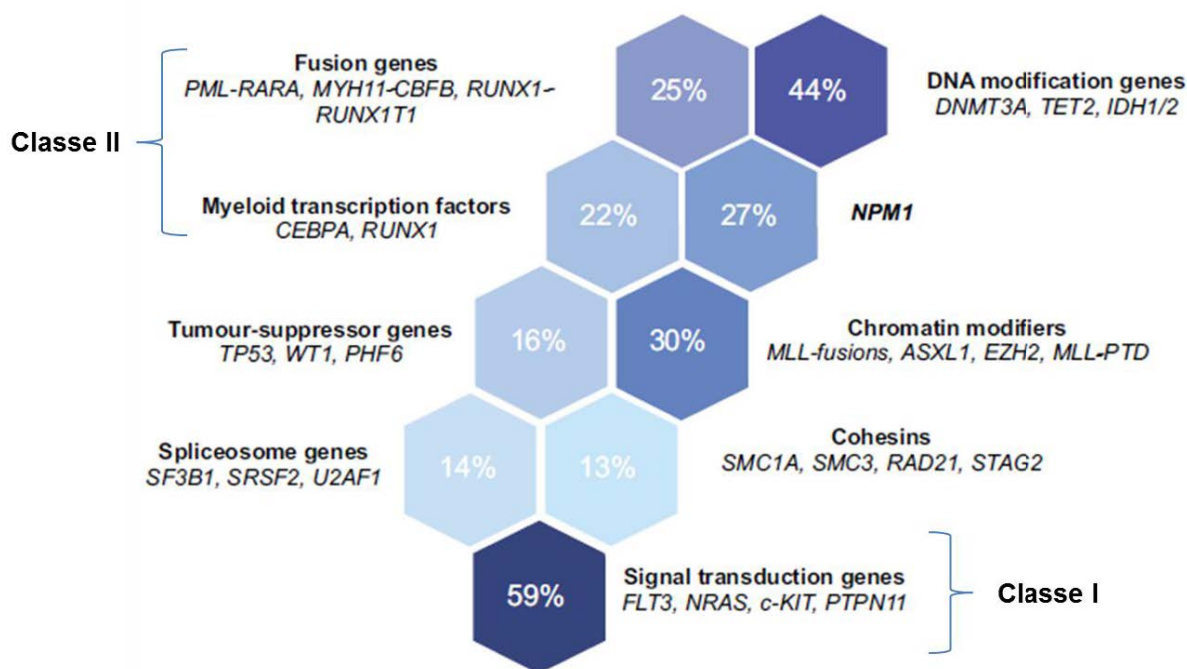


Figure 1 : Principaux groupes de mutations récurrentes dans les LAM *de novo* [7]

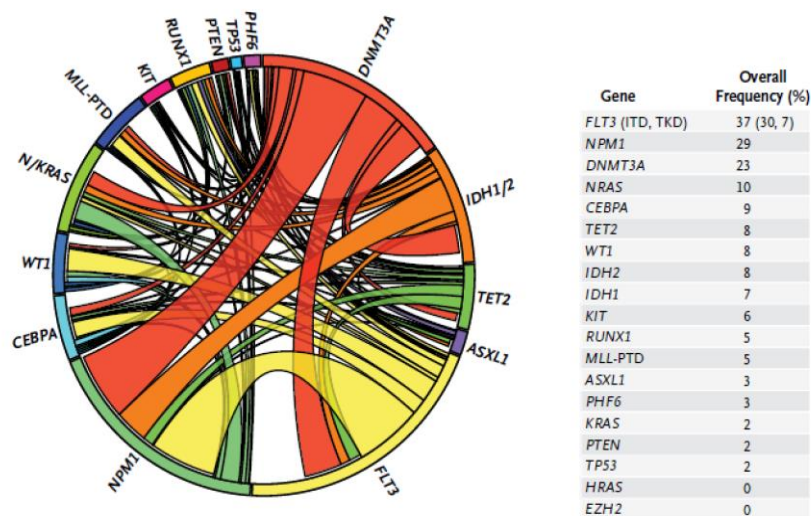


Figure 2 : Affinité élective des oncogènes des LAM [9]

b. Evolution et architecture clonale

L'évolution clonale peut être imaginée comme une succession de mutations « driver », où chaque nouveau clone se développe largement et domine le précédent. L'architecture clonale est alors dite linéaire (Figure 3A). Néanmoins les méthodes de séquençage haut débit ont révélé que les LAM ont une architecture clonale plus complexe où la diversité et la domination relative des sous-clones varie au cours de la maladie [10], définissant un modèle d'architecture complexe ramifiée (Figure 3B).

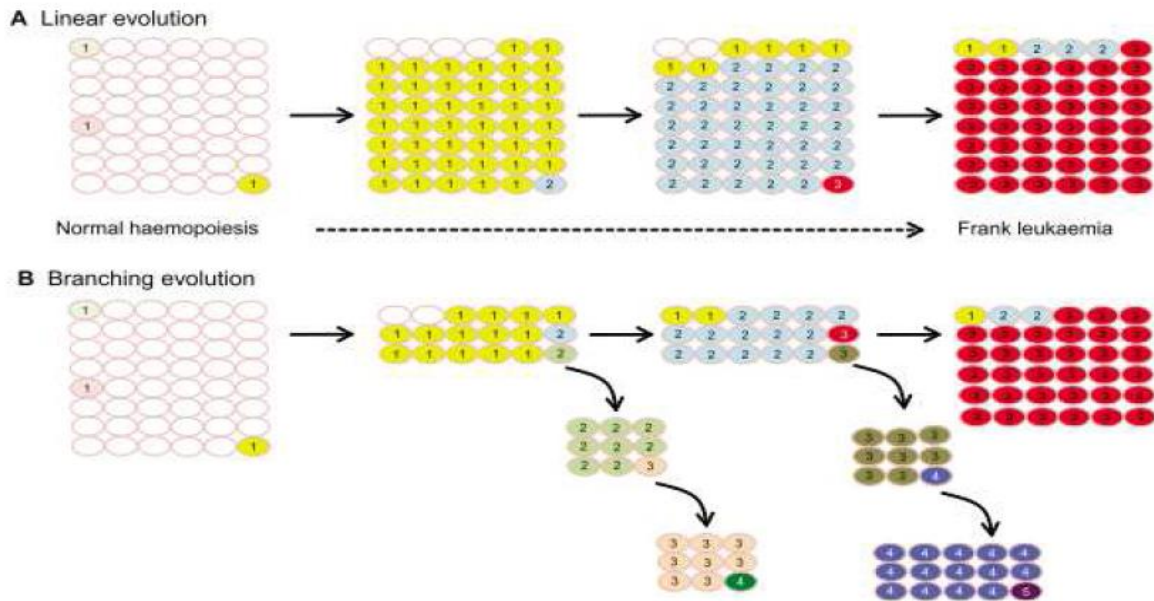


Figure 3 : Evolution clonale linéaire ou ramifiée des LAM [7]

3) Leucémogénèse liée aux protéines NPM

a. Structure et rôle de NPM

La nucléophosmine (NPM) est une phosphoprotéine de 294 acides aminés exprimée de manière ubiquitaire chez différentes espèces et hautement conservée [11], [12]. Le gène qui code pour NPM (*NPM1*) est localisé sur le chromosome 5q35 et contient 12 exons [13]. La protéine codée a une localisation initiale nucléolaire mais a un rôle de navette entre le noyau et le cytoplasme durant le cycle cellulaire (Figure 4) [14].

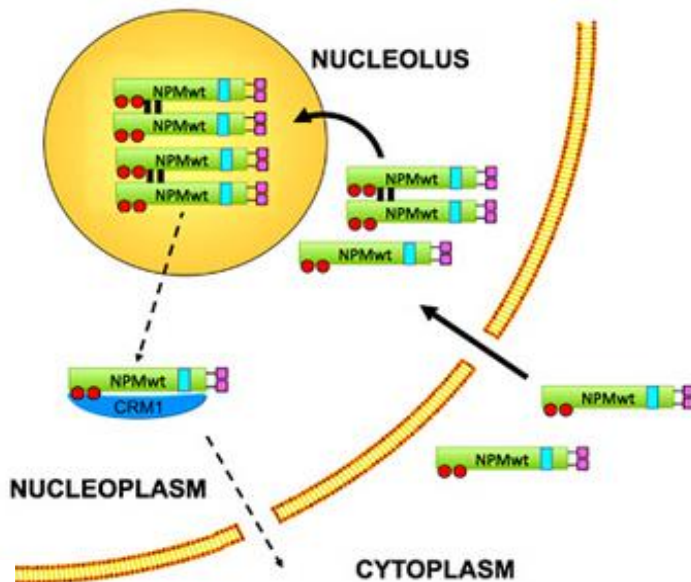


Figure 4 : Mécanisme du transport nucléo-cytoplasmique de NPM sauvage (NPMwt).

L'import nucléaire de la protéine (flèche) prédomine largement sur l'export nucléaire (flèche discontinue). Par conséquent, NPMwt réside majoritairement dans le nucléole [15].

NPM est une phosphoprotéine nucléolaire multifonctionnelle qui joue un rôle important dans de nombreux processus cellulaires. Plusieurs études suggèrent que NPM joue un rôle crucial dans la croissance, la prolifération et la transformation cellulaire [16].

Elle joue un rôle clé dans la **biogénèse ribosomale** grâce à ses propriétés de navette qui assurent un transport correct des éléments du noyau vers le cytoplasme et grâce à ses propriétés de protéine chaperonne régulant l'assemblage du ribosome en prévenant l'agrégation protéique [17]. D'autres propriétés impliquent NPM dans la biogénèse ribosomale comme son activité RNase intrinsèque [18] et sa capacité de liaison aux acides nucléiques [19].

Elle possède des activités moléculaires de **protéine chaperonne** dont l'inhibition de l'agrégation protéique, la protection des activités enzymatiques vis-à-vis de la dénaturation thermique de plusieurs protéines et elle facilite la renaturation des protéines dénaturées chimiquement [20]. NPM est aussi une chaperonne d'histones impliquée dans l'assemblage d'histones, l'assemblage du nucléosome et favorisant la transcription acétylation-dépendante [21], [22].

L'inactivation de NPM engendre une duplication du centrosome non contrôlée et une instabilité génomique [23] avec un risque majoré de transformation cellulaire. NPM agit donc comme un système de **contrôle de la duplication du centrosome** [24], [25] qui assure la coordination entre la duplication du centrosome et de l'ADN et qui veille à la restriction de la duplication du centrosome à une fois unique par cycle cellulaire. NPM participe également au maintien de la **stabilité génomique** à travers la réparation de l'ADN et/ou la réponse aux dommages [26].

De plus NPM joue un rôle clé dans le **contrôle de la prolifération et de l'apoptose** lors du **cycle cellulaire** via ses interactions avec les suppresseurs de tumeur p53 et ARF (*Alternate Reading Frame*) et leurs partenaires [27]. NPM est cruciale pour la stabilisation et l'activation de p53 en réponse au stress cellulaire [28]. HMDM2 (*Human MDM2*) est une protéine nucléoplasmique et nucléolaire qui contrôle le niveau de p53 en agissant comme une E3 ubiquitine ligase initiant la dégradation de p53 par le protéasome [29]. Le stress cellulaire entraîne une localisation nucléoplasmique de NPM qui va inhiber HMDM2 entraînant une activation et une stabilisation de p53 [30]. NPM joue donc un rôle majeur dans la potentialisation de l'arrêt du cycle cellulaire p53-dépendant.

La protéine ARF est une protéine nucléolaire impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose à la suite d'un stress oncogénique. Elle inhibe HMDM2 en la redirigeant vers le nucléole entraînant une stabilisation et une activation de p53 [31], [32]. NPM s'associe à ARF, la protège de la dégradation et facilite ainsi son activation [33]–[35]. En plus de ces voies p53-dépendantes, ARF régule également le cycle cellulaire via des voies indépendantes de p53. ARF bloque la prolifération cellulaire en inhibant le rôle de navette de NPM inhibant ainsi la biogénèse ribosomale [36], [37]. Il semblerait que l'interaction de ARF et NPM dans le nucléole facilite le contact entre ARF et la machinerie ribosomale [33].

b. Caractéristiques biologiques des mutations de *NPM1* dans les LAM

Les mutations somatiques dans l'exon 11 (anciennement identifié comme l'exon 12) du gène qui code pour la protéine NPM ont été décrites comme une altération génétique ayant des implications cliniques et pronostiques importantes dans les LAM de l'adulte et de l'enfant [1], [38]. Les mutations de *NPM1* (*NPM1m*) sont une des plus fréquentes anomalies génétiques dans les LAM de l'adulte, retrouvées dans 35% des LAM et dans 50 à 60% des LAM à

caryotype normal (LAM-CN) [39], [40]. Leur incidence augmente avec l'âge [41]. Chez les enfants, les mutations de *NPM1* sont bien moins fréquentes, elles sont retrouvées dans 8 à 10% des LAM et dans environ 25% des LAM-CN [42]. La *NPM1m* dans les LAM prédomine chez les patients avec un CN et est mutuellement exclusive des translocations chromosomiques récurrentes [1], [38], [41]–[45].

En 2005 Falini *et al.* ont décrit 6 variants de *NPM1m* (Figure 5). La mutation la plus fréquente (mutation A) est une duplication en tandem d'un tétranucléotide TCTG entre les positions 860 et 863 de la séquence de référence (GenBank accession number NM_002520) (Figure 5). Le décalage du cadre de lecture qui en résulte altère la portion C-terminale de la protéine NPM en remplaçant les sept derniers acides aminés (WQWRKSL) par onze résidus différents (CLAVEEVSLRK). Les mutations B, C et D consistent en des insertions différentes de 4 paires de bases (pb) entre les positions 863 et 864, aboutissant au même décalage du cadre de lecture que la mutation A. Dans les variants E et F, les nucléotides 869 à 873 (GGAGG) sont délétés et deux séquences différentes de 9 pb sont insérées, entraînant le même décalage et un motif C-terminal différent de 9 acides aminés. Ces 6 protéines NPM mutantes ont des mutations dans au moins un des résidus tryptophanes 288 et 290 et partagent les mêmes cinq derniers résidus (VSLRK) (Figure 5). Par conséquent, malgré une hétérogénéité génomique, ces *NPM1m* conduisent toutes à une modification de la séquence au niveau du domaine C-terminal de la protéine NPM [1].

Type of Mutation	GenBank Accession No.	Sequence	Predicted Protein	No./No. of Cases (%)
None (wild type)	NM_002520	GATCTCTG...GCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQWRKSL	40/52 (77)
Mutation A	AY740634	GATCTCTGCTGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK	7/52 (13)
Mutation B	AY740635	GATCTCTGCATGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCMAVEEVSLRK	1/52 (2)
Mutation C	AY740636	GATCTCTGCGTGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCVAVEEVSLRK	1/52 (2)
Mutation D	AY740637	GATCTCTGCCTGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK	1/52 (2)
Mutation E	AY740638	GATCTCTG...GCAGTCTCTTGGCCAAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWOSLACVSLRK	1/52 (2)
Mutation F	AY740639	GATCTCTG...GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWOSLEK VSLRK	1/52 (2)

Figure 5 : Les variants de *NPM1m* décrits en 2005 [1]

Depuis leur découverte, plus de 55 mutations différentes ont été décrites, mais trois types de mutation (A, B et D) prédominent dans 95% des cas [39], [46], [47].

Les altérations structurales au niveau du domaine C-terminal de la protéine mutée conduisent à une localisation aberrante de la protéine dans le cytoplasme des blastes leucémiques (Figure 6) [1]. La quasi-totalité des *NPM1m* dans les LAM impliquent des insertions décalant le cadre de lecture dans l'exon 11 [38]. Ces mutations entraînent un changement de la séquence et un clivage précoce dans le motif du signal d'export nucléaire (NES) de la protéine NPM conduisant à un NES plus fort, responsable de la localisation cytoplasmique de la protéine.

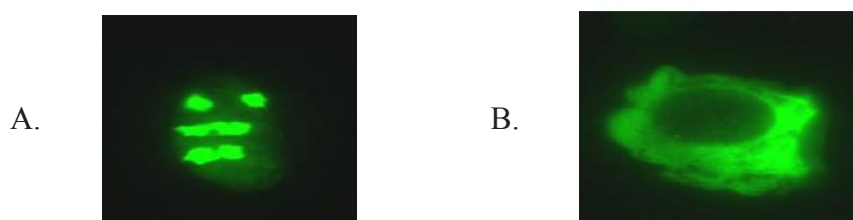


Figure 6 : Localisation nucléolaire de NPM sauvage (A) et localisation cytoplasmique aberrante de NPM mutée (B).

Le transport de NPMwt est régi par 3 motifs fonctionnels (Figure 7A) :

- 2 motifs NES localisés au niveau de l'extrémité N-terminale de la protéine (domaine de dimérisation), dépendants de CRM1 (également appelée XPO1 pour Exportin 1) [48], [49]. CRM1 se lie spécifiquement aux protéines NPM grâce aux motifs NES et les transporte vers le cytoplasme.

- le motif du signal de localisation nucléaire (NLS) qui transporte NPM du cytoplasme au nucléoplasme, puis jusqu'au nucléole via ses domaines de liaison au nucléole [50].

- une région aromatique à l'extrémité C-terminale contenant le signal de localisation nucléolaire avec les tryptophanes 288 et 290.

Dans les cellules saines NPM est principalement localisée dans le nucléole puisque l'export nucléaire est peu efficace. La variabilité en termes d'efficacité fonctionnelle du motif NES des NPM est due à des différences d'affinité avec CRM1 [51]. La protéine NPM mutée dans les LAM diffère de NPMwt de part un NLS perturbé par des mutations touchant les résidus tryptophanes 288 et 290 ou 290 seulement et par la présence d'un motif NES supplémentaire à l'extrémité C-terminale de la protéine (Figure 7B) [15]. Ces deux altérations sont essentielles à la localisation cytoplasmique aberrante des mutants NPM (Figure 8) [52]. Le maintien de la structure tertiaire du domaine C-terminal dépend des tryptophanes 288 et 290 qui forment un cœur hydrophobe. Cette conformation est essentielle à la liaison de NPMwt au nucléole [53].

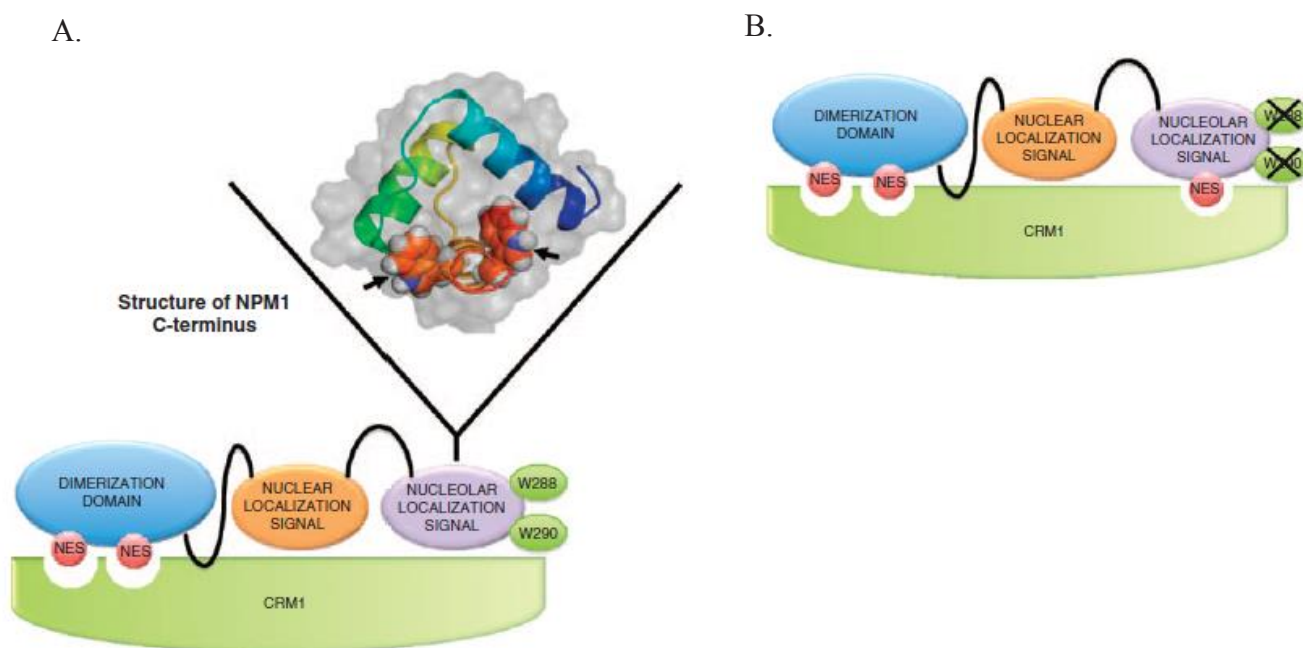


Figure 7 : Structure de NPMwt (A) et mutée (B). (A) Structure tridimensionnelle de la partie C-terminale de NPMwt avec les tryptophanes 288 et 290 (flèches) [15].

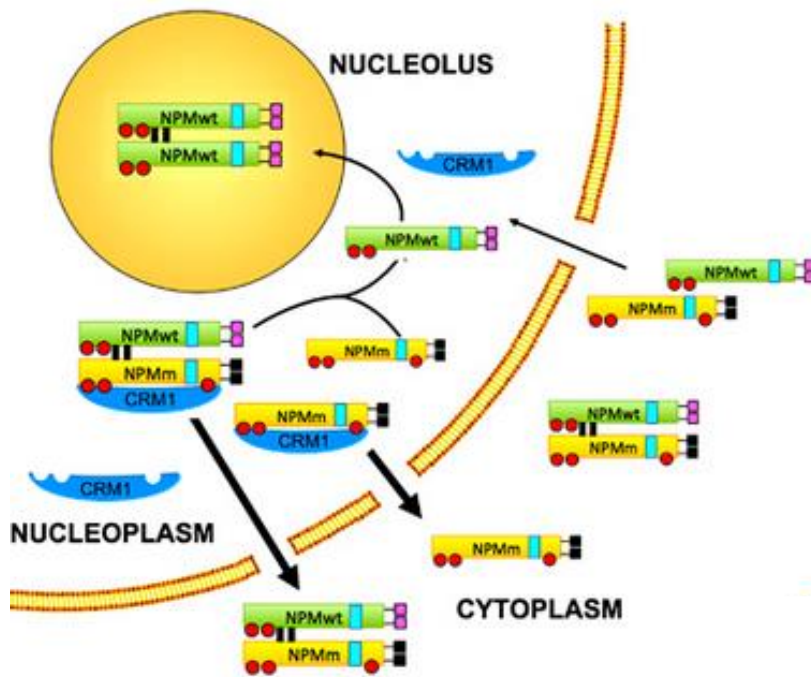


Figure 8 : Mécanisme de l'expression cytoplasmique aberrante de NPM (mutée et sauvage) dans les LAM avec *NPM1m*.

L'export nucléaire (flèches grasses) prédomine sur l'import nucléaire (flèches fines). Les carrés violets représentent les tryptophanes 288 et 290 ; les carrés noirs représentent les tryptophanes mutés ; le rectangle turquoise représente le NLS ; les cercles rouges représentent les motifs du NES. [15]

Il semble y avoir une corrélation entre le type de motif NES inséré dans la protéine mutante et les mutations des tryptophanes 288 et 290. Le motif NES majoritaire (L-xxx-V-xx-V-x-L) est présent dans 29/55 variants décrits parmi lesquels les 3 plus fréquents A, B et D [38]. Le motif NES des autres variants présente un autre acide aminé hydrophobe à la place de la valine à la deuxième ou troisième position [43]. Le motif NES majoritaire requière la perte des 2 tryptophanes pour être efficacement transporté en dehors du noyau, alors que les autres motifs NES peuvent être exportés efficacement malgré la conservation du tryptophane 288, suggérant qu'ils sont fonctionnellement plus forts que le motif majoritaire [51], [52]. Ces observations suggèrent qu'il existe une pression de sélection mutationnelle envers l'efficacité du transport vers le cytoplasme, impliquant que cette délocalisation est un événement critique de la leucémogénèse.

Dans les LAM de l'adulte, la mutation A représente environ 80% des cas de *NPM1m* [43] alors que chez l'enfant elle représente entre 11 et 50% des cas [42], [54]–[56]. Par conséquent, chez l'enfant les motifs NES variants sont plus fréquents que chez l'adulte [42], [54], [55]. Ces données suggèrent une différence significative entre les mécanismes moléculaires des LAM *NPM1m* des adultes et des enfants.

c. Leucémogénèse liée aux protéines NPM

Cette localisation cytoplasmique aberrante de la protéine NPM mutée perturbe de multiples voies cellulaires via des pertes et des gains de fonctions, critiques pour la transformation leucémique [15], [38], [39], [47]. Le rôle exact de NPM mutée dans la leucémogénèse reste à déterminer. Un des mécanismes possibles implique l'interaction de NPM mutée et du suppresseur de tumeur ARF. NPM mutée se lie à ARF et la délocalise vers le cytoplasme, inhibant son interaction avec HMDM2 prévenant ainsi l'initiation de p53 [57], [58]. En plus de perturber les activités d'ARF dépendantes de p53, NPM mutée perturbe des voies indépendantes de p53 via la déstabilisation d'ARF. NPM mutée délocalise NPMwt vers le cytoplasme empêchant la stabilisation d'ARF [57], [59]. Cependant ces perturbations des fonctions d'ARF semblent insuffisantes pour expliquer l'effet oncogénique des *NPM1m* [57]

suggérant que d'autres facteurs, tels que des modifications d'autres fonctions de NPMwt, sont impliqués. En effet, la perte de NPM affecte significativement la stabilité génomique et accroît la susceptibilité à la transformation oncogénique, principalement myéloïde [23], [60].

Bonetti *et al.* [61] suggèrent un autre mécanisme impliquant NPM mutée dans la leucémogénèse. NPM régule le renouvellement de l'oncoprotéine c-Myc en interagissant avec la protéine Fbw7 γ , un composant du complexe E3 ligase impliqué dans l'ubiquitination et la dégradation par le protéasome de c-Myc. NPM mutée stabilise c-Myc en délocalisant la protéine Fbw7 γ vers le cytoplasme où elle est dégradée [61]. NPM mutée faciliterait ainsi l'hyperprolifération induite par l'oncogène c-Myc. Une telle hyperprolifération entraîne normalement l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire via ARF et p53 [62] or NPM mutée perturbe l'activité de ces deux suppresseurs de tumeur. Ainsi *NPM1m* active la prolifération et atténue la réponse dépendante d'ARF et de p53 ce qui accélère la leucémogénèse.

Il a été rapporté récemment que NPM mutée délocalise le facteur de transcription de la lignée monocyttaire PU.1 dans le cytoplasme, alors que CEBP α et RUNX1, les principaux facteurs de transcription qui collaborent avec PU.1 pour activer la lignée granulo-monocytaire, restent dans le noyau. Sans PU.1 leurs interactions de corégulation passent de coactivateurs à corépresseurs, réprimant ainsi plus de 500 gènes de la différenciation terminale granulo-monocytaire [63].

Brunetti *et al.* [64] ont montré en 2018 que la relocalisation dans le noyau ou la dégradation ciblée de NPM mutée restaure la différenciation des cellules leucémiques. Les cellules *NPM1* mutées dépendent donc largement de la localisation cytoplasmique de NPM ; l'inhibition de l'export nucléaire médié par XPO1 relocalise NPM mutée dans le noyau. Cette voie semble être un axe thérapeutique à explorer.

Patel *et al.* [65] ont montré que les *NPM1m* sont toujours associées à des mutations additionnelles. Dans leur étude presque tous les patients ayant une LAM avec *NPM1m* présentaient également une mutation dans les gènes impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN (*DNMT3A*, *TET2*, *IDH1*, *IDH2*), l'épissage de l'ARN (*SRSF2*, *SF3B1*) ou le complexe cohésine (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) avec des charges alléliques plus élevées que la *NPM1m* coexistante. Ces données suggèrent que les *NPM1m* sont présentes dans des sous-clones et sont des événements secondaires dans la pathogénèse des LAM. Les *NPM1m* sont précédées par des mutations fondatrices (*DNMT3A*, *TET2*) qui peuvent être associées à un état préclinique tel que l'hématopoïèse clonale de potentiel indéterminé (CHIP) [66], [67].

d. Caractéristiques cliniques des mutations de *NPM1* dans les LAM

La localisation cytoplasmique aberrante de NPM suite à une *NPM1m* est un événement propre aux LAM [68]. La *NPM1m* est fortement associée aux LAM *de novo* ; les LAM secondaires aux syndromes myéloprolifératifs/myélodysplasiques (SMP/SMD) et les LAM thérapies-induites ont rarement des *NPM1m* [1], [43]. De plus, *NPM1* est situé dans une région du chromosome 5 fréquemment délétée dans les SMD thérapie-induits [69].

Les patients porteurs d'une *NPM1m* sont deux fois plus à risque que ceux qui n'ont pas la mutation de présenter une duplication interne en tandem (ITD) de *FLT3*. Environ 40% des

patients avec une LAM-*NPM1m* sont également porteurs de *FLT3*-ITD comparé à environ 15 à 25% chez les patients sans *NPM1m* [1], [41], [43], [44], [70]. Ces mutations sont des événements secondaires à un processus initiateur qui prédispose la cellule souche myéloïde ou les progéniteurs myéloïdes aux erreurs dans la réparation de l'ADN.

Bien que la présence peu fréquente (15%) d'anomalies chromosomiques associées ne modifie pas le pronostic des LAM-*NPM1m* [71]–[73], le pronostic peut être significativement modifié par des remaniements moléculaires tels que des mutations sur les gènes *FLT3* et *DNMT3A*, retrouvés respectivement dans 40% et 50% des cas de LAM-*NPM1m* [40], [47], [71]. Le pronostic favorable observé chez les patients ayant une LAM-*NPM1m* est limité aux cas sans *FLT3*-ITD associée [47] ou avec un *FLT3*-ITD à faible (<0,5) ratio allélique [70], [74]. Ces deux groupes sont considérés favorables selon la classification pronostique de l'ELN (European LeukemiaNet), contrairement aux LAM-*NPM1m* avec un *FLT3*-ITD à fort ($\geq 0,5$) ratio allélique, caractérisées par un taux de rechute plus élevé et une survie globale moins bonne [71], classées dans la catégorie de risque intermédiaire.

Etant donné leurs caractéristiques biologiques et cliniques typiques et leur pertinence clinique évidente, les LAM-*NPM1m* sont devenues une entité de la catégorie « LAM avec anomalies génétiques récurrentes » lors de la révision 2016 de la classification OMS (Organisation Mondiale de la Santé) des LA [75].

II. Généralités sur les LAM

1) Epidémiologie

Les LAM représentent 80% des LA de l'adulte et 20% des LA de l'enfant. Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 2,6/100 000 habitants/an chez l'homme et de 2,3/100 000 habitants/an chez la femme soit un sex-ratio de 1,1 [76]. On estime qu'en 2012 en France, il y a eu environ 2800 nouveaux cas, l'incidence est en augmentation régulière depuis 1980, sachant que la part attribuable aux changements démographiques (vieillesse de la population) correspond environ à 40% de l'augmentation du nombre des cas sur cette période [76].

Cette pathologie touche essentiellement le sujet âgé avec un âge médian au diagnostic de 71 ans (Figure 9). Il existe un pic de fréquence chez les enfants de moins de 5 ans (8 cas pour 100 000 habitants).

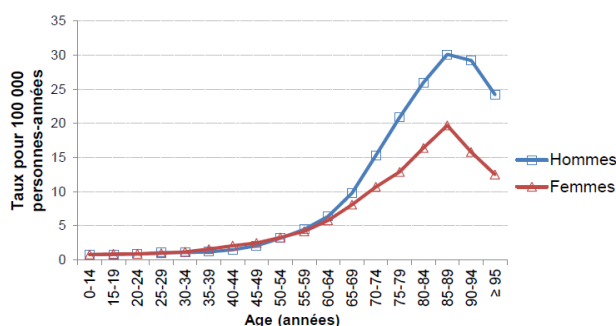


Figure 9 : Incidence des LAM par tranche d'âge et par sexe [76]

Ces affections sont de mauvais pronostic avec une survie relative à 5 ans qui ne dépasse pas 65% chez les enfants [77] et 20 % chez l'adulte [78].

2) Etiologies

Les facteurs étiologiques démontrés sont variés :

- L'exposition à des agents chimiques : benzène, anti-cancéreux (alkylants, inhibiteurs de topo-isomérase II),
- L'exposition à des agents physiques : notamment les radiations ionisantes,
- Les facteurs génétiques constitutionnels favorisant l'instabilité génétique : trisomie 21, syndrome de Shwachman-Diamond, maladie de Fanconi,
- L'âge, par le phénomène de « vieillissement » des cellules souches, engendrant des défauts de réparation de l'ADN responsables de modifications génétiques ou chromosomiques,
- La présence d'hémopathies myéloïdes préexistantes à la LAM : SMP ou SMD.

3) Présentation clinique

La présentation clinique résulte de deux conséquences de la maladie : l'insuffisance médullaire et la prolifération des blastes dans les organes à l'origine du syndrome tumoral. Les circonstances du diagnostic sont variables, allant de la découverte fortuite sur un hémogramme aux symptômes graves nécessitant l'hospitalisation en urgence.

L'insuffisance médullaire peut se manifester à travers trois syndromes :

- Anémique : d'installation rapide et souvent mal toléré (pâleur, asthénie et dyspnée),
- Infectieux : secondaire à la neutropénie (fièvre, infections à répétitions de la sphère ORL et pulmonaire),
- Hémorragique : cutané ou muqueux, lié à la thrombopénie, éventuellement aggravé par une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) notamment dans les LA promyélocyaires (LAP).

Le syndrome tumoral regroupe les signes cliniques liés à l'infiltration des tissus par les cellules blastiques : hépatosplénomégalie, douleurs osseuses, hypertrophies au niveau gingival ou testiculaire, lésions cutanées ou méningite blastique. L'hyperleucocytose entraîne une hyperviscosité sanguine et a un retentissement clinique à partir de 100 Giga/Litre (G/L) : une leucostase à retentissements pulmonaire (dyspnée, détresse respiratoire) et/ou cérébral (troubles de la conscience, coma, convulsions). Le syndrome de leucostase est un signe clinique de gravité qui peut mettre en jeu le pronostic à court terme.

4) Présentation biologique

a. Cytologie

L'hémogramme

La numération formule sanguine fera suspecter une LAM devant l'existence de cytopénie(s) associée(s) ou non à la présence de blastes. La leucocytose est très variable : allant de la leucopénie franche à une hyperleucocytose supérieure à 100 G/L. La neutropénie est fréquente. L'anémie de cause centrale, majoritairement normocytaire, normochrome et arégénérative est quasi-constante. La thrombopénie est fréquente. La blastose est variable.

L'examen du frottis sanguin coloré au May-Grunwald Giemsa permet de mettre en évidence les blastes circulants : ce sont des cellules présentant un rapport nucléocytoplasmique élevé,

une chromatine fine contenant souvent un ou plusieurs nucléoles visibles et un cytoplasme basophile. Leur morphologie est variable d'un sous-type à l'autre (granulations, corps d'Auer). L'ELN recommande un décompte sur au moins 200 cellules [71].

Le myélogramme

Le myélogramme est indispensable au diagnostic. Il permet d'affirmer le diagnostic et de typer la leucémie d'un point de vue morphologique. Il doit montrer une infiltration médullaire blastique au moins égale à 20% sauf en cas de translocation t(15;17), t(8;21), inv(16) ou t(16;16) où la seule présence de l'anomalie cytogénétique pose le diagnostic [75]. L'ELN recommande un décompte sur au moins 500 cellules [71].

L'étude cytochimique des blastes permet de mettre en évidence des activités enzymatiques spécifiques. Une activité myéloperoxydase (MPO) positive dans plus de 3% des blastes permet d'affirmer la nature myéloïde de la LA. Les estérases non spécifiques (hydrolyse du NASDA) sont faiblement positives dans les myéloblastes, elles sont positives et inhibées par le fluorure de sodium dans les monoblastes et monocytes.

Ces données permettent la catégorisation de la LAM selon la classification FAB (*French American British*). En cas d'aspiration médullaire pauvre, non informative, le myélogramme est complété par l'étude immunohistochimique d'une biopsie ostéo-médullaire (BOM).

b. Immunophénotypage

Cet examen repose sur l'utilisation de la cytométrie en flux (CMF) multiparamétrique qui permet d'étudier à haut débit par immunofluorescence toute préparation cellulaire en suspension. Les antigènes exprimés par une cellule (CD ou *clusters of differentiation*) permettent de la caractériser grâce à des anticorps couplés à des fluorochromes.

L'immunophénotypage permet :

- de déterminer l'appartenance à une lignée cellulaire précise : LA myéloïde, lymphoblastique ou biphénotypique caractérisée par l'expression concomitante de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes par les blastes,
- de préciser le stade de différenciation des cellules blastiques,
- d'identifier la présence de marqueurs au niveau des cellules blastiques en vue de l'utilisation d'une thérapie ciblée par des anticorps monoclonaux,
- de détecter les phénotypes aberrants utiles au suivi de la maladie résiduelle.

Le panel d'anticorps recommandé par l'ELN pour l'immunophénotypage des LAM cible les marqueurs cellulaires de surface et cytoplasmiques suivants [71] :

Précurseurs : HLA-DR, CD34, CD117, CD33, CD13

Lignée granuleuse : CD65, MPO cytoplasmique

Lignée monocyttaire : CD11c, CD14, CD36, CD64, lysozyme

Lignée mégacaryocytaire : CD41, CD61

Lignée érythroblastique : CD235a, CD36

c. Cytogénétique

Le caryotype médullaire fournit une aide diagnostique et pronostique indispensable à la prise en charge d'une LAM. Le caryotype des cellules blastiques permet l'obtention des chromosomes en métaphase afin de mettre en évidence des anomalies chromosomiques. Ces anomalies peuvent être des anomalies de nombre (plus ou moins de 46 chromosomes), de structure (modification dans la succession de plusieurs loci) ou de réparation (cassures chromosomiques). Pour être interprétable l'établissement d'un caryotype normal nécessite l'analyse d'au moins 20 mitoses. Ce nombre est recommandé mais non obligatoire en présence d'une anomalie [79]. Une anomalie est considérée clonale si 2 mitoses sont porteuses de cette anomalie, en cas de réarrangement structural ou de gain de chromosome, ou 3 mitoses en cas de perte. La formule chromosomique est écrite selon la nomenclature ISCN 2016 (*International System for Human Cytogenomic Nomenclature 2016*).

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

La cytogénétique conventionnelle peut être complétée par une analyse de cytogénétique moléculaire. La technique d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH) permet de confirmer la présence de certains remaniements ou de détecter des remaniements cryptiques, non vus en cytogénétique conventionnelle. Elle consiste en l'utilisation de sondes marquées directement ou indirectement avec un ou plusieurs fluorochromes.

d. Biologie moléculaire

La biologie moléculaire réalisée au diagnostic permet d'étudier certaines altérations géniques rencontrées de manière récurrente dans les LAM. Elle représente une alternative pour la recherche de transcrits de fusion secondaires aux translocations récurrentes en cas de caryotype non informatif. Sa sensibilité élevée et les possibilités de standardisation en font un outil de choix dans l'évaluation diagnostique et pronostique des LA.

L'analyse moléculaire au diagnostic concerne les gènes dont l'impact pronostique a été démontré, afin d'adapter la stratégie thérapeutique, ou accessibles aux thérapies ciblées [80]. Certains marqueurs n'impactent pas le pronostic mais leur présence peut fournir une cible pour de nouvelles thérapies ciblées comme *IDH1* ou *IDH2* [81]. Les marqueurs potentiels de suivi de la MRD seront aussi étudiés et le cas échéant quantifiés.

Les recommandations concernant les analyses moléculaires varient selon l'âge :

- chez l'adulte, il est recommandé de rechercher les mutations de *NPM1*, *CEBPα*, *RUNX1*, *FLT3*, *TP53* et *ASXL1* [71],
- dans la population pédiatrique, l'analyse moléculaire doit évaluer le profil mutationnel de *NPM1*, *FLT3*, *WT1*, *c-KIT*, et *CEBPα* [82].

Il est recommandé d'extraire de l'ARN et de l'ADN et de conserver un culot cellulaire au diagnostic et aux différents points du suivi [71]. Ce biobanking a pour objectif d'aider à la recherche translationnelle ultérieure afin d'identifier de nouveaux biomarqueurs ou de valider de nouvelles méthodes de suivi de la MRD.

5) Classification des LAM

a. Classification FAB

Proposée en 1976, révisée en 1985 par le French American British Cooperative Group, la classification FAB catégorisait les LAM (définies alors par une blastose médullaire $\geq 30\%$) selon des critères morphologiques et cytochimiques (MPO, NASDA). Elle distingue 8 types de LAM définies selon leur différenciation et leur degré de maturation granuleuse (Tableau 1) [83]. Ce classement, établi dans un but diagnostique, apporte peu d'informations concernant le pronostic de chaque entité. Cette classification historique structure aujourd'hui une partie de la catégorie des LAM « sans autre spécification » de la classification OMS des LA.

Sous-type FAB	Dénomination commune (% de cas)	MPO	Estérases non spécifiques
M 0	LAM avec différenciation minimale (3%)	-	-
M 1	LAM sans maturation (15-20%)	+	-
M 2	LAM avec maturation (25-30%)	+	-
M 3	LA promyélocytaire (LAP) (5-10%)	+	-
M 4	LA myélo-monocytaire (20%)	+	+
M 4 éo	LA myélo-monocytaire avec excès d'éosinophiles anormaux (5-10%)	+	+
M 5	LA monoblastique (2-9%) M5a : sans différenciation M5b : avec différenciation	+/-	+
M 6	LA érythroblastique (3-5%)	-	-
M 7	LA mégacaryoblastique (3-12%)	-	-

Tableau 1 : Classification des LAM selon FAB [83]

b. Classification OMS

La classification actuelle des LAM est celle révisée par l'OMS en 2016 [75]. Son chapitre « Leucémies aiguës myéloïdes et néoplasies liées » a intégré au fil des éditions les avancées cytogénétiques et moléculaires successives aux informations morphologiques, cytochimiques, immunophénotypiques et cliniques. Le Tableau 2 en présente les entités.

La première catégorie répertorie les LAM avec anomalies génétiques récurrentes. Ces anomalies sont mutuellement exclusives (absence de patients ayant simultanément deux anomalies génétiques récurrentes).

LAM avec anomalies génétiques récurrentes (30%)
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFβ-MYH11</i>
LAP (LA promyélocytaire) avec <i>PML-RARα</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i>
LAM avec t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i>
LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2, MECOM</i>
LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3); <i>RBM15-MKLI</i>
Entité provisoire : LAM avec <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec mutation de <i>NPM1</i>
LAM avec mutation biallélique de <i>CEBPα</i>
Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>RUNX1</i>
LAM avec anomalies liées aux myélodysplasies (15%)
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie (15%)
LAM sans autre spécification (NOS) (40%)
LAM avec différenciation minime
LAM sans maturation
LAM avec maturation
LA myélo-monocytaire
LA monoblastique/monocytaire
Leucémie érythroïde pure
LA mégacaryoblastique
LAM à composante basophile
LAM avec myélofibrose
Sarcomes myéloïdes
Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down
Prolifération myéloïde transitoire
LAM associée au syndrome de Down

Tableau 2 : Classification OMS 2016 des LAM et autres néoplasies liées [75]

La catégorie « LAM avec anomalies relatives aux myélodysplasies » englobe les LAM secondaires à la transformation d'un SMD ou d'un SMD/SMP et les LAM porteuses d'anomalies cytogénétiques caractéristiques des myélodysplasies. La catégorie « Néoplasies myéloïdes induites par un traitement » (LAM-t) réunit l'ensemble des SMD, SMD/SMP et LAM survenant après un traitement par agents alkylants, inhibiteurs de topoïsomérase II, radiothérapie ou immunosuppresseurs. Pour ces deux catégories l'étude cytogénétique et l'anamnèse permettent le classement.

La catégorie « LAM sans autre spécification » (LAM-NOS) regroupe les LAM ne possédant aucun critère pouvant les faire appartenir aux autres entités. La stratification de ce groupe repose sur des critères similaires à ceux employés dans la classification FAB auxquels s'ajoutent les LAM à composante basophiles et les LAM avec myélofibrose.

On retrouve dans la catégorie « Sarcomes myéloïdes » uniquement les tumeurs myéloïdes sans localisation médullaire (*de novo*).

6) Facteurs pronostiques

Le pronostic des patients atteints de LAM est très hétérogène, il dépend surtout du profil cytogénétique et moléculaire de la LAM [9], [84], mais également du patient et de la réponse au traitement. Des études récentes ont exploré la contribution relative des variables génétiques et cliniques sur la survie sans événements (EFS) et la survie globale (OS) [10], [84], [85]. Les lésions génomiques expliquent 2/3 des variations, le dernier tiers s'explique par les variables démographiques, cliniques et thérapeutiques.

a. Liés au patient

L'âge du patient dans la population adulte constitue un facteur indépendant de mauvais pronostic dans les LAM [86]. Plus l'âge au diagnostic est élevé, plus le pronostic de la LAM est sombre. Les altérations génétiques spécifiques liées à l'âge, les antécédents de pathologie myéloïde ou une exposition antérieure à la chimiothérapie augmentent la résistance à la chimiothérapie. De plus la fréquence des anomalies cytogénétiques de pronostic défavorable est aussi plus importante chez les patients âgés (caryotypes complexes, anomalies des chromosomes 5, 7 et 17 notamment). Cependant le facteur « âge » est modulé par l'état général du patient et les comorbidités au diagnostic de LAM qui impactent directement la tolérance et la réponse au traitement [71].

b. Liés aux altérations cytogénétiques

La cytogénétique est le facteur pronostique de la survie le plus puissant. Son intérêt est prouvé dans l'adaptation des stratégies thérapeutiques au risque, notamment concernant l'indication de l'allogreffe en première rémission complète (RC1). Actuellement l'analyse cytogénétique au diagnostic des LAM permet la stratification en 3 groupes selon l'impact pronostique : favorable, intermédiaire et défavorable (Tableau 3) [87].

Pronostic	Altérations génétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1) ; <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22) ; <i>CBFβ-MYH11</i> <i>NPM1</i> m sans <i>FLT3-ITD</i> ou avec un ratio <i>FLT3-ITD</i> faible (<0,5) Mutations bi-alléliques de <i>CEBPα</i>
Intermédiaire	<i>NPM1</i> m avec un ratio <i>FLT3-ITD</i> élevé (>0,5) <i>NPM1</i> sauvage sans <i>FLT3-ITD</i> ou avec un ratio <i>FLT3-ITD</i> faible (sans altération génétique de mauvais pronostic) t(9;11)(p21.3;q23.3) ; <i>MLLT3-KMT2A</i> Anomalies cytogénétiques non classées favorables ou défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1) ; <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3) ; réarrangement de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2) ; <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) ; <i>GATA2-MECOM</i> -5 ou del(5q) ; -7 ; -17 ou anomalie 17p Caryotype complexe (≥ 3 anomalies) ou présence d'une monosomie sur le caryotype <i>NPM1</i> sauvage avec un ratio <i>FLT3-ITD</i> élevé Mutation de <i>RUNX1</i> , <i>ASXL1</i> ou <i>TP53</i>

Tableau 3 : Stratification du risque selon les anomalies génétiques, ELN 2017 [71]

Ainsi les LAM associées au Core Binding Factor (LAM-CBF) avec t(8;21), inv(16) ou t(16;16) et les leucémies aigües promyélocytaïres (LAP) avec t(15;17) constituent des facteurs de bon pronostic. Ces anomalies génétiques sont les seules à suffire pour porter le diagnostic de LAM indépendamment du pourcentage de blastes médullaires.

c. Liés à la biologie moléculaire

La révision 2017 de la classification ELN a permis de stratifier les LAM de l'adulte en différents sous-groupes en intégrant les altérations observées en cytogénétique et en biologie moléculaire (Tableau 3) [71]. Les mutations de *NPM1* confèrent un pronostic favorable, modulé selon le statut *FLT3-ITD* associé.

d. Liés à la réponse au traitement

La réponse au traitement est évaluée à différents temps et constitue un facteur pronostique indépendant majeur [88]. L'obtention d'une rémission complète (RC) à l'issue de la chimiothérapie d'induction constitue un facteur pronostique essentiel pour la survie sans maladie et la survie globale. La RC est ainsi définie par l'ELN [71] :

- Blastose médullaire < 5%, absence de blastes circulants et absence de corps d'Auer,
- Pas de localisation extramédullaire de la maladie,
- Polynucléaires neutrophiles circulants > 1 G/L,
- Plaquettes circulantes > 100 G/L,

La maladie résiduelle (MRD) peut être évaluée par toute technique capable de mesurer la persistance de la leucémie avec une sensibilité supérieure à celle de la cytologie. L'évaluation de la MRD permet de suivre l'évolution de la masse tumorale, d'apprécier la sensibilité des cellules tumorales aux différents traitements et d'évaluer la qualité de la RC. Elle permet aussi de prédire la rechute hématologique avant qu'elle ne se manifeste cliniquement et de déclencher une intensification thérapeutique.

Pour évaluer la réponse au traitement le suivi de la MRD est réalisé par immunophénotypage en cytométrie en flux (CMF) ou en biologie moléculaire essentiellement par RT-qPCR selon les anomalies présentes au diagnostic. Il est possible de suivre la MRD des LAM par CMF grâce à l'identification d'immunophénotypes aberrants associés à la leucémie (LAIP). La rémission évaluée en CMF (informative pour 90% des patients atteints de LAM) est un facteur pronostique plus fiable que la cytologie [71] cependant la sensibilité de l'immunophénotypage est inférieure à celle de la biologie moléculaire (Figure 10).

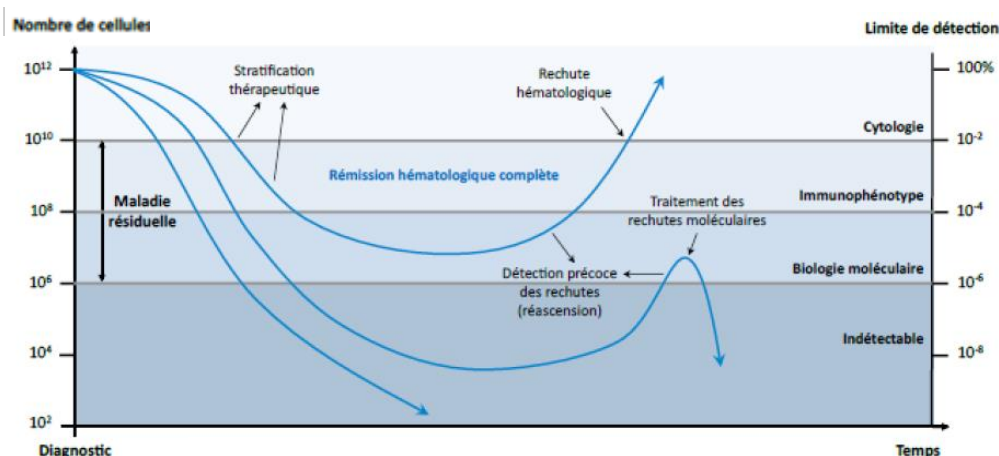


Figure 10 : La maladie résiduelle dans les LA

De même que les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires, la MRD participe à la stratification thérapeutique des patients.

7) Traitement des LAM

Le traitement doit être instauré sous contrôle des désordres métaboliques et de l'état infectieux du patient. Dans le cas des LAM à présentation hyperleucocytaire il pourra être précédé d'une administration de cytostatiques tels que l'hydroxyurée. Le traitement de la LAP repose sur l'administration d'un agent différenciant, l'acide tout-*trans*-rétinoïque et d'un dérivé de l'arsenic. La prise en charge des LAM (hors LAP) repose sur la chimiothérapie intensive et l'allogreffe de moelle osseuse, au moins chez les patients les plus jeunes, capables de tolérer les traitements agressifs [89]. L'orientation thérapeutique dans les LAM dépend de l'âge et de l'état clinique du patient et des caractéristiques pronostiques, notamment cytogénétiques et moléculaires, de la LAM.

Le traitement des LAM repose sur une ou deux cures de chimiothérapie d'induction intensive comprenant 3 jours d'anthracyclines (daunorubicine, idarubicine, mitoxantrone, seuls ou en association) et 7 jours d'administration continue de cytarabine, régime connu sous le nom de « 3+7 ». Chez l'adulte, ce régime d'induction n'est proposé que chez les individus « fit », c'est-à-dire avec un *performans status* correct et sans comorbidité majeure. Le traitement d'induction permet l'obtention d'une RC chez plus de 85% des enfants [82], 60 à 80% des adultes âgés de moins de 60 ans et 40 à 60% des adultes de plus de 60 ans [81].

Un second cycle d'induction (rattrapage) est administré en cas de LAM réfractaire ou récidivante avec l'adjonction de nouveaux médicaments, tels que le Gemtuzumab ozogamicine (GO) au traitement standard. Le GO bénéficie aux patients de risques favorable et intermédiaire y compris avec FLT3-ITD mais pas à ceux qui présentent un caryotype défavorable [90]. A ce jour, l'efficacité des nouvelles thérapies est surtout évaluée dans la population adulte : les inhibiteurs de FLT3 ont reçu l'approbation de la FDA (*Food and Drug Administration*) en traitement de première ligne des LAM des adultes présentant une mutation du gène *FLT3* dans le domaine tyrosine kinase (FLT3-TKD) ou une mutation de type duplication en tandem (FLT3-ITD) [91].

Le traitement de consolidation comporte 2 à 5 cures de cytarabine haute-dose aussi bien chez l'enfant que l'adulte « fit » [79], [81], [82]. L'allogreffe de CSH est indiquée chez les patients jeunes de haut-risque en RC1 ou chez les patients de risque favorable (LAM-CBF et LAM-CN avec mutation biallélique de *CEBPα* ou mutation de *NPM1* sans FLT3-ITD) en 2^{ème} RC. L'allogreffe de CSH est encore discutée pour les autres groupes pronostiques. La prophylaxie du système nerveux est systématique en pédiatrie et repose sur des injections intra-thécales de cytarabine, de méthotrexate, seuls ou en association avec des corticostéroïdes.

Les options thérapeutiques chez les patients âgés sont les soins de support seuls ou la chimiothérapie d'induction intensive et des faibles doses de cytarabine. L'azacitidine ou la décitabine, agents hypométhylants, peuvent être utilisés dans le traitement du patient âgé dont le caryotype est défavorable et/ou présentant des anomalies liées aux SMD [92], [93].

8) Suivi de la MRD dans les LAM

Chez les patients atteints de LAM les décisions thérapeutiques sont le plus souvent basées sur l'évaluation du risque pré-thérapeutique selon la classification cytogénétique et moléculaire de l'ELN [71]. Néanmoins, l'évaluation de la maladie résiduelle, c'est-à-dire le contingent de cellules pathologiques encore présentes chez le patient à un stade donné de son traitement, est un outil important pour estimer la réponse précoce au traitement et pour le suivi à long-terme permettant ainsi de détecter la rechute précoce. Le statut de la MRD est un meilleur indicateur du risque de rechute que la présence de mutations impliquant *c-KIT* et *FLT3-ITD* dans les LAM-CBF [94] ou *FLT3-ITD*, *DNMT3A* et *WT1* dans les LAM-*NPM1m* [95]. Ces données impliquent d'inclure le suivi de la MRD moléculaire dans la pratique quotidienne pour aider à la prise en charge thérapeutique en RC1.

a. Marqueurs de suivi dans les LAM

Certains types de LAM sont définis par la présence d'une translocation chromosomique récurrente qui génère l'expression d'un transcrite de fusion pouvant être utilisé comme marqueur spécifique des cellules leucémiques. Les transcrits de fusion spécifiques tels que *PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1* ou *CBFB-MYH11* sont des marqueurs robustes pour l'évaluation de la MRD par RT-qPCR [94], [96]. Le suivi par cette méthode est particulièrement sensible (autour de 10^{-5}), bien qu'il dépende du niveau d'expression du transcrite [97]. Cependant, ces marqueurs sont présents dans seulement 25% des cas [71].

La MRD peut également être suivie en mesurant l'hyperexpression d'un gène (*WT1*) par les cellules leucémiques. Dans ce cas l'expression normale par les cellules saines doit être prise en compte. Ainsi même pour un marqueur surexprimé dans quasiment toutes les LAM, la nécessité d'un niveau de surexpression suffisant pour obtenir une sensibilité analytique informative restreint le nombre de patients pouvant bénéficier d'un suivi. La valeur pronostique de la MRD *WT1* sur le risque de rechute et la survie a été démontrée et cela quel que soit le stade du traitement. 70 à 80% des patients pourront ainsi être suivis avec une sensibilité de 10^{-2} à 10^{-3} dans le sang [98], [99].

Chez environ 60% des jeunes adultes les cellules leucémiques expriment un marqueur moléculaire pouvant être suivi par RT-qPCR. Ces marqueurs moléculaires sont des gènes mutés sous forme de hotspot (*NPM1*, *IDH1/2*) [100]. Une mutation hotspot est une mutation se produisant toujours sur le même nucléotide d'une séquence donnée, il n'est ainsi pas nécessaire de designer des amorces spécifiques d'allèle pour chaque patient. La sensibilité de cette analyse dépend du niveau d'expression relative de la cible dans les blastes leucémiques par rapport à un gène de référence (*ABL1*) et varie selon la cible, et selon les patients [101]. Le Tableau 4 résume les principaux marqueurs de MRD actuellement utilisés dans les LAM.

Molecular Markers	Frequency (% of All)	Occurrence in Leukemogenesis	Predictive Power for Clinical Relapse	Technique
<i>Fusion products</i>				
RUNX1/RUNX1T1	7-10%	Early	Very good	RT-qPCR
CBFB/MYH11	5-8%	Early	Very good	RT-qPCR
MLL/MLLT3	2%	Probably late	Good	RT-qPCR
<i>Mutations</i>				
FLT3-ITD	25-30%	Late	Poor	RT-qPCR/NGS
NPM1	30% (50% in normal-karyotype)	Late	Very good	RT-qPCR/NGS
DNMT3A	10-15%	Early	Poor	NGS
RUNX1	10%	Early	Possibly good	NGS
IDH1/IDH2	8-9% each	Early	Possibly good	NGS
<i>Overexpression</i>				
WT1	85-90%	Unknown	Good	RT-qPCR

Tableau 4 : Marqueurs moléculaires potentiels pour la MRD dans les LAM (LAP exclue) [46]

b. Intérêt de la détection des mutations de *NPM1*

Les mutations du gène *NPM1* sont retrouvées chez environ 1/3 des patients atteints de LAM et dans 60% des LAM-CN [1]. Plus de 50 mutations différentes localisées sur l'exon 11 du gène *NPM1* ont été identifiées, mais trois types de mutations (A, B et D) prédominent chez 95% des patients [2], [38]. Leur homogénéité structurale fait des mutations de *NPM1* une cible de choix pour le monitoring de la MRD. En l'absence de *FLT3-ITD* le pronostic des patients avec *NPM1m* est considéré comme favorable [41], [102]. *A contrario*, les patients ayant une LAM-*NPM1m* et une mutation *FLT3-ITD* évoluent de manière plus défavorable et sont largement considérés comme des candidats à la greffe allogénique de cellules souches en RC1 [79]. Plusieurs groupes ont rapporté l'impact pronostic de *NPM1m* en MRD évaluée à différents temps, dont en post-allogreffe [95], [103]–[105]. En effet, la présence de *NPM1m* dans presque tous les échantillons à la rechute contribue à faire de cette mutation un marqueur de choix pour le suivi de la MRD [95]. Basé sur les caractéristiques biologiques et cliniques vues précédemment, les *NPM1m* peuvent être considérées comme une cible spécifique de la leucémie idéale pour la détection de la MRD [106]. De plus, les *NPM1m* sont généralement exprimées dans toute la population leucémique [107] et ont également montré une grande stabilité durant l'évolution de la maladie [89], [108]–[110].

Le document consensuel du groupe de travail sur la MRD de l'ELN stipule que les patients LAM-*NPM1m*, tout comme les patients avec les transcrits de fusion *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* ou *PML-RAR α* , devraient avoir une évaluation moléculaire de leur MRD à certains temps cliniquement informatifs. Durant la phase de traitement actif, l'évaluation de la MRD pour ces lésions moléculaires est recommandée au minimum :

- Au diagnostic,
- Après 2 cycles de chimiothérapie d'induction/consolidation, pour évaluer la rémission et déterminer la cinétique de la réponse
- Et à la fin du traitement, pour détecter une rechute [88].

Chez les patients avec un diagnostic antérieur de LAM, la détection d'un faible taux de transcrit *NPM1* muté est associée à la rechute et à une issue défavorable [95]. Après la fin du traitement, les échantillons pour les analyses de MRD devraient en général être collectés tous les 3 mois pendant 2 ans. Par la suite, le suivi au-delà de 2 ans doit être basé sur le risque de rechute du patient et décidé individuellement [88]. En ce qui concerne les LAM-*NPM1m*,

avec ou sans mutations additionnelles, le suivi des transcrits *NPM1m* est recommandé dans la moelle osseuse (BM) et le sang périphérique (PB), si possible. Si la MRD *NPM1m* reste négative dans le PB mais positive dans la BM après la fin du traitement, les transcrits doivent être suivis de manière plus rapprochée toutes les 4 semaines pendant au moins 3 mois, dans le but de détecter toute augmentation de la MRD [88].

NPM1 muté est un marqueur stable retrouvé à la rechute et constitue donc un marqueur robuste de MRD quantifiable par RT-qPCR. Les mutants de type A, B et D sont quantifiés dans l'essai BIG-1 sur ADN complémentaire (ADNc) au moment de la rémission et après la première consolidation. Le génotype *FLT3*-ITD négatif/*NPM1* muté confère un pronostic favorable et depuis les travaux de Schlenk *et al.*, ne constitue plus une indication de greffe allogénique en RC1. Toutefois le taux de rechute avoisine 40% et des données récentes suggèrent que l'évaluation de la MRD pourrait contribuer à identifier les patients à haut risque de rechute [95]. Les patients *FLT3*-ITD négatif/*NPM1* muté de l'essai BIG-1 qui n'auront pas obtenu une rémission moléculaire suffisante après la première cure de consolidation (taux de transcrite médullaire *NPM1* $\geq 1\%$) basculeront du groupe de risque favorable au groupe intermédiaire et se verront proposer une allogreffe de CSH en RC1.

III. Détection et quantification des mutations de *NPM1* au laboratoire

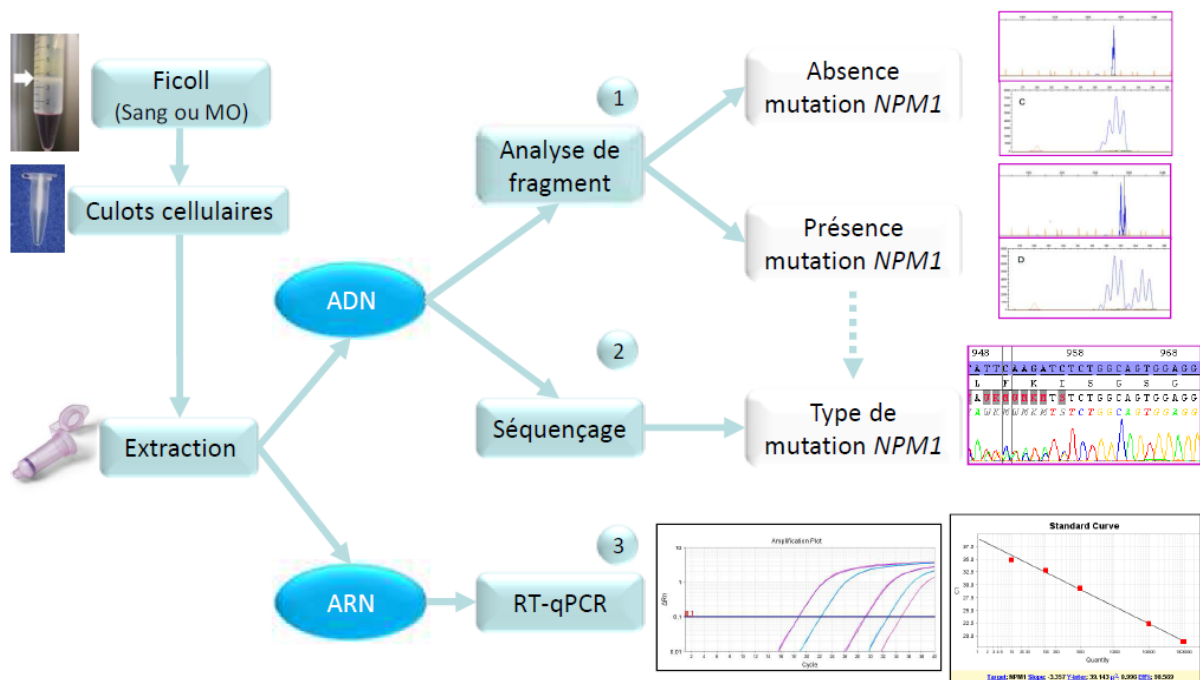


Figure 11 : Etude des mutations de *NPM1* au laboratoire

1) Recherche des mutations du gène *NPM1*

La détection des mutations du gène *NPM1* est une analyse qualitative réalisée par analyse de fragments sur un séquenceur capillaire. Les séquenceurs capillaires permettent la séparation électrophorétique de fragments d'ADN marqués par un fluorophore et obtenus après PCR.

Le séquenceur capillaire permet de séquencer l'ADN d'une région d'intérêt mais également de séparer des fragments d'ADN amplifiés par PCR à l'aide d'une amorce fluorescente. Les produits ainsi obtenus sont marqués. Avant la séparation électrophorétique au sein du capillaire contenant un gel de polyacrylamide, on ajoute un marqueur de taille moléculaire marqué par un autre fluorochrome. Après sortie du capillaire, les fragments marqués sont détectés par un faisceau laser. Selon le temps de rétention et en comparaison au marqueur de taille moléculaire, on peut mesurer la taille des fragments.

2) Identification de la mutation du gène *NPM1*

a. Principe du séquençage par la méthode de Sanger

Le recopiage d'un brin matrice par une ADN polymérase ADN-dépendante (Taq) est initiée par la fixation d'un oligonucléotide spécifique (amorce) complémentaire du brin matrice. Cette ADN polymérase va permettre l'élongation d'un nouveau brin complémentaire du brin matrice dans le sens $5' \rightarrow 3'$: elle permet l'incorporation de nucléotides (dNTP ou déoxynucléotides) libres présents dans le milieu réactionnel par la formation d'un pont phosphodiester entre le 3'OH de la chaîne et le 5'phosphate du dNTP suivant.

La réaction de Sanger repose sur l'incorporation aléatoire par l'ADN polymérase de didéoxynucléotides (ddNTP) interrupteurs de chaîne aussi présents dans le milieu réactionnel. Ces ddNTP diffèrent des dNTP par leur extrémité 3'. L'extrémité 3'OH des dNTP est remplacée par une extrémité 3'H. Cette modification empêche la formation de la liaison phosphodiester entre le ddNTP incorporé dans la chaîne et le nucléotide suivant. L'allongement de la chaîne est alors interrompu. Dans le milieu réactionnel il y a compétition entre les dNTP et les ddNTP. Le rapport spécifique ddNTP/dNTP et l'affinité de la Taq pour chaque nucléotide sont optimisés de telle façon qu'un ddNTP soit statistiquement incorporé à toutes les positions possibles.

Une migration électrophorétique du produit de cette réaction de séquence sur un gel de polyacrylamide va séparer tous les fragments présents en fonction de leur masse moléculaire taille. La grande résolution de ce gel permet de distinguer des fragments différents entre eux d'une paire de base. L'identification du ddNTP présent à l'extrémité 3' de chaque fragment déterminera la séquence nucléotidique du brin matrice initial.

b. Adaptation de la technique à la fluorescence

L'élongation de chaque produit monobrin se termine par l'incorporation d'un ddNTP marqué par un fluorochrome dont le spectre d'émission est spécifique. Une électrophorèse capillaire en conditions dénaturantes va séparer les produits de la réaction de séquence purifiés par chromatographie d'exclusion. L'enregistrement et l'analyse spectrale de la fluorescence spécifique du ddNTP permettra alors d'assigner la base correspondante et de déterminer la séquence nucléotidique du brin d'ADN initial.

3) Quantification de la mutation du gène *NPM1*

La quantification des transcrits *NPM1*-mutés est réalisée par RT-qPCR TaqMan mutation spécifique sur ADNc pour les formes A, B et D avec un seuil de sensibilité de 0,01%.

a. Principe

La PCR quantitative (qPCR) est une variante de la PCR pour laquelle l'amplification de la cible peut être suivie en temps réel contrairement à la PCR en point final. Cette technique exploite la caractéristique suivante : plus la concentration d'une cible est importante au départ de la réaction de PCR, moins le nombre de cycles nécessaires pour obtenir une amplification est grand. La qPCR peut être utilisée pour la quantification d'une cible d'ADN ou d'une cible d'ARN préalablement rétro-transcrite en ADNc. On parle alors de RT-qPCR.

b. Mise en évidence de l'amplification

L'amplification est mise en évidence par l'intermédiaire de sondes (TaqMan) spécifiques de la cible, marquées par des fluorochromes utilisant le principe FRET (*Fluorescence Resonance Energy Transfer*). La sonde est marquée par un fluorochrome émetteur (Reporter) à son extrémité 5' et par un fluorochrome suppresseur (Quencher) en 3'. Le spectre d'émission du Reporter est confondu avec le spectre d'absorption du Quencher. Lorsque les deux fluorochromes sont situés à proximité, la lumière émise par le Reporter est immédiatement absorbée par le Quencher (Figure 12A). En revanche, lorsque les deux fluorochromes sont spatialement éloignés la lumière émise par le Reporter n'est pas absorbée et peut être mesurée par l'appareil (Figure 12B).

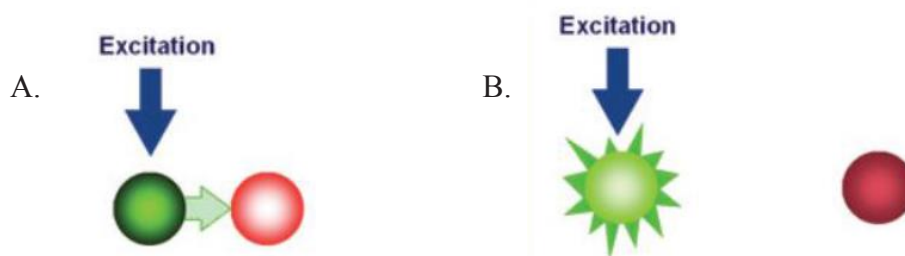


Figure 12 : Phénomène FRET

Lors de la phase d'élongation, la Taq polymérase synthétise le brin d'ADNc à partir de l'ADN simple brin dans le sens 5' → 3' (Figure 13A). Cette Taq possède en plus la capacité d'hydrolyser l'ADN double brin en 5'. Lorsque la Taq arrive au niveau de la sonde spécifique de la cible, la sonde va être déplacée puis hydrolysée (Figures 13B et 13C). Le Reporter se trouve alors libéré dans le milieu réactionnel et sa lumière d'émission n'est plus absorbée par le Quencher (Figure 13C). L'appareil peut alors mesurer l'augmentation de la fluorescence.

Chaque réplification d'un ADN simple brin en ADN double brin va donc libérer un Reporter et faire augmenter la fluorescence du milieu réactionnel. L'intensité de la fluorescence est proportionnelle au nombre de copies amplifiées, ce signal est mesuré lors de l'élongation.

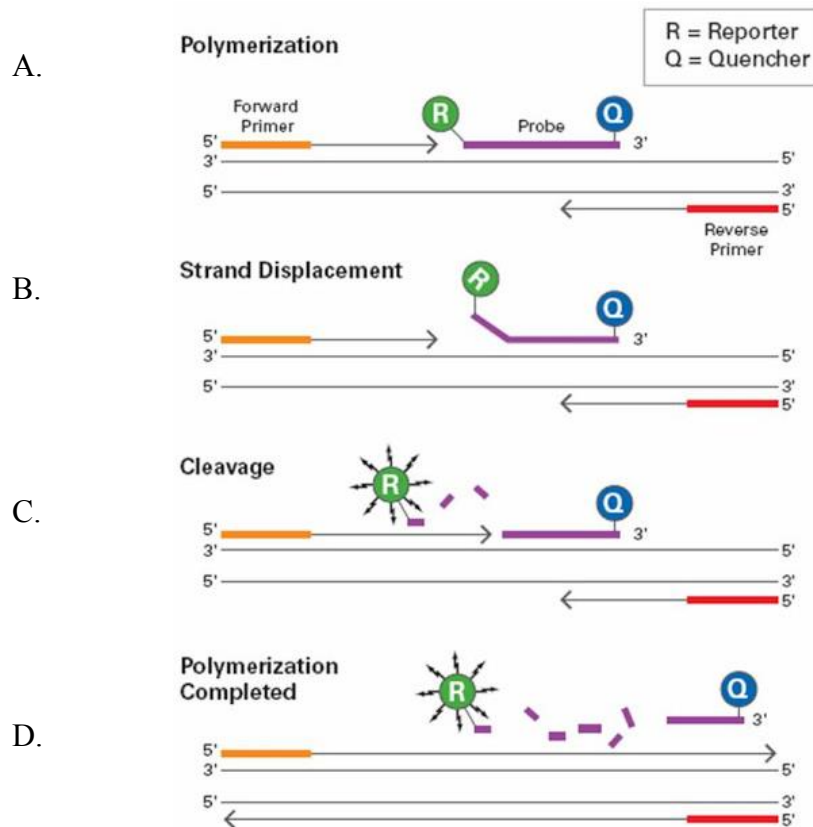


Figure 13 : Principe des sondes à hydrolyse fluorescentes TaqMan

c. Profils d'amplification

Au cours d'une PCR en temps réel l'amplification peut être suivie à chaque cycle et suit un profil composé de 3 phases (Figure 14) :

- Une phase de latence au cours de laquelle la fluorescence est inférieure à la limite de détection de l'appareil,
- Une phase exponentielle de croissance. Pendant ces deux premières phases, chaque cycle de PCR produit un doublement du nombre de copies de la cible.
- Une phase de plateau durant laquelle les réactifs s'épuisent progressivement et deviennent limitants. L'efficacité de la PCR baisse progressivement et l'intensité de la fluorescence en fonction du nombre de cycles forme un plateau.

La PCR quantitative en temps réel exploite une propriété inhérente à la PCR : plus il y a de molécules cibles à l'origine, plus le nombre de cycles d'amplification nécessaire pour atteindre un nombre déterminé de molécules amplifiées sera réduit. Le nombre de cycles nécessaires pour que la fluorescence atteigne une valeur seuil est inversement corrélé au nombre de molécules cibles présentes à l'origine.

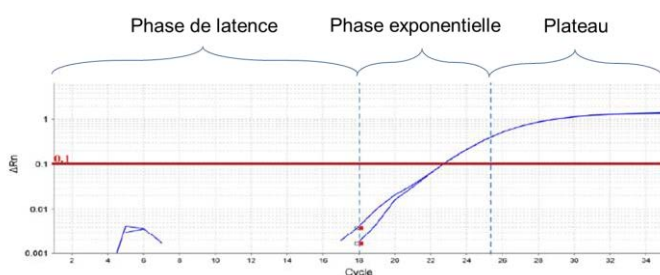


Figure 14 : Les phases d'amplification d'une qPCR

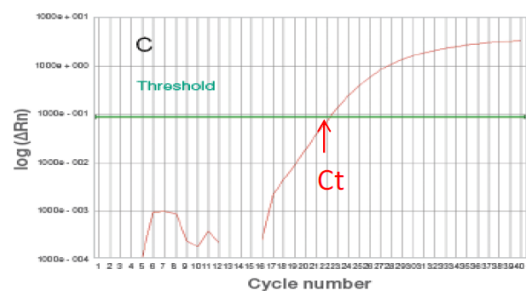


Figure 15 : Définition du Ct

La **ligne de base** correspond au niveau du signal lors des cycles de PCR précédant l'augmentation significative de la fluorescence.

La **valeur seuil** est la valeur de fluorescence au-dessus de laquelle l'amplification est jugée significative. Elle est choisie de façon à être significativement supérieure au bruit de fond et comprise dans la phase exponentielle d'amplification.

Le **cycle threshold (Ct)** est le nombre de cycles théoriques nécessaires pour atteindre le seuil de détection. Si la valeur seuil est bien choisie au niveau de la phase exponentielle, il existe une relation logarithmique entre la quantité de molécules cibles présentes à l'origine dans l'échantillon et le nombre de cycles (Figure 15).

d. Quantification après normalisation par un gène contrôle

Dans le cas d'une cible ARN, la quantification par qPCR nécessite une étape préalable de rétro-transcription. La quantification absolue d'une cible obtenue par RT-qPCR dépend :

- De la quantité de cellules utilisées pour l'extraction,
- Du niveau d'expression de la cible,
- Du rendement d'extraction,
- De la qualité de l'ARN obtenu (dégradation, pollution par des solvants ou des sels inhibiteurs lors de l'extraction)
- Du rendement de la rétro-transcription.

Ces paramètres étant difficilement maîtrisables et quantifiables, les résultats sont normalisés par rapport à la quantification d'un gène contrôle caractérisé par une expression élevée, ubiquitaire et stable quel que soit le statut de la maladie.

Cette quantification du gène contrôle permet ainsi de quantifier le matériel amplifiable et de s'affranchir des variations inhérentes aux différentes étapes pré-PCR. Le résultat est donc exprimé sous forme de ratio selon la formule suivante :

$$\text{Ratio}(\%) = \frac{N_{\text{cible}}}{N_{\text{référence}}} * 100$$

N : Nombre de cible en cours d'amplification nécessaires pour atteindre le *threshold*.

Les taux de transcrits *NPM1*-mutés sont donc rendus selon la valeur normalisée du nombre de copies *NPM1*-muté / nombre de copies *ABL* multiplié par 100 pour avoir un pourcentage.

OBJECTIFS

Au Centre de Biologie Pathologie (CBP) de Lille, il existe deux techniques actuellement utilisées en routine pour étudier les mutations de *NPM1*. Une technique qualitative par analyse de fragments permettant de détecter les mutations de *NPM1* avec une limite de détection non optimale et une technique quantitative, la qPCR coûteuse et à débit faible.

La PCR digitale ou ddPCR est une alternative intéressante pour la détection et la quantification de mutations hotspot. Parmi les différents fournisseurs, le CBP a sélectionné suite à une étude préalable l'automate Bio-Rad QX200™ ddPCR.

L'objectif de cette étude est dans un premier temps d'évaluer l'aptitude de la ddPCR à détecter et quantifier les mutations rares de *NPM1* puis de comparer cette technique à la qPCR afin de valider cette technique pour une utilisation prospective.

MATERIELS ET METHODES

I. Préparation des acides nucléiques

1) Isolements cellulaires

Les leucocytes de la moelle osseuse ou du sang recueillis sur tube EDTA sont isolés en culots cellulaires. La première étape consiste à lyser des hématies avec une solution de chlorure d'ammonium afin de ne conserver que les leucocytes. Le prélèvement est mélangé à un tampon de lyse dans un volume total de 45 mL. Après 15 minutes d'incubation, la suspension est centrifugée pendant 10 minutes à 4°C à 3000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire obtenu est remis en suspension dans 45 mL d'une solution de lavage afin d'éliminer les excédents de tampon de lyse. Le tube subit une nouvelle centrifugation, identique à la précédente. Le surnageant est de nouveau éliminé et le culot cellulaire est repris dans 10 mL de solution de lavage.

A ce stade les leucocytes sont numérés grâce à un compteur cellulaire (automate Horiba™). Après une troisième centrifugation selon le même procédé, le surnageant est éliminé et le culot cellulaire est remis en suspension en solution de lavage, reparti en aliquots de 5 ou 10 millions de cellules. Ces aliquots sont centrifugés pendant 4 minutes à 4°C à 12 000 tours/minute. Le surnageant est éliminé et les culots sont repris dans 1 mL de TRIzol® ou dans 200 µL de solution de travail en vue d'une extraction par l'automate Maxwell™. Les culots cellulaires sont alors conservés à -80°C jusqu'à l'extraction. Pour étudier les mutations de *NPM1* la matrice moléculaire utilisée est de l'ADN complémentaire (ADNc).

2) Extraction de l'ARN

a. Extraction manuelle par le TRIzol®

Le réactif TRIzol®, solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, permet d'extraire les ARN totaux des cellules tout en maintenant leur intégrité pendant les phases d'homogénéisation et de lyse des cellules.

Les culots cellulaires à extraire sont à décongeler lentement afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. L'addition de 200 µL de chloroforme et la centrifugation (15 min à 4°C à 12 000 G) permettent de séparer l'ARN de l'ADN et des protéines et ainsi d'extraire l'ARN à partir d'une petite quantité de cellules tout en limitant la contamination. Après centrifugation les différentes phases sont séparées comme suit :

- Une phase aqueuse supérieure contenant l'ARN
- Une interphase protéique
- Une phase organique rouge phénol/chloroforme inférieure contenant l'ADN.

La phase aqueuse de chaque tube est déposée dans 500 µL d'isopropanol froid pour précipiter l'ARN. Une fois précipités les ARN sont stables, ils doivent rester dans l'isopropanol 1h à -20°C puis être centrifugés (30 min à 4°C à 12 000 G). Le surnageant est éliminé et le précipité lavé avec 1 mL d'éthanol à 75% froid. Les tubes sont centrifugés immédiatement (5 min à 20°C à 7 500 G) puis décantés et séchés 30 min à l'air libre. Le culot est repris dans 20 µL d'eau DNase free afin de redissoudre l'ARN. Les ARN sont stockés à 4°C si le dosage est effectué le même jour, sinon à -80°C.

b. Extraction automatisée par le Maxwell®

Le Maxwell® 16 Instrument est un appareil semi-automatique permettant d'extraire des acides nucléiques à l'aide de billes magnétiques par séries de 8 échantillons en un temps réduit. L'ARN est extrait à partir du kit Maxwell® 16 LEV simply RNA Cells (Promega). La procédure repose sur une lyse minimale des cellules suivie d'une purification de l'ARN dans différentes solutions. L'ARN élué dans un faible volume d'eau DNase/RNase free est de haute qualité permettant des applications telles que la PCR quantitative en temps réel.

3) Dosage et normalisation des ARN

Le dosage permet de standardiser les concentrations d'ARN. La technique utilisée est basée sur la spectrophotométrie (DropSense™). Les échantillons dont la concentration en ARN est supérieure à 100 ng/μL sont dilués de façon à normaliser la concentration en ARN à 100 ng/μL afin d'obtenir une prise d'essai reproductible.

4) Rétro-transcription

La rétro-transcription est la synthèse d'ADNc à partir d'une matrice ARN. Cette synthèse d'ADNc est catalysée par une reverse transcriptase (RT). Cette enzyme est une ADN polymérase ARN dépendante capable d'utiliser un brin d'ARN comme matrice pour catalyser la synthèse du brin d'ADNc.

Cette RT utilise une matrice ARN et une courte amorce complémentaire de l'extrémité 3' de l'ARN pour synthétiser l'ADNc, qui servira de matrice à la PCR. Un mélange d'hexanucléotides de séquences aléatoires est utilisé comme source d'amorces. Cette combinaison rétro-transcription et PCR (RT-PCR) permet de détecter de faibles quantités d'ARN dans un échantillon et la production de l'ADNc correspondant facilite l'amplification de gènes ayant un petit nombre de copies.

II. La PCR digitale (digital droplet PCR, ddPCR)

1) Principe

La PCR digitale a été développée pour permettre une quantification absolue et hautement précise de séquences d'acides nucléiques cibles. L'échantillon mélangé aux réactifs d'amplification est fractionné en milliers de partitions qui sont autant de microréacteurs. La technique de partitionnement varie selon les fabricants : sur support solide (micropuits) chez ThermoFisher (QS3D) ou bien liquide (gouttelettes) chez Biorad (QX200) ou Stila (Naica). Les cibles sont distribuées aléatoirement dans ces compartiments. La réaction de PCR a lieu dans les partitions où la cible est présente produisant un signal détectable. Chaque fraction est comptée individuellement et classée dans une catégorie positive ou négative quant à la présence initiale en son sein de la cible (quelle qu'en soit la quantité). L'appellation « digitale » de la technique vient de ce classement binaire : absence de la cible ou présence d'au moins une cible avant amplification dans le compartiment. Enfin, à partir du nombre mesuré de fractions positives et après correction statistique on obtient une estimation du nombre de copies de la cible initialement présentes dans l'échantillon. Cette relation statistique est décrite par la loi de Poisson qui estime combien de compartiments contenaient avant amplification une cible, deux, trois et ainsi de suite.

Dans le système développé par Bio-Rad, le fractionnement du milieu réactionnel est effectué en émulsion, les compartiments sont des gouttelettes d'eau dans le milieu huileux. Le mélange réactionnel de PCR contient des sondes d'hydrolyse TaqMan marquées par un fluorophore FAM, VIC ou HEX comme dans notre cas ou bien un agent intercalant de type EvaGreen. La spécificité du mélange dédié à la PCR digitale est qu'il contient des agents tensio-actifs qui vont favoriser la génération de l'émulsion. Dans notre étude, la quantification des transcrits *NPM1*-muté par rapport au gène de référence *ABL* est réalisée en multiplex.

2) Génération des gouttelettes

Les échantillons ainsi que l'huile sont chargés sur une cartouche microfluidique composée de microcanaux positionnés de façon perpendiculaire au sein desquels la rencontre des deux liquides aura lieu. Le mélange est assuré par un appareil appelé Automated Droplet Generator qui agite la cartouche.

Les règles de la mécanique des fluides deviennent plus simples et prévisibles dans les systèmes de petite taille. Des avancées techniques ont permis la fabrication de canaux réguliers de très faible diamètre permettant de tels écoulements. Dans notre cas l'écoulement forcé par le générateur va produire pour chaque échantillon environ 20 000 gouttelettes de l'ordre du nanolitre (Figure 16). Cette uniformité va permettre une distribution aléatoire des copies d'ADNc dans les gouttelettes (Figure 17).

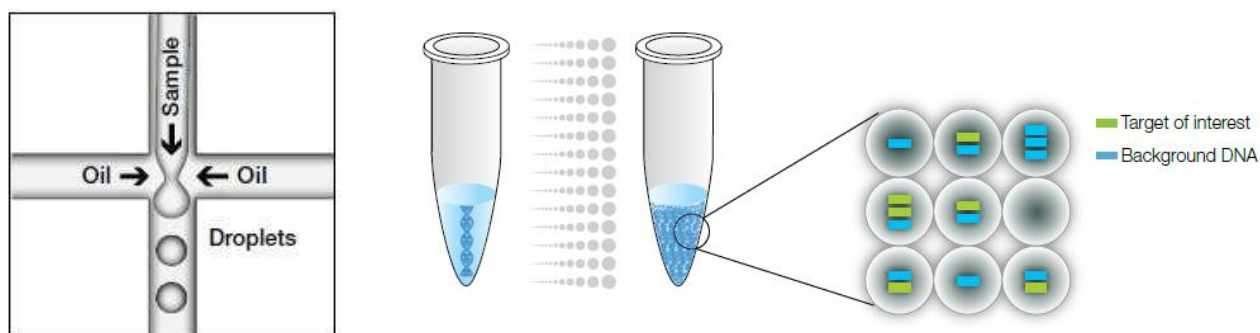


Figure 16 : Génération de gouttelettes de tailles et volumes uniformes (Bio-Rad)

Figure 17 : Répartition aléatoire des copies d'ADNc dans les gouttelettes (Bio-Rad)

Les émulsions sont transférées par l'automate sur une plaque 96 puits (thermoscellée).

3) Amplification clonale par PCR

Dans chaque gouttelette les séquences cibles sont amplifiées par PCR en point final grâce à un thermocycleur ayant un ramping adapté. Le ramping du thermocycleur est sa vitesse de passage d'une température à l'autre. La viscosité de l'émulsion ne permet pas les mouvements de convection qui se produisent en milieu fluide et qui permettent une uniformisation rapide de la température du milieu réactionnel ce qui impose un ramping lent. Les premiers cycles de PCR vont permettre de stabiliser les gouttelettes.

4) Nature du signal

Une sonde marquée par un fluorophore (FAM ou HEX) dont la fluorescence est éteinte par un Quencher s'hybride à la séquence d'intérêt à chaque étape d'hybridation. Deux amorces encadrent la séquence cible et permettent son amplification. La sonde sera hydrolysée par la polymérase lors de l'élongation, libérant le fluorophore de son Quencher (Figure 18).

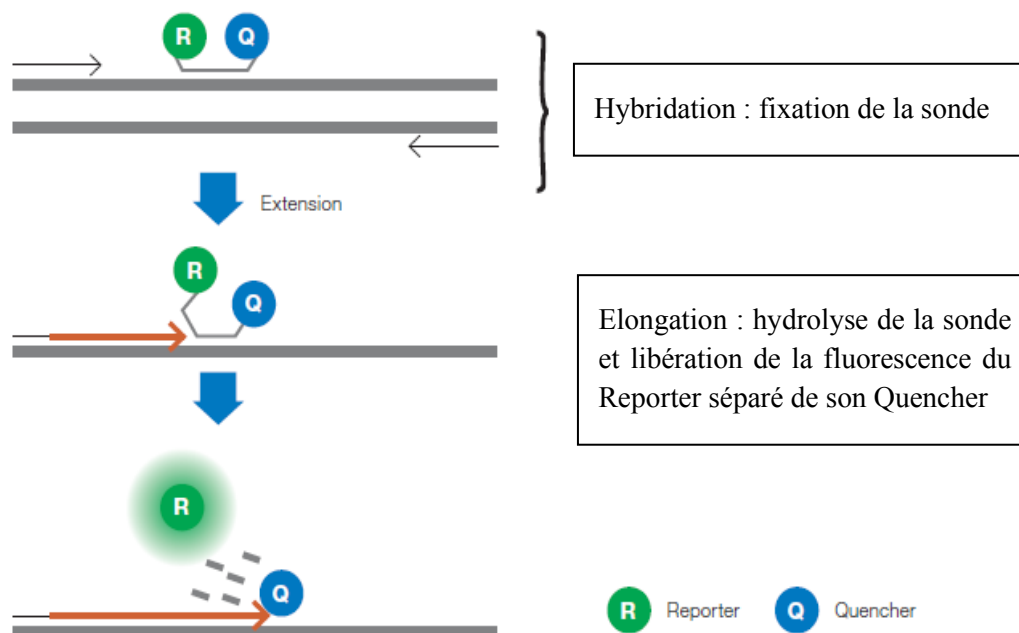


Figure 18 : Hydrolyse de la sonde et fluorescence (Bio-Rad)

5) Lecture du signal

La lecture a lieu en point final. Après l'amplification la plaque est chargée sur un lecteur de gouttelettes appelé QX200™ Droplet Reader. Une aiguille perce le film de scellage et aspire chaque échantillon. A la manière d'un cytomètre de flux, les gouttelettes sont alignées dans un fin capillaire et analysées individuellement en passant successivement devant un détecteur (Figure 19).

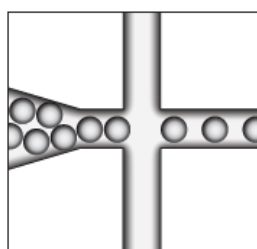


Figure 19 : Séparation des gouttelettes pour lecture de la fluorescence (Bio-Rad)

La paroi des gouttelettes a été rigidifiée par les hautes températures de l'amplification, elles résistent ainsi aux forces de cisaillement imposées à cette étape. Un certain nombre de gouttelettes auront néanmoins été perdues au cours des étapes précédentes. En fonction de la matrice et de l'opérateur le nombre de gouttelettes lues *in fine* se situera en général entre 10 000 et 18 000. L'excitation est assurée par deux diodes. La fluorescence est mesurée dans deux canaux d'émission différents pour le FAM et l'HEX. Chaque gouttelette est analysée, celles dont la taille n'est pas standard (fusion de gouttelettes) seront rejetées. L'intensité de fluorescence dans chaque canal est enregistrée permettant de déterminer en fonction d'un

seuil de fluorescence préalablement fixé s'il y a eu amplification : témoignant de la présence de cible au sein de la gouttelette. L'interprétation de chacune des gouttelettes peut donc se résumer à un résultat binaire positif ou négatif.

Chaque lecture d'échantillon commence et se termine par un cycle de lavage afin d'éviter les contaminations inter-échantillons.

6) Analyse des données

L'hydrolyse de la sonde a eu lieu dans les gouttelettes qui contenaient au moins une copie d'ADNc cible avant l'amplification. Ces gouttelettes émettent une fluorescence d'intensité supérieure aux autres dans le canal concerné et seront considérées comme positives, les autres négatives.

L'analyse est effectuée par le logiciel QuantaSoft™. Pour chaque canal les données peuvent être visualisées sous la forme d'un graphique en une dimension (1D) où chaque point rapporte pour une gouttelette son intensité de fluorescence en fonction de son rang d'analyse. Sur la Figure 20 les gouttelettes bleues dont l'intensité de fluorescence est supérieure au seuil (ligne rose) sont considérées positives (score 1), les grises négatives (score 0).

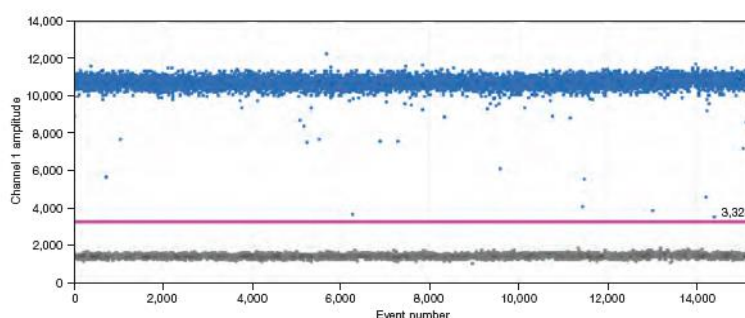


Figure 20 : Représentation 1D du canal FAM (muté) pour un échantillon (Bio-Rad)

Dans le cas d'une quantification en duplex les données des deux canaux peuvent être visualisées ensemble sur un graphique en deux dimensions (2D). Chaque point rapporte alors pour une gouttelette son intensité de fluorescence dans le canal FAM en fonction de son intensité de fluorescence dans le canal HEX (Figure 21).

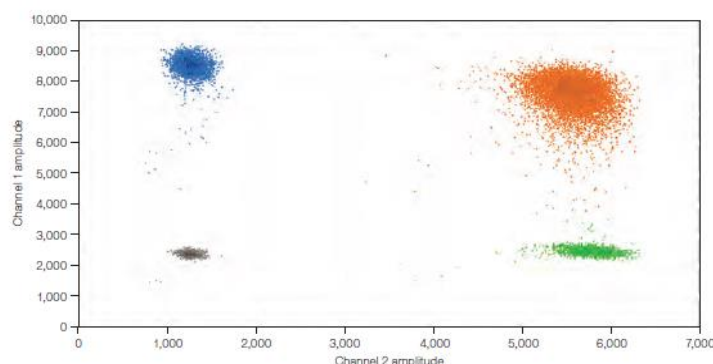


Figure 21 : Représentation 2D pour un échantillon (Bio-Rad)

Les gouttelettes sont réparties en 4 catégories de fluorescence visualisables par autant de nuages de points :

- FAM négative, HEX négative : gris (gouttelettes double-négatives)
- FAM positive, HEX négative : bleu
- FAM négative, HEX positive : vert
- FAM positive, HEX positive : orange (gouttelettes double-positives)

7) Loi de Poisson

Certaines gouttelettes peuvent contenir avant l'amplification plusieurs copies de la séquence cible. Ces gouttelettes ne sont pas différenciables de celles qui ne comportaient qu'une copie unique. Un simple dénombrement des partitions positives conduirait à une sous-estimation du nombre total de copies.

La répartition du nombre de copies au sein de chaque gouttelette étant aléatoire elle est modélisable par la loi de Poisson qui estime combien de compartiments contenaient avant amplification une cible, deux, trois ou plus. Ainsi, à partir du nombre mesuré de gouttelettes positives (contenant au moins une copie de la cible) on obtient une estimation du nombre de copies de la cible initialement présentes dans l'échantillon. Dans la Figure 22, pour un fractionnement en 143 gouttelettes, si 70 sont positives, la loi de Poisson estime le nombre de copies présentes à 96.

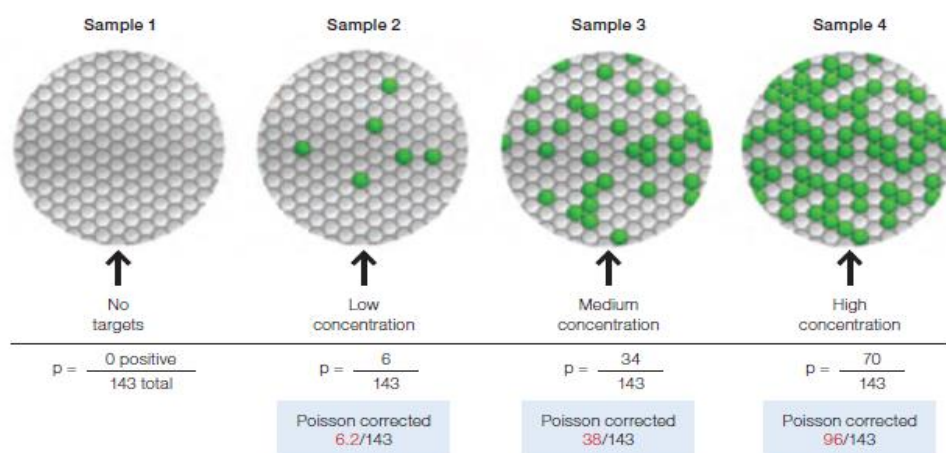


Figure 22 : Estimation du nombre de copies d'ADNc cible dans un échantillon (Bio-Rad)

Soit

N : nombre de copies d'ADNc cible dans l'échantillon

X : nombre de gouttelettes de volumes identiques générées dans l'échantillon

x : nombre de gouttelettes positives (score 1)

On compte x gouttelettes positives contenant au moins une copie de la cible. Le logiciel applique la loi de Poisson et estime N à partir de x :

$$n/X = -\ln(1-p) = -\ln(1-x/X) \text{ donc } n = (-\ln(1-x/X)) * X$$

avec $p = x/X$: fraction de gouttelettes positives et n : estimation de N

N sera compris dans $n \pm$ intervalle de confiance.

III. Expérimentation

1) Echantillons

Deux types d'échantillons ont été testés. Les pools de témoins négatifs sont obtenus à partir de l'ARN extrait des leucocytes de patients atteints de Leucémie Myéloïde Chronique (LMC). Les échantillons positifs sont obtenus à partir de l'ARN extrait des leucocytes de patients porteurs d'un variant rare de la mutation *NPM1*.

Les patients retenus étaient soit des patients pour lesquels le diagnostic de LAM a été établi au sein du laboratoire entre 2016 et 2018 soit des patients issus du protocole ALFA-0702.

Parmi les patients du protocole ALFA-0702 (n=713) ont été retenus ceux présentant un variant rare de la mutation de *NPM1* et pour lesquels au moins un prélèvement de sang ou à défaut de moelle osseuse ultérieur à l'induction était exploitable (culot cellulaire ou ARN déjà extrait) (n=23). L'analyse a été effectuée sur les échantillons de sang périphérique ou à défaut de moelle osseuse prélevés lors du diagnostic et en post-induction (MRD1) pour les patients en RC. Pour les patients ayant rechuté l'ensemble des points de suivi prélevés sur sang périphérique ont été analysés.

Les échantillons reçus des centres participants étaient conservés au laboratoire d'Hématologie au Centre de Biologie Pathologie de Lille et au Centre de Conservation des Echantillons du CHRU de Lille.

Le protocole ALFA-0702 est un essai clinique académique mené par le groupe coopérateur ALFA, qui regroupe environ 1/3 des centres français prenant en charge les patients atteints de LAM. C'est un protocole de phase II randomisé comparant la clofarabine associée à des doses intermédiaires de cytarabine (CLARA), à la cytarabine à forte dose (HDAC) en consolidation chez les patients jeunes (18-60 ans) atteints de LAM *de novo*, LAP et LAM-CBF exclues. La survie sans rechute (RFS) était prolongée par le protocole clofarabine/IDAC dans les groupes de patients de risque intermédiaire et défavorable [111].

Nous avons ainsi pu étudier 16 variants rares de *NPM1* dont les séquences sont reportées dans le Tableau 5 selon la nomenclature HGVS (à partir de la séquence de référence NM_002520):

Variants	Nomenclature HGVS
Mutation 4	NPM1 exon 11 c.863_864insCTTG : p.W288Cfs*12
Mutation Km	NPM1 exon 11 c.863_864insCCGG : p.W288Cfs*12
Mutation Nm	NPM1 exon 11 c.863_864insCCAG : p.W288Cfs*12
Mutation Om	NPM1 exon 11 c.863_864insTTTG : p.W288Cfs*12
Mutation Qm	NPM1 exon 11 c.863_864insTCGG : p.W288Cfs*12
Mutation DD5	NPM1 exon 11 c.863_864insTCAG : p.W288Cfs*12
Mutation I	NPM1 exon 11 c.863_864insCAGA : p.W288Cfs*12
Mutation S	NPM1 exon 11 c.863_864insCAAA : p.W288Cfs*12
Mutation J'	NPM1 exon 11 c.863_864insTATG : p.W288Cfs*12
Mutation I'	NPM1 exon 11 c.863_864insTAAG : p.W288Cfs*12
Insertion de 4 pb : CAAG	NPM1 exon 11 c.863_864insCAAG : p.W288Cfs*12
Insertion de 4 pb : CCTC	NPM1 exon 11 c.863_864insCCTC : p.W288Cfs*12
Insertion de 4 pb : TTCG	NPM1 exon 11 c.863_864insTTCG : p.W288Cfs*12
Insertion de 4 pb : CCGA	NPM1 exon 11 c.863_864insCCGA : p.W288Cfs*12
Insertion de 4 pb : TCAA	NPM1 exon 11 c.865_866insTCAA : p.Q289Lfs*11
delGGAGG insCCTTGGCCC	NPM1 exon 11 c.869_873delinsCCTTGGCCC : p.W290Sfs*10

Tableau 5 : Liste des variants rares de *NPM1* étudiés

2) Matériels

- A Automated Droplet Generator : générateur de gouttelettes
- B ddPCR 96-Well Plates (ref 12001925) : plaque semi-jupée 96 puits spécifique à la ddPCR
- C DG32™ Automated Droplet Generator Cartridges (ref 1864109) : cartouches à émulsion
- D Pipet Tips for the AutoDG™ System (ref 1864121) : cônes pour l'émulsion
- E PX1™ PCR Plate Sealer : thermoscelleuse
- F T100™ Thermal Cycler : thermocycleur
- G QX200™ Droplet Reader : automate permettant la lecture des résultats en fin de PCR



A



B



C



D



E



F



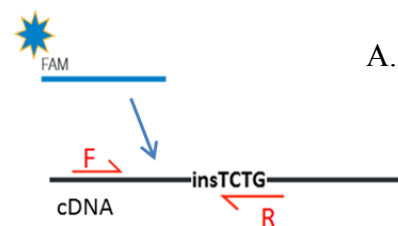
G

3) Réactifs

Dans notre étude la quantification des transcrits *NPM1*-muté et la quantification du gène de référence *ABL* sont réalisées en multiplex c'est-à-dire simultanément et au sein du même puits. Deux sondes sont utilisées, l'une spécifique du transcrit *NPM1* et l'autre spécifique de *ABL*. L'amplification est détectée par un système TaqMan.

Système *NPM1* (Figure 23A)

- Amorces Reverse spécifique du transcrit *NPM1*-muté
- Amorces Forward commune à tous les variants *NPM1*
- Une sonde générique *NPM1* marquée par du FAM



Système *ABL* (Figure 23B)

- Amorces-sonde (système EAC) marquée par du HEX



Figure 23

La composition du mélange réactionnel est détaillée dans le Tableau 6.

Mélange réactionnel pour l'amplification	
Réactifs	Volume (µL)
ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) (2X)	12
H ₂ O	5,016 / 0,016
<i>ABL</i> amorce sens ENF1003 (100 pmol/µl)	0,216
<i>ABL</i> amorce anti-sens ENR1063 (100 pmol/µl)	0,216
<i>NPM1</i> amorce sens (100 pmol/µl)	0,216
<i>NPM1</i> amorce anti-sens (100 pmol/µl)	0,216
sonde <i>ABL</i> ENP1043_ddPCR (100 pmol/µl)	0,06
sonde <i>NPM1</i> (100 pmol/µl)	0,06
ADNc diagnostic (2 ng/µL) / ADNc suivi (20 ng/µL)	6 / 11
Volume de Mix	18 / 13
Volume réactionnel total	24

Tableau 6 : Composition du mélange réactionnel

Le ddPCR™ Supermix for Probes (No dUTP) est un mix contenant les dNTP et le MgCl₂.

Le volume réactionnel total est de 24 µL. Il est impératif de ne pas utiliser un volume inférieur afin de garantir une qualité d'émulsion optimale. On ajoute alors 10% à chaque volume afin de garantir un volume correct en dépit des volumes morts. Pour les mutations A et 4 les volumes d'amorces *NPM1* sens et anti-sens sont divisés par 4. Les quantités d'ADNc sont adaptées selon que l'échantillon ait été prélevé au diagnostic de la maladie ou durant le suivi pour l'évaluation de la maladie résiduelle afin de garantir une précision optimale de la quantification.

Deux huiles sont également nécessaires :

- Automated Droplet Generation Oil for Probes (ref 1864110) : huile nécessaire pour l'émulsion automatisée
- ddPCR™ Droplet Reader Oil (ref 1863004) : huile de réserve pour l'automate de lecture

4) Protocole

La première étape est l'émulsion, 6 µL (ou 11) d'échantillon et 18 µL (ou 13) de mélange réactionnel sont déposés dans les puits de la plaque (B). La plaque est thermo-scellée à l'aide d'un film en aluminium (E) puis placée dans le générateur de gouttelettes (A).

Une fois l'émulsion réalisée les 40 µL de produit d'émulsion sont placés dans une nouvelle plaque à PCR par l'automate. Il est alors possible d'observer un trouble dans les puits de récupération correspondant aux gouttelettes générées. Après cette étape la plaque est à manipuler avec une grande minutie pour ne pas créer un effet « vortex » qui risque d'endommager les gouttelettes. Cette plaque est ensuite thermo-scellée par le Plate Sealer (E).

L'étape suivante est l'amplification par PCR (F) selon le programme suivant :

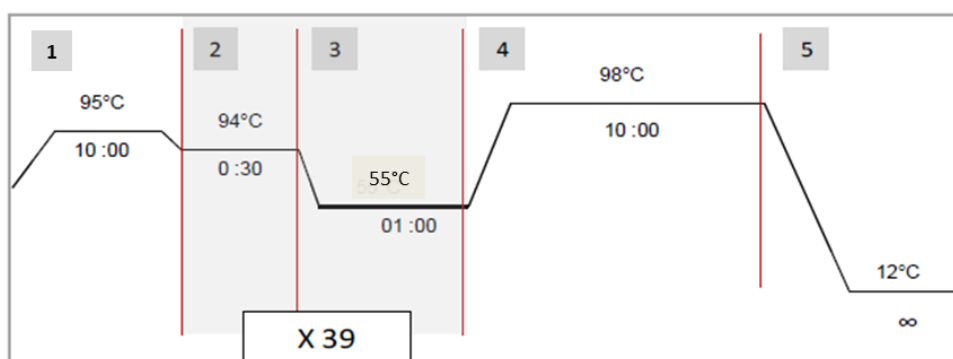


Figure 24 : Programme d'amplification

1. Dénaturation thermique initiale pour obtenir l'ADNc sous forme simple brin.
2. Activation de la Taq / élongation de l'ADNc par la Taq polymérase.
3. Hybridation des amorces. Elle va permettre la fixation de l'amorce spécifique sur l'ADNc matrice monobrin. Cette amorce va permettre l'initiation de l'élongation par la Taq polymérase.
4. Blocage de la réaction par inactivation de l'enzyme.
5. Maintien à température.

Après l'amplification les gouttelettes sont analysées dans le lecteur QX200™ Droplet Reader (G) et les résultats interprétés dans le logiciel Quantasoft.

RESULTATS

I. Mise au point et optimisation du protocole de PCR digitale

1) Détermination de la température d'hybridation optimale

La température d'hybridation de la sonde est l'un des paramètres les plus critiques pour la spécificité de la réaction. Si elle est trop basse elle peut engendrer des amplifications non spécifiques. A l'inverse une température trop élevée réduira le rendement. Le calcul de la température théorique d'hybridation d'une amorce ou d'une sonde ne dispense pas d'un ajustement empirique.

Pour chacune des mutations étudiées nous avons testé le protocole sur des échantillons de patients au diagnostic en gradient de température. Cela consiste à tester plusieurs températures d'hybridation sur une même plaque 96 puits et en une seule opération en programmant un thermocycleur capable d'appliquer des températures différentes de quelques degrés à des puits adjacents. La température d'hybridation diminue linéairement de 60 à 52°C de la ligne A à la ligne H.

La température optimale doit permettre la plus grande différence d'amplitude de fluorescence entre les clusters de gouttelettes positives et négatives sans provoquer d'amplifications non spécifiques, et être si possible commune à toutes les mutations ce qui permettra par la suite l'amplification de plusieurs variants sur une même plaque.

La Figure 25 montre la représentation 1D des résultats obtenus pour la mutation I de *NPM1*. Dans cet exemple la meilleure discrimination entre signaux positifs et négatifs est obtenue dans les puits E et F. La température finalement retenue est 55°C pour les 16 variants rares. Pour des raisons de quantité de matériel disponible les essais pour la validation de la méthode sont réalisés sur la forme A uniquement et les résultats seront extrapolés aux variants rares. Pour la forme *NPM1-A* la température d'hybridation optimale est 60°C.

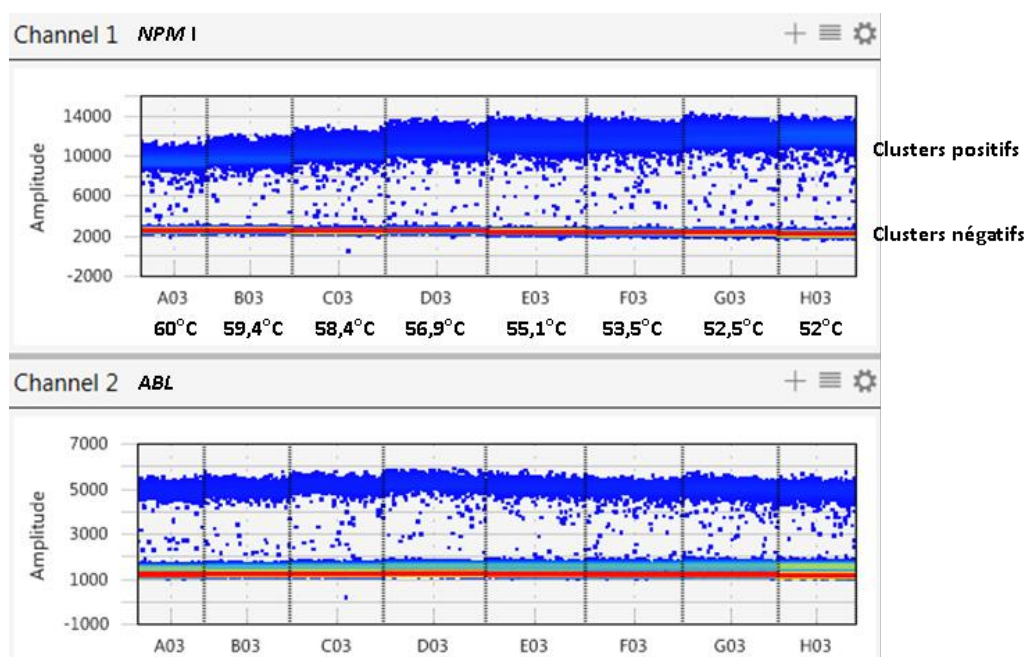


Figure 25 : Gradient de température pour la forme *NPM1-I*

2) Limites de mesure

a. Limite de blanc

Il est nécessaire de fixer les seuils de fluorescence permettant de discriminer les gouttelettes positives des gouttelettes négatives. Les seuils sont fixés en observant les courbes de distribution de la fluorescence (Figure 26). Pour chaque variant et pour chaque sonde on choisit l'amplitude pour laquelle la fréquence des gouttelettes positives et négatives est la plus faible.

Les seuils de fluorescence pour *NPM1* sont déterminés à partir des résultats des témoins positifs. Ils sont ainsi fixés à une amplitude allant de 9 000 à 10 000 selon les variants. Pour les formes A et 4 le seuil *NPM1* est fixé à 6 000, les volumes d'amorces sens et anti-sens de *NPM1* devant être divisés par 4 en raison d'un bruit de fond dû à des amplifications non spécifiques. Ainsi l'amplitude du cluster positif pour ces variants est plus faible.

Pour *ABL* le seuil est déterminé à partir des résultats du témoin négatif (pool d'échantillons de patients au diagnostic de LMC), il est fixé à 2500 ou 3 000 selon les systèmes.

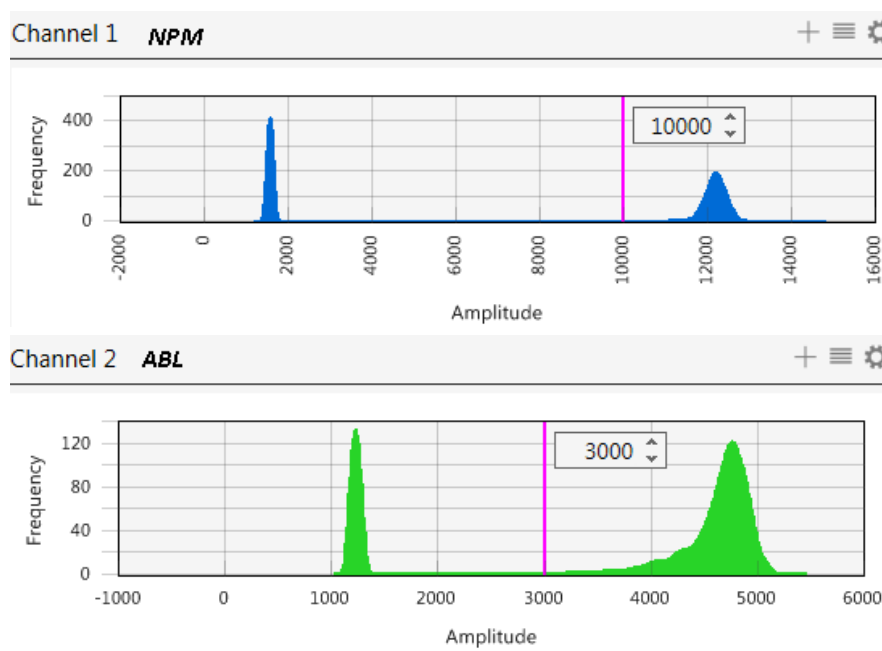


Figure 26 : Exemple de positionnement des seuils de fluorescence pour *NPM1* et *ABL*

La fixation des seuils permet par la suite de déterminer pour chaque variant le nombre de gouttelettes faussement positives pour *NPM1*. Pour cela nous avons réalisé pour chaque variant une analyse par ddPCR avec les paramètres décrits précédemment, sur un témoin négatif avec comme contrôles un échantillon positif et un contrôle NTC (H_2O). La limite de blanc (LoB ou bruit de fond) est ainsi déterminée grâce à la quantification de 8 fois le témoin négatif pour chaque variant.

Par exemple pour *NPM1* de type A nous obtenons 1 gouttelette positive sur les 8 puits de témoin négatif (Figure 27) soit 1,9 copies de *NPM1* pour 320 712 copies d'*ABL*.

Ainsi $LoB_{NPM1-A} = 0,002\%$

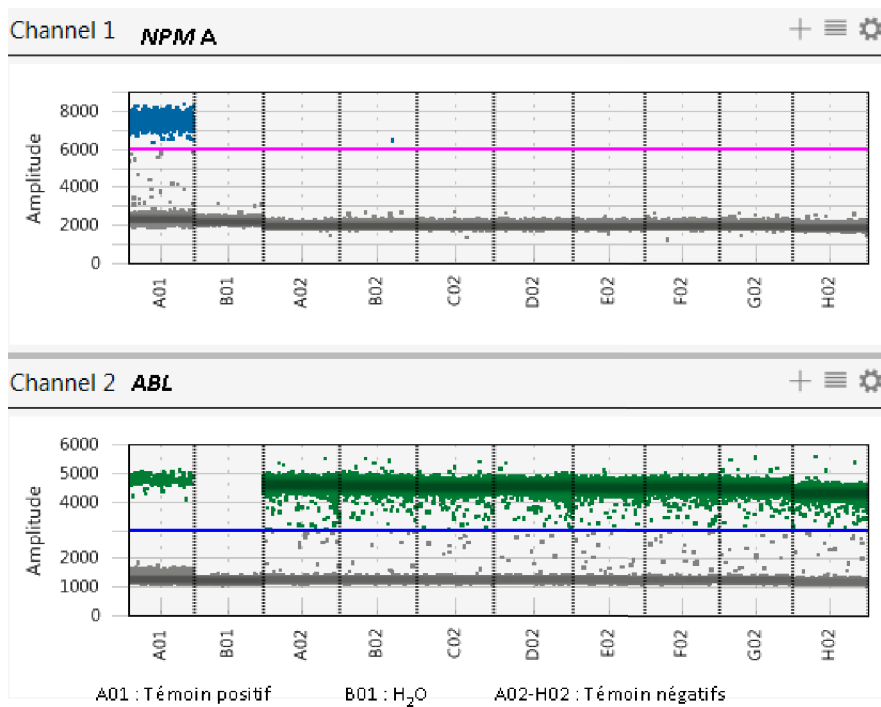


Figure 27 : Détermination de la LoB pour *NPMI-A*

Les essais effectués pour déterminer la LoB des variants rares sont présentés en Annexe 1.

b. Limite de linéarité

La limite de linéarité est déterminée grâce à la quantification de 7 témoins positifs obtenus par dilutions en série d'un plasmide commercial *NPMI* de type A dont le nombre de copies est connu (10^5 copies/ μ L) (Quiagen®). Chaque dilution du plasmide *NPMI-A* est ensuite mélangée avec une dilution de plasmide *ABL* (Quiagen®) de manière à avoir pour chaque dilution de *NPMI-A* 32 000 copies d'*ABL* par prise d'essai.

On obtient ainsi les dilutions suivantes : 312%, 156%, 100%, 10%, 1%, 0,1% et 0,01%.

La gamme dynamique s'étend de 10^5 copies à 3,2 copies de *NPMI-A*. La limite de linéarité est déterminée pour le variant de type A uniquement (Figure 28) et les résultats seront extrapolés aux autres variants.

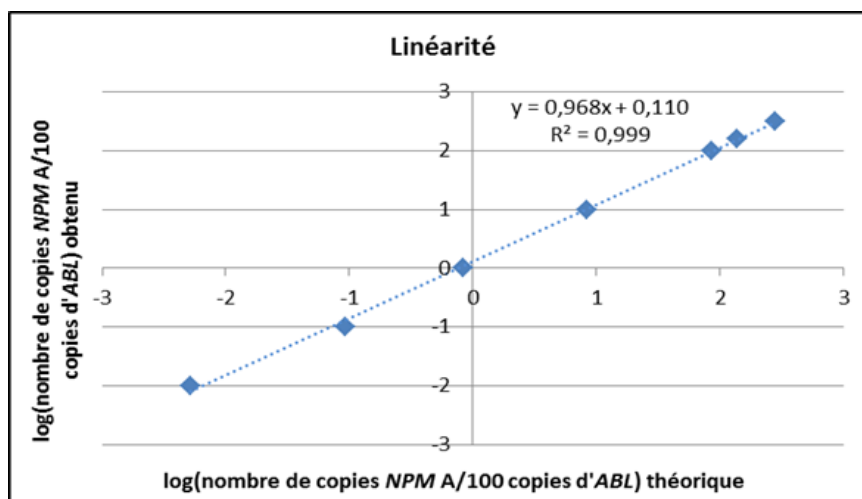


Figure 28 : Résultat de la mesure de la gamme de dilution après transformation logarithmique

c. Limite de détection

La limite de détection (LoD) est déterminée en mesurant 20 fois un échantillon contenant 5 copies de *NPM1* de type A afin de s'affranchir du biais d'échantillonnage, soit un ratio de 0,015% pour une prise d'essai de 32 000 copies d'*ABL*. Ce témoin 0,015% est réalisé à partir de plasmides commerciaux *NPM1* de type A et *ABL* (Quiagen®). L'essai est réalisé avec comme contrôles un échantillon positif, un échantillon négatif et un contrôle NTC (H_2O).

Au moins une copie a été détectée dans 19 puits (Figure 29).

Ainsi pour le variant *NPM1-A* la LoD à 95% est égale à 5 copies donc pour un échantillon contenant par exemple 50 000 copies d'*ABL* : LoD = 0,01%.

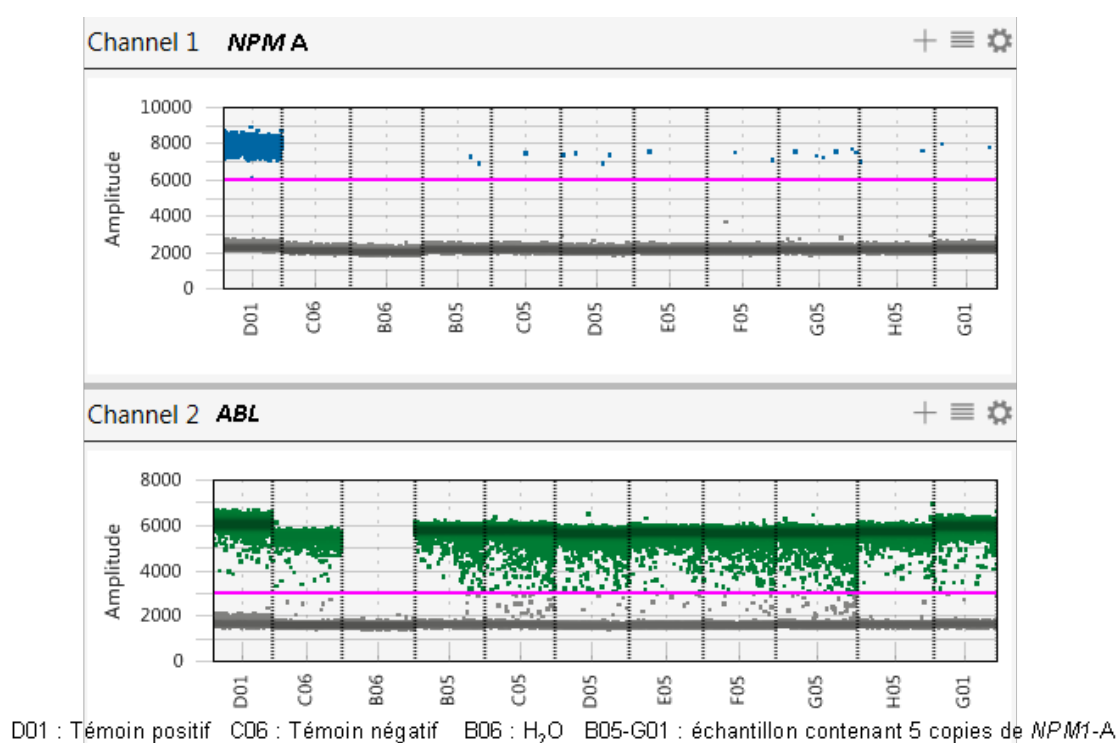


Figure 29 : Détermination de la LoD pour *NPM1-A*

La LoD est déterminée pour le variant de type A uniquement.

d. Détection des contaminations

Un mélange réactionnel complet mais exempt d'ADNc contrôle l'absence de contamination des réactifs, du matériel et de l'environnement par des copies d'ADNc muté (comme non muté) à raison de 2 puits par variant et par plaque.

II. Validation de la méthode

1) Fidélité

La fidélité exprime l'étroitesse de l'accord entre une série de mesures provenant de multiples prises d'essai d'un même échantillon homogène dans des conditions prescrites. La fidélité traduit la distribution des erreurs aléatoires. Elle est évaluée ici à deux niveaux : la répétabilité et la fidélité intermédiaire.

a. Répétabilité

La répétabilité évalue la précision de la technique au sein d'une série unique. Pour déterminer la répétabilité de la technique 3 échantillons avec des ratios différents de *NPM1* de type A sont testés 10 fois dans une série unique. L'essai de répétabilité est représenté en Annexe 2 et les résultats sont synthétisés dans le Tableau 7.

	Nombre de copies <i>NPM1</i> / Nombre de copies d' <i>ABL</i>					
	Moyenne	Intervalle de confiance 95%		CV	Moyenne (log)	Ecart-type (log)
		Min	Max			
Niv. 1	85%	78%	92%	4,1%	-0,072	0,018
Niv. 2	0,82%	0,72%	0,95%	6,7%	-2,09	0,030
Niv. 3	0,10%	0,05%	0,19%	34%	-3,03	0,14

Tableau 7 : Résultats de l'étude de la répétabilité

b. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire correspond à la fidélité intralaboratoire, elle est déterminée à partir des résultats de 3 échantillons avec des ratios différents de *NPM1* de type A passés en duplicate dans 7 séries différentes. L'essai de fidélité intermédiaire est représenté en Annexe 3 et les résultats sont synthétisés dans le Tableau 8.

	Nombre de copies <i>NPM1</i> / Nombre de copies d' <i>ABL</i>					
	Moyenne	Intervalle de confiance 95%		CV	Moyenne (log)	Ecart-type (log)
		Min	Max			
Niv. 1	91%	89%	92%	0,76%	-0,043	0,004
Niv. 2	0,80%	0,73%	0,89%	4,7%	-2,10	0,022
Niv. 3	0,09%	0,052%	0,17%	29%	-3,04	0,13

Tableau 8 : Résultats de l'étude de la fidélité intermédiaire

2) Exactitude

L'exactitude exprime l'étroitesse de l'accord entre le résultat et la valeur de référence acceptée. L'étroitesse de l'accord ainsi observée est la résultante de la somme des erreurs systématiques et aléatoires, en d'autres termes, l'erreur totale liée au résultat.

L'exactitude est évaluée ici grâce à 3 contrôles de qualité d'Examens Externes de la Qualité (EEQ) de niveaux d'expression différents de *NPM1* de type A fournis par le GBMHHM (Groupe des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes). Les résultats sont synthétisés dans le Tableau 9.

	Nombre de copies <i>NPM1</i> / Nombre de copies d' <i>ABL</i>					
	Valeur cible	Valeur obtenue	Intervalle de confiance 95%		Biais (log)	Incertitude combinée (log)
			Min	Max		
Niv. 1	166%	180%	164%	198%	0,035	0,021
Niv. 2	18,6%	21,1%	17,6%	25,3%	0,056	0,039
Niv. 3	3,31%	4,27%	3,13%	5,83%	0,11	0,068

Tableau 9 : Résultats de l'étude de l'exactitude

Calcul de l'incertitude :

Composante issue de la fidélité intermédiaire (FI) : $U_1 = ET_{FI}(\log)$

Composante issue du biais : $U_2 = \text{biais} / \sqrt{3}$ avec $\text{biais} = \log(\text{cible}) - \log(\text{obtenu})$

Incertitude combinée : $U_c = \sqrt{(U_1^2 + U_2^2)}$

3) Comparaison de méthodes

Nous avons comparé des résultats obtenus pour 28 échantillons de patients porteurs d'une mutation *NPM1-A* par ddPCR et par RT-PCR quantitative par chimie TaqMan (qPCR). Chaque échantillon a été analysé successivement par les 2 techniques à partir de matériel issu de la même extraction et de la même RT et dans un intervalle de temps limité. Les patients pour lesquels au moins une des 2 techniques rendait un résultat indétectable n'ont pas été pris en compte pour la comparaison.

La corrélation entre les 2 techniques est appréciée grâce à la régression des moindres carrés (Figure 30) et aux graphiques de Bland et Altman (Figures 31 et 32).

L'essai de comparaison de méthodes est représenté en Annexe 4.

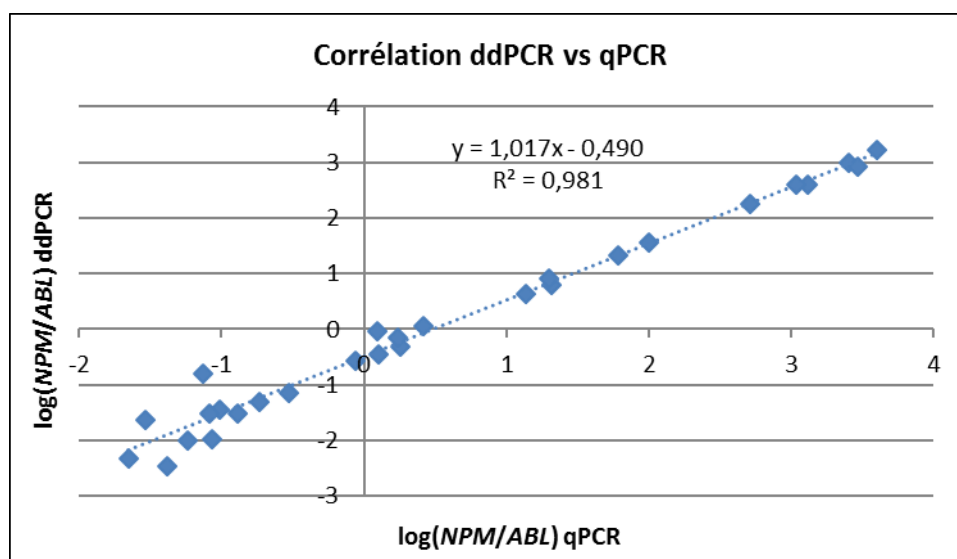


Figure 30 : Comparaison des résultats obtenus par ddPCR et qPCR après transformation logarithmique

Evaluation du facteur de conversion :

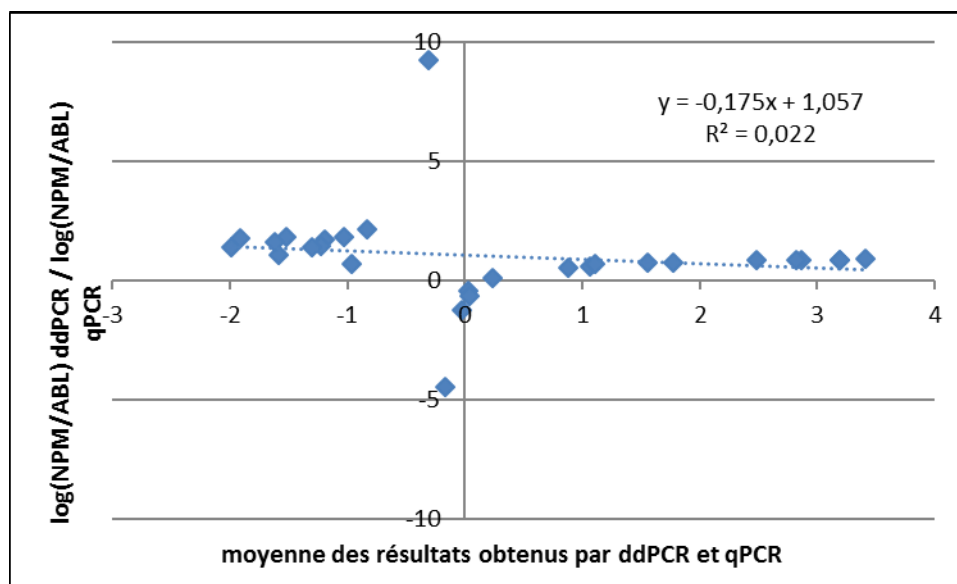


Figure 31 : Diagramme de Bland et Altman après transformation logarithmique

Evaluation du biais systématique :

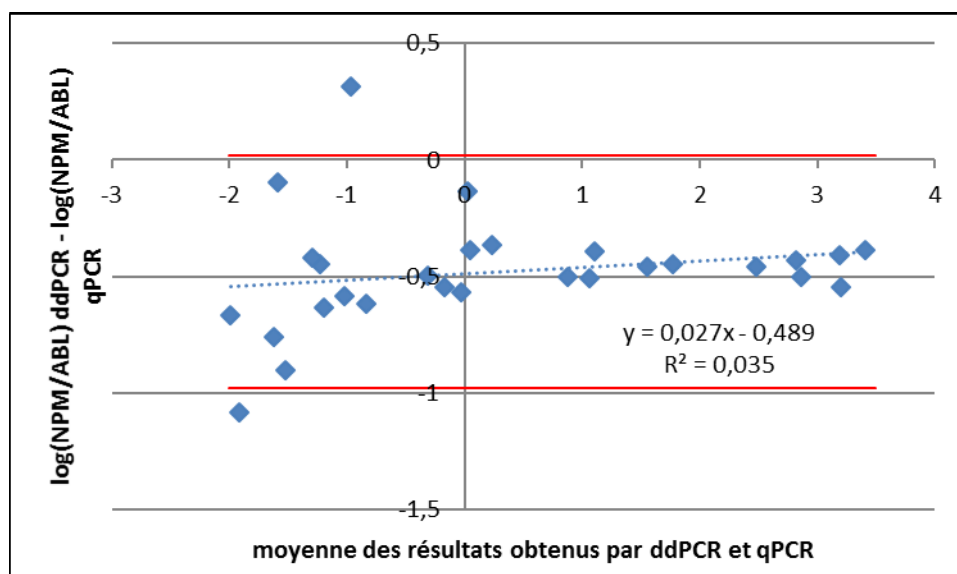


Figure 32 : Diagramme de Bland et Altman après transformation logarithmique

III. Observations cliniques

1) Comparaison aux résultats de l'ALFA-0702

En 2016 le groupe ALFA a mis en évidence que la MRD en post-induction est un facteur prédictif du bénéfice de l'allogreffe dans les LAM avec *NPM1m* [112]. En effet, ils ont montré que les patients pour lesquels on observe une réduction du transcrit < 4 log sur le sang en post-induction (MRD1) présentent une incidence cumulée de rechute supérieure et une OS inférieure en comparaison aux patients qui atteignent une réduction du transcrit > 4 log (Figure 33). De plus, parmi les patients ayant une LAM défavorable selon l'ELN la DFS et l'OS sont significativement améliorées par l'allogreffe chez les patients ayant une réduction du transcrit < 4 log.

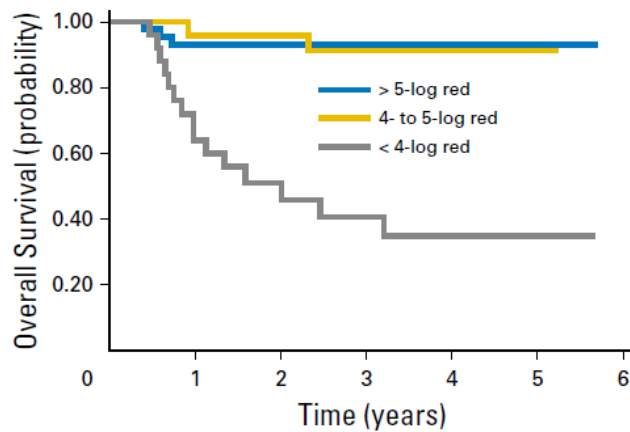


Figure 33 : OS censurée à la greffe selon la log réduction de la MRD dans le sang [112]

Le statut *NPM1*m dans le sang en MRD1 est donc un facteur prédictif pour l'indication d'allogreffe. Cette étude a été réalisée sur des échantillons de sang de patients inclus dans le protocole ALFA-0702 pour lesquels un variant A, B ou D a été identifié et pour lesquels une évaluation de la MRD était disponible en post-induction (n=152).

La question se pose alors de savoir si nous pouvons faire la même observation chez les patients porteurs d'un variant rare de *NPM1*.

Nous avons analysé les patients du protocole ALFA-0702 présentant un variant rare, ayant obtenu une RC et pour lesquels au moins un prélèvement de sang ou à défaut de moelle osseuse ultérieur à l'induction était exploitable (n=23). Voici les résultats que nous avons observés en termes de DFS et d'OS en appliquant ou non une censure à l'allogreffe de moelle osseuse afin de prendre en compte le biais que cette variable induit sur la survenue des décès et des rechutes (Figures 34 et 35).

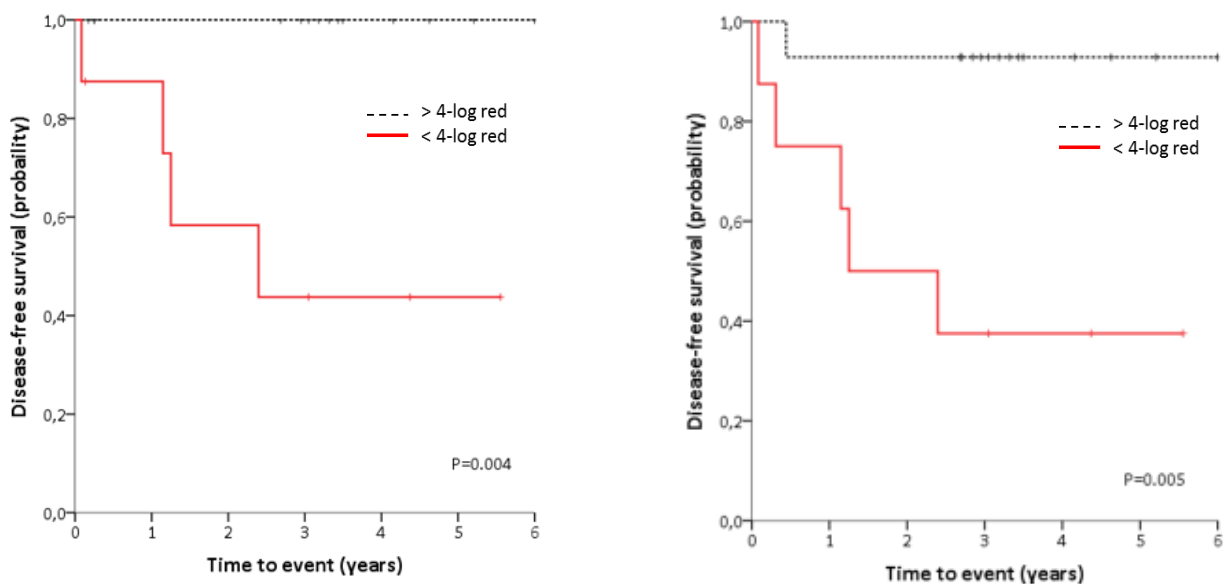


Figure 34 : DFS avec et sans censure à la greffe selon la log réduction de la MRD

L'impact pronostique de la MRD post-induction sur la DFS est significatif au seuil de 5%.

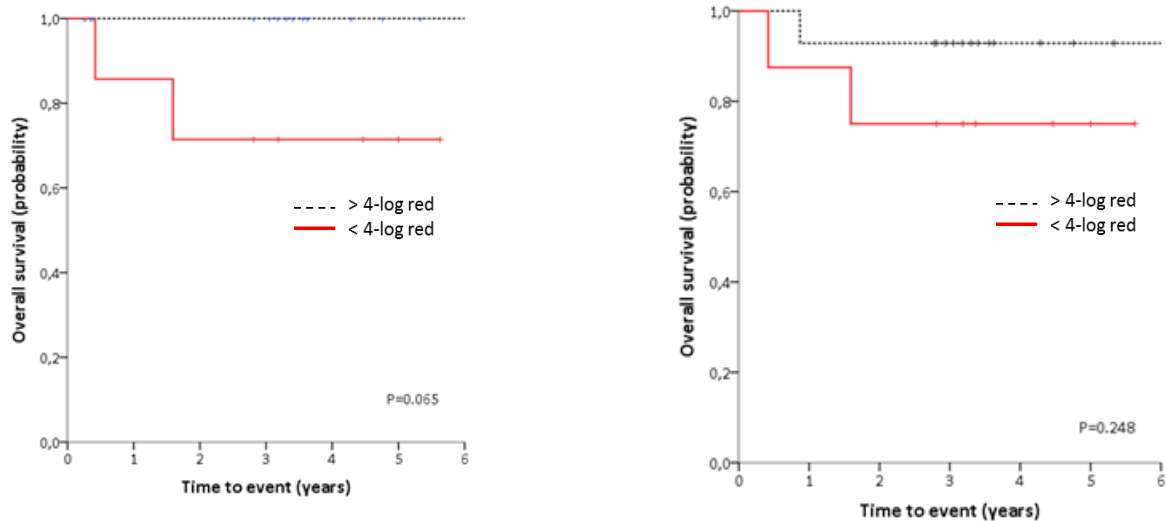


Figure 35 : OS avec et sans censure à la greffe selon la log réduction de la MRD

L'impact pronostique de la MRD post-induction sur l'OS n'est pas significatif.

Sur les 23 patients analysés 6 ont rechuté. Seulement 4 ont été greffés. L'effectif ici est trop restreint pour évaluer le bénéfice de l'allogreffe de moelle osseuse en fonction de la réponse moléculaire sur la DFS et sur l'OS.

2) Quelques exemples intéressants

Le patient 1 est issu du protocole ALFA-0702 et est porteur du variant Om de *NPM1* non quantifiable en qPCR. Le suivi de la maladie résiduelle a donc été réalisé sur *WT1*. En post-induction la MRD *WT1* est inférieure au seuil de positivité (<0,1%) alors que pour le transcrite *NPM1* la MRD est positive (0,12%) au seuil de 0.01% (Figure 36). On remarque que ce patient dont la réduction de la MRD *NPM1* est < 4 log a rechuté.

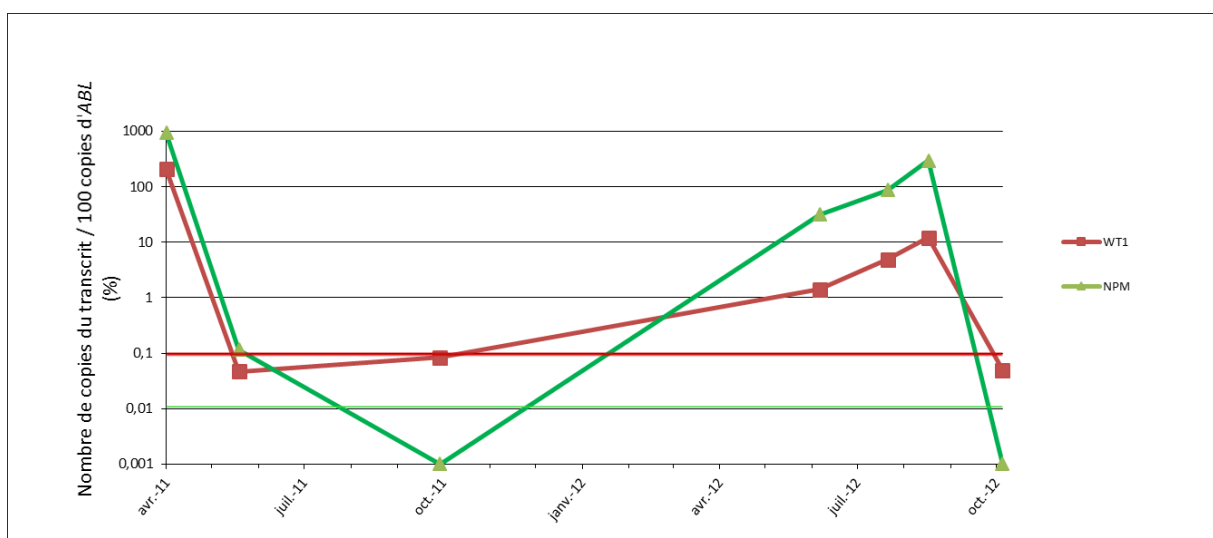


Figure 36 : Suivi sur le sang de la MRD avec *WT1* et *NPM1*

Le patient 2 est porteur du variant Qm de *NPM1*. On observe au niveau du 4^{ème} point que la MRD *WT1* est négative (<0,1%) alors que *NPM1* se repositive (0,010%) (Figure 37). Si ce patient avait été suivi sur *NPM1* des suivis plus rapprochés de sa maladie résiduelle auraient probablement été réalisés.

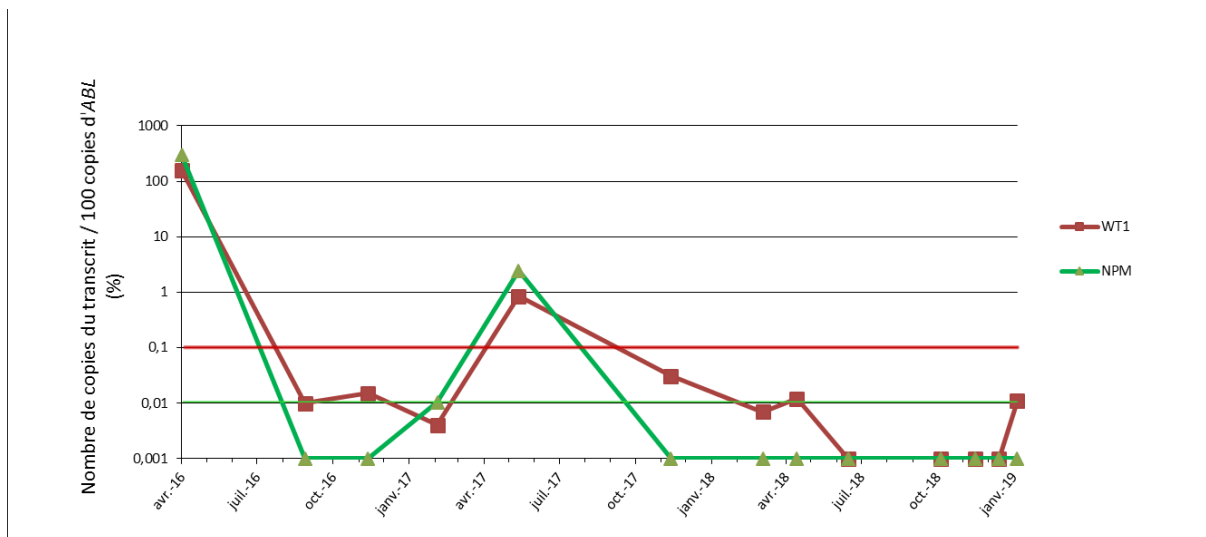


Figure 37 : Suivi sur le sang de la MRD avec *WT1* et *NPM1*

Le patient 3 est issu du protocole ALFA-0702 et est porteur du variant delinsCCTTGCCCC de *NPM1*. Ici avant la rechute *NPM1* n'est jamais indétectable alors que *WT1* l'est à deux reprises (Figure 38).

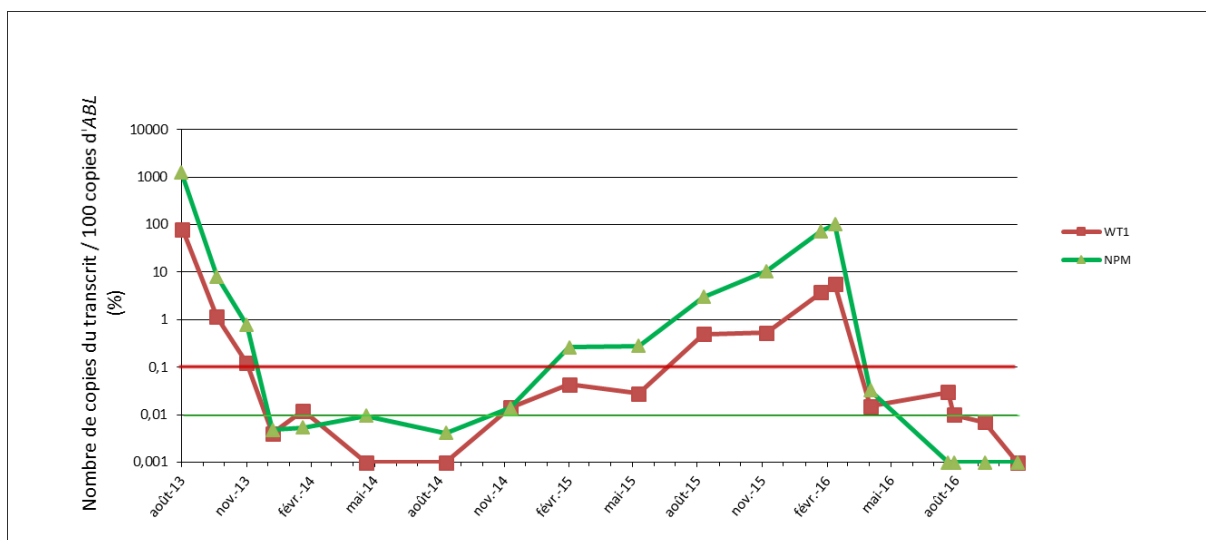


Figure 38 : Suivi sur le sang de la MRD avec *WT1* et *NPM1*

DISCUSSION

La ddPCR permet de quantifier et de détecter les mutations rares de *NPM1*. La séparation des événements positifs et négatifs est optimale avec une température d'hybridation des sondes de 55°C. Cette bonne discrimination des clusters positifs et négatifs nous a permis de fixer les seuils décisionnels de fluorescence permettant de discriminer les gouttelettes positives des gouttelettes négatives pour les deux sondes. Les valeurs de ces seuils sont vérifiées dans les séries suivantes et restent valables quelles que soient les séries. De plus l'analyse des témoins négatifs et des NTC a permis de montrer l'absence de gouttelette faussement positive pour la quasi-totalité des variants. Nous avons détecté une gouttelette faussement positive pour les variants insCAAG, insCCGA et pour la mutation 4. L'essai de limite de blanc montre des signaux très spécifiques pour *NPM1* : le bruit de fond est négligeable. Ces paramètres sont robustes et stables dans le temps, ce qui facilite l'analyse des résultats.

La technique est linéaire sur une gamme dynamique étendue allant de 10⁵ copies de *NPM1* à 3,2 copies. Le nombre de copies est aisément dénombrable. L'absence de faux positifs autorise une limite de détection potentiellement très basse. Dans les essais de LoD la dilution utilisée a permis de prouver que l'on était au moins capable de détecter les échantillons à 0,01%. Une LoD basse est d'autant plus intéressante dans un contexte de recherche de maladie résiduelle. Cependant cette capacité de détection rend la technologie très sensible aux contaminations et aux amplifications artéfactuelles.

Nous observons que les écart-types de l'évaluation de la fidélité intermédiaire sont plus faibles que ceux de la répétabilité. Pour la fidélité intermédiaire les 3 échantillons positifs utilisés sont obtenus à partir de 3 dilutions d'un plasmide commercial *NPM1* de type A (Quiagen®) mélangés à une dilution d'un plasmide *ABL* (Quiagen®) de manière à avoir pour chaque dilution de *NPM1*-A 32 000 copies d'*ABL* par prise d'essai. En revanche, pour la répétabilité les dilutions du plasmide *NPM1*-A sont mélangées à la dilution d'*ABL* de manière extemporanée pour chaque réplicat. Cette différence entre les écart-types des 2 essais est due à la multiplication du biais de pipetage introduit lors de la réalisation des échantillons positifs.

L'essai de répétabilité montre des résultats très précis avec des duplicats toujours très proches contrairement à ce qui est observé en qPCR. Les essais de fidélité intermédiaire ont montré que cette méthode est très reproductible de séries en séries, ce qui confirme la robustesse de cette technique. Plusieurs raisons peuvent expliquer cette meilleure précision.

Premièrement les sondes de *NPM1* et du gène de référence *ABL* sont multiplexées. Le nombre de copies de *NPM1* et d'*ABL* sont quantifiées dans le même puits, ce qui permet de s'affranchir des aléas de pipetage.

La détection d'événement rare est une problématique particulière. Dans le cadre du suivi de la maladie résiduelle *NPM1* elle consiste à détecter et quantifier un très faible nombre de copies de transcrite *NPM1* muté dilué dans une très grande quantité de copies du gène de référence. L'effet de partitionnement qui caractérise la PCR digitale va permettre à la copie mutante de se trouver localement (dans une gouttelette) dans une abondance relative bien plus élevée qu'en solution libre. Le signal qu'elle générera sera ainsi bien plus facile à détecter.

En revanche, en qPCR une quantification simultanée de plusieurs cibles est difficile à mettre en œuvre dans le cas d'un déséquilibre quantitatif important entre les 2 cibles. En effet la consommation des réactifs pour l'amplification de la cible la plus représentée impacterait l'efficacité de la PCR pour la cible la moins présente. Le partitionnement du milieu réactionnel en ddPCR permet de s'affranchir de ce déséquilibre quantitatif au sein d'une partition.

Deuxièmement la quantification en qPCR est indirecte : à partir de la mesure d'un Ct on calcule le nombre de copies selon une courbe de calibration. Alors qu'en ddPCR la quantification ne nécessite pas de courbe de calibration. On détermine directement un nombre de copies à partir du nombre de gouttelettes positives et après une correction statistique par la loi de Poisson ce qui est beaucoup plus précis qu'une extrapolation à partir d'une courbe de calibration.

Troisièmement la ddPCR offre une meilleure résistance au biais d'efficacité de PCR : en qPCR une efficacité de PCR moindre va se traduire par un Ct plus tardif et une sous-estimation du nombre de copies de la cible. En ddPCR les nuages de points pourront être déformés ou avoir une intensité de fluorescence moindre mais tant qu'ils peuvent être séparés la précision de la quantification n'est pas affectée.

La quantification par ddPCR est entachée de 2 sources d'erreur.

- Le biais d'échantillonnage que l'on rencontre pour les faibles concentrations et qui correspond au biais de représentativité de la prise d'essai par rapport à l'échantillon. Cependant ce biais est à prendre en compte quelle que soit la méthode de quantification.
- L'erreur de partitionnement qui correspond à l'erreur commise lors de l'estimation par la loi de Poisson. Elle est d'autant plus importante que les concentrations sont très élevées.

Ainsi prenons l'exemple d'un échantillon ayant abouti à la formation de 15 000 gouttelettes, la précision sera maximale pour une fréquence de 1,6 copies de la cible par gouttelette. Le logiciel calcule une estimation du nombre de copies du transcrit muté et une estimation du nombre de copies du gène de référence présentes dans l'échantillon avant l'amplification. Ces estimations sont encadrées par des intervalles de confiance qui tiennent compte à la fois du nombre de partitions, de l'erreur de partitionnement et de l'erreur de sous-échantillonnage. Les conditions d'utilisation de la PCR digitale permettent d'atteindre des intervalles de confiance étroits et donc une quantification absolue précise.

En parallèle de la précision, nous avons vérifié l'exactitude de la méthode par l'évaluation d'EEQ. L'exactitude est l'expression de la combinaison de la justesse et de la fidélité. Les résultats obtenus s'avèrent conformes aux résultats du GBMHM (incertitude inférieure aux limites d'acceptabilité du GBMHM). L'incertitude de la méthode est faible par rapport aux techniques de qPCR.

Concernant les résultats quantitatifs, la comparaison de méthodes a montré que les résultats étaient tout à fait concordants avec la méthode de référence : la qPCR. Les résultats sont bien corrélés, il n'y a pas de facteur de conversion. Cependant il existe un léger biais systématique négatif évalué à environ -0,49 sur les résultats des ratios en log par rapport à la qPCR. Ce biais n'est pas observé avec les résultats des EEQ qui montrent que même pour le plus faible ratio de *NPM1* le biais n'est qu'à 0,11. Nous pouvons nous demander si le biais systématique observé n'est pas plutôt dû à une surestimation des résultats en qPCR.

Du point de vue clinique les patients porteurs d'un variant rare de *NPM1* semblent se comporter de la même manière en termes de DFS et d'OS que les patients porteurs d'une mutation A, B ou D pour une log réduction du transcrit entre le diagnostic et la MRD1 similaire. Ainsi le statut *NPM1m* dans le sang en MRD1 semble être un facteur pronostique dans les LAM pour les patients porteurs aussi bien d'une mutation A, B ou D que d'un variant rare. Le bénéfice de l'allogreffe de moelle osseuse en fonction de la MRD post-induction reste à démontrer chez les patients porteurs d'un variant rare de *NPM1*.

Pour le suivi de la maladie résiduelle chez ces patients on note que *WT1* est un marqueur moins sensible que *NPM1*. En effet pour certains patients ayant rechuté un suivi sur *NPM1* aurait permis de mettre en place un suivi plus rapproché de la maladie résiduelle et ainsi de détecter plus précocement la rechute. *WT1* reste un bon marqueur de maladie résiduelle pour les patients mauvais répondeurs à la chimiothérapie. Le suivi de la MRD *NPM1* est à privilégier pour les patients bons répondeurs.

CONCLUSION

La PCR digitale est très souple d'utilisation et cette application offre plusieurs avantages par rapport à la qPCR.

La quantification simultanée dans le même puits du transcrit muté et du gène *ABL* autorise un débit plus élevé et permet de s'affranchir des aléas de pipetage.

La quantification directe sans extrapolation à partir d'une courbe de calibration offre une meilleure précision.

L'absence de calibrant permet de réduire le coût analytique et d'analyser des séries avec un nombre d'échantillons variable.

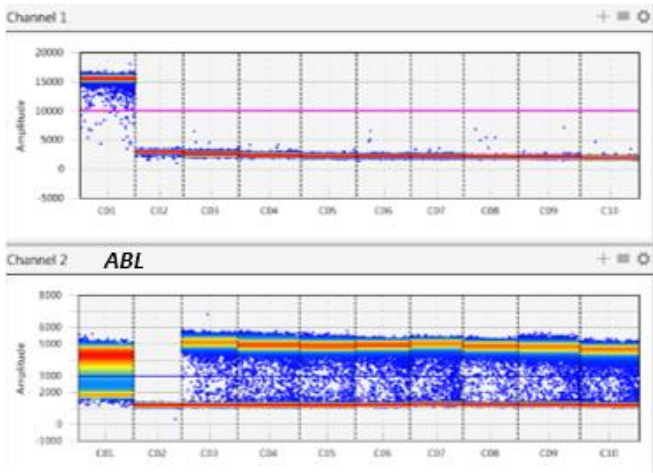
D'un point de vue clinique, la PCR digitale permet de suivre la maladie résiduelle chez des patients mutés *NPM1* là où *WT1* peut faire défaut.

Moins contraignante et plus précise, la PCR digitale se présente comme une alternative à la qPCR pour le suivi des patients *NPM1*-mutés. Adaptée à la quantification des variants rares de *NPM1*, cette technique permettra de suivre l'évolution de la maladie résiduelle et de détecter précocement une rechute chez ces patients.

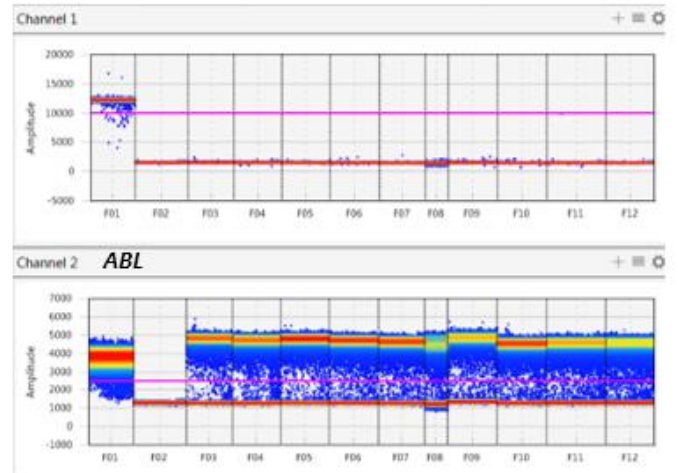
ANNEXES

Annexe 1 : Détermination de la LoB pour les variants rares de *NPM1*.

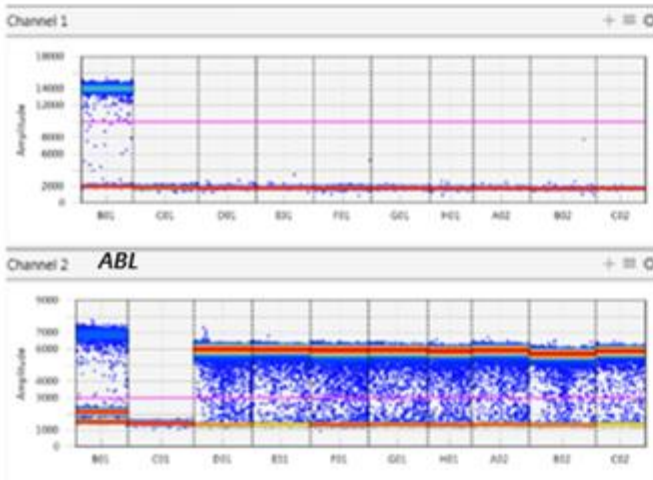
NPM1-I



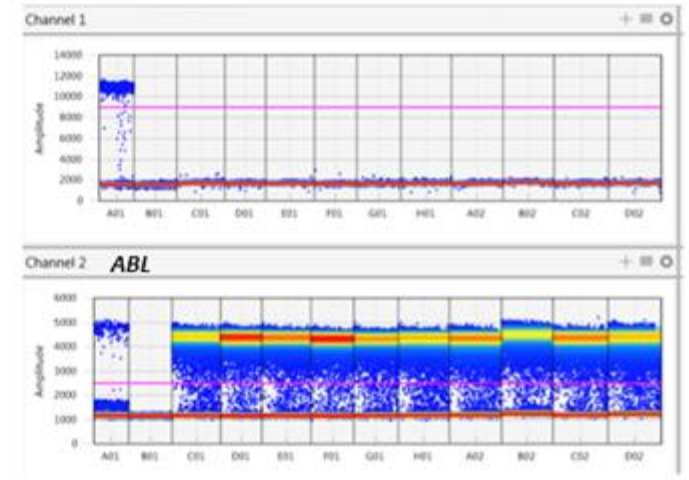
NPM1-J'



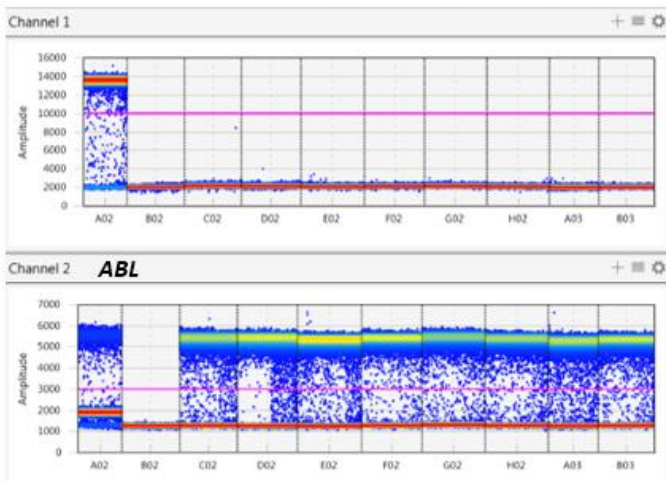
NPM1-I'



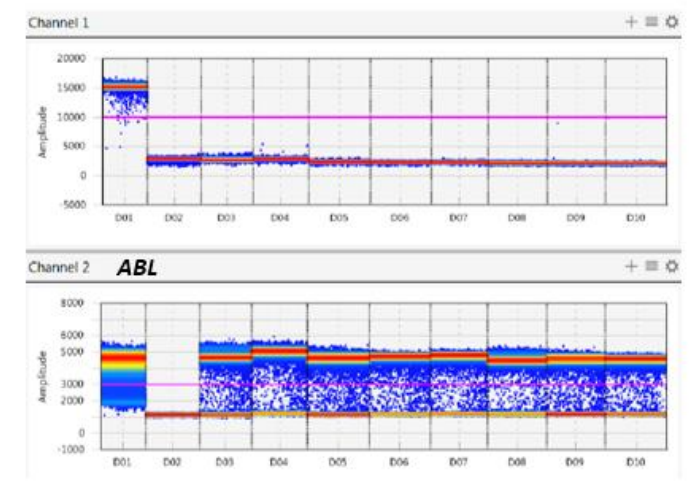
NPM1-Km



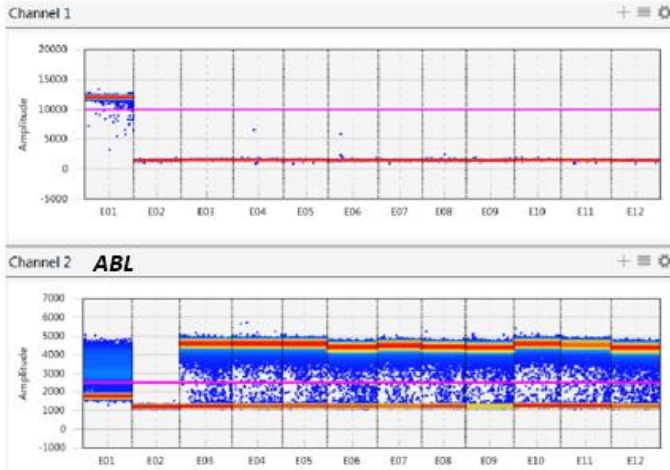
NPM1-Nm



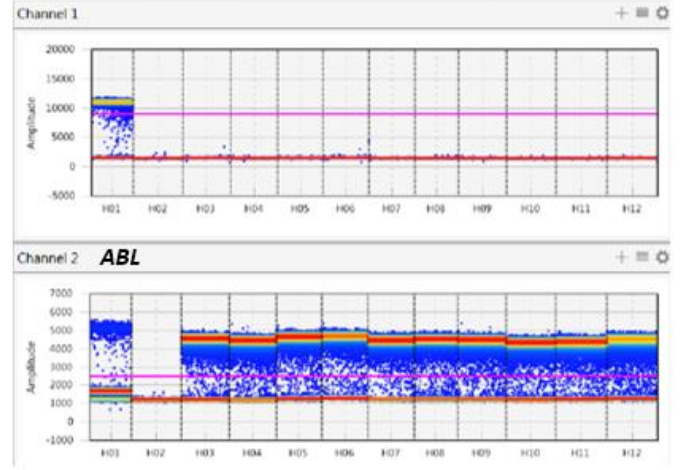
NPM1-Qm



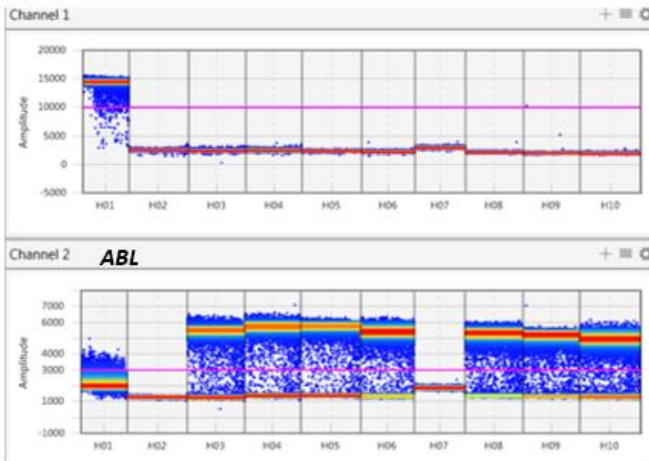
NPM1-Om



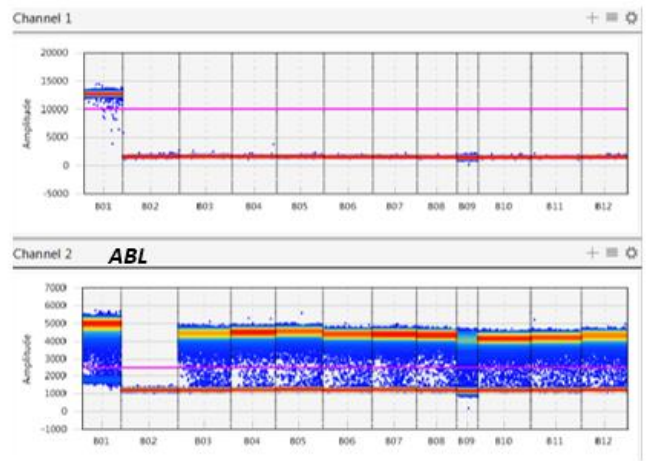
NPM1-S



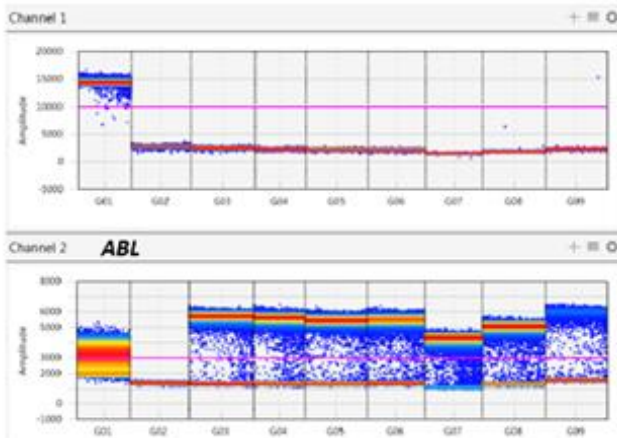
NPM1-insCAAG



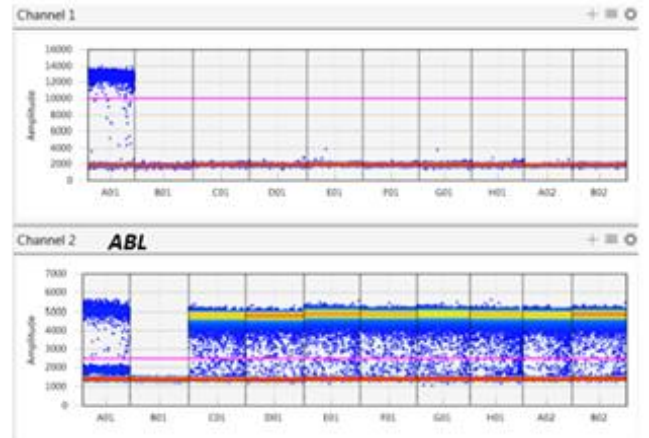
NPM1-insCCTC



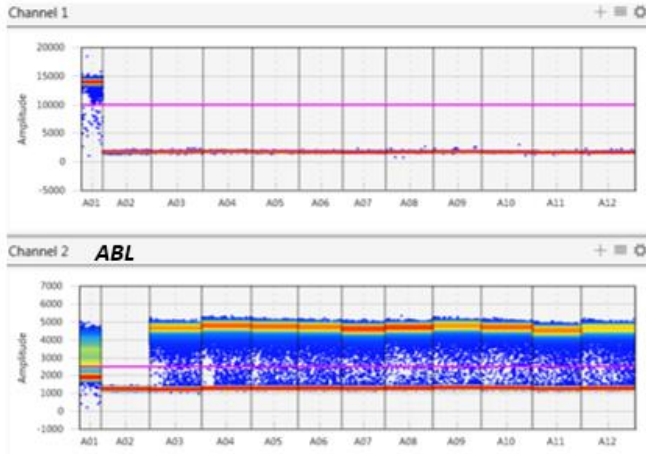
NPM1-insCCGA



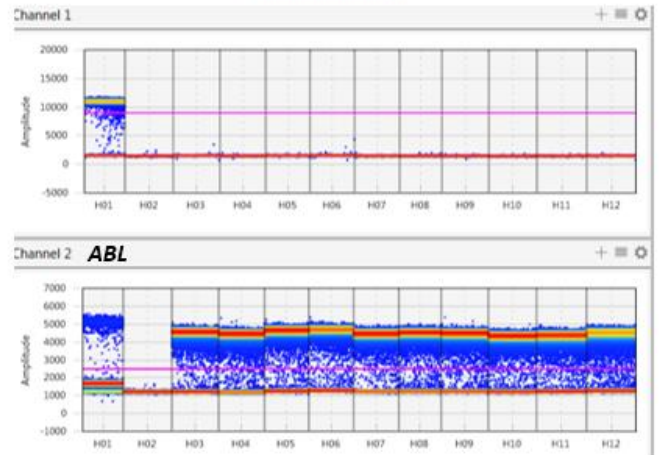
NPM1-insTCAA



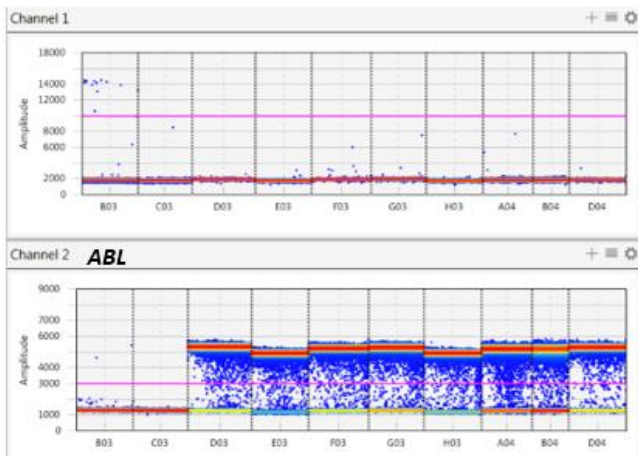
NPM1-insTTCG



NPM1-delGGAGG insCCTGGCCC



NPM1-DD5



Annexe 2 : Essai de répétabilité

	Nombre de copies <i>NPM1</i> / Nombre de copies d' <i>ABL</i>	
	ratio * 100	log(ratio)
Niv. 1	79,2%	-0,101
Niv. 1	82,0%	-0,086
Niv. 1	84,8%	-0,071
Niv. 1	85,6%	-0,068
Niv. 1	88,3%	-0,054
Niv. 1	89,4%	-0,049
Niv. 1	89,3%	-0,049
Niv. 1	80,8%	-0,093
Niv. 1	84,2%	-0,075
Niv. 1	85,1%	-0,070
Niv. 2	0,70%	-2,16
Niv. 2	0,83%	-2,08
Niv. 2	0,86%	-2,07
Niv. 2	0,85%	-2,07
Niv. 2	0,80%	-2,10
Niv. 2	0,78%	-2,11
Niv. 2	0,90%	-2,04
Niv. 2	0,82%	-2,08
Niv. 2	0,82%	-2,08
Niv. 2	0,85%	-2,07
Niv. 3	0,06%	-3,19
Niv. 3	0,08%	-3,10
Niv. 3	0,08%	-3,09
Niv. 3	0,14%	-2,86
Niv. 3	0,15%	-2,82
Niv. 3	0,11%	-2,96
Niv. 3	0,09%	-3,06
Niv. 3	0,06%	-3,19

Annexe 3 : Essai de fidélité intermédiaire

	Nombre de copies <i>NPM1</i> / Nombre de copies d' <i>ABL</i>	
	ratio * 100	log(ratio)
Niv. 1	90,5%	-0,043
Niv. 1	90,3%	-0,044
Niv. 1	91,0%	-0,041
Niv. 1	92,0%	-0,036
Niv. 1	90,1%	-0,045
Niv. 1	89,7%	-0,047
Niv. 1	90,4%	-0,044
Niv. 2	0,81%	-2,09
Niv. 2	0,78%	-2,11
Niv. 2	0,75%	-2,12
Niv. 2	0,86%	-2,06
Niv. 2	0,85%	-2,07
Niv. 2	0,77%	-2,11
Niv. 2	0,79%	-2,10
Niv. 3	0,09%	-3,06
Niv. 3	0,09%	-3,04
Niv. 3	0,06%	-3,24
Niv. 3	0,09%	-3,04
Niv. 3	0,09%	-3,03
Niv. 3	0,14%	-2,84

Annexe 4 : Comparaison de méthodes

	Nombre de copies NPM1 / Nombre de copies d'ABL				log(ddPCR)/log(qPCR)	log(ddPCR)-log(qPCR)
	ddPCR		qPCR			
	ratio*100 (%)	log(ratio*100)	ratio*100 (%)	log(ratio*100)		
Patient 1	0,91	-0,04	1,24	0,09	-0,46	-0,14
Patient 2	1640	3,21	3986	3,60	0,89	-0,39
Patient 3	0,03	-1,51	0,13	-0,88	1,72	-0,63
Patient 4	0,02	-1,63	0,03	-1,54	1,06	-0,10
Patient 5	0,04	-1,45	0,10	-1,01	1,44	-0,45
Patient 6	0,16	-0,81	0,08	-1,12	0,72	0,32
Patient 7	0,07	-1,15	0,30	-0,53	2,17	-0,62
Patient 8	0,03	-1,51	0,08	-1,09	1,39	-0,42
Patient 9	0,05	-1,32	0,19	-0,73	1,80	-0,59
Patient 10	0,28	-0,56	0,87	-0,06	9,22	-0,50
Patient 11	972	2,99	2507	3,40	0,88	-0,41
Patient 12	838	2,92	2937	3,47	0,84	-0,54
Patient 13	408	2,61	1300	3,11	0,84	-0,50
Patient 14	404	2,61	1087	3,04	0,86	-0,43
Patient 15	35,4	1,55	99,5	2,00	0,78	-0,45
Patient 16	6,42	0,81	20,7	1,32	0,61	-0,51
Patient 17	0,01	-1,97	0,09	-1,07	1,85	-0,91
Patient 18	0,00	-2,46	0,04	-1,38	1,79	-1,08
Patient 19	0,36	-0,45	1,26	0,10	-4,46	-0,55
Patient 20	0,49	-0,31	1,79	0,25	-1,24	-0,57
Patient 21	0,01	-2,00	0,06	-1,24	1,61	-0,76
Patient 22	4,27	0,63	13,6	1,13	0,56	-0,50
Patient 23	180	2,26	515	2,71	0,83	-0,46
Patient 24	21,1	1,32	60,8	1,78	0,74	-0,46
Patient 25	1,13	0,05	2,63	0,42	0,13	-0,37
Patient 26	8,10	0,91	20,0	1,30	0,70	-0,39
Patient 27	0,71	-0,15	1,73	0,24	-0,63	-0,39
Patient 28	0,005	-2,32	0,02	-1,65	1,40	-0,67

BIBLIOGRAPHIE

- [1] B. Falini *et al.*, « Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype », *N. Engl. J. Med.*, vol. 352, n° 3, p. 254-266, janv. 2005.
- [2] R. Rau et P. Brown, « Nucleophosmin (*NPM1*) mutations in adult and childhood acute myeloid leukaemia: towards definition of a new leukaemia entity », *Hematol. Oncol.*, vol. 27, n° 4, p. 171-181, déc. 2009.
- [3] T. Lapidot *et al.*, « A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice », *Nature*, vol. 367, n° 6464, p. 645-648, févr. 1994.
- [4] D. Bonnet et J. E. Dick, « Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell », *Nat. Med.*, vol. 3, n° 7, p. 730-737, juill. 1997.
- [5] L. L. de Figueiredo-Pontes *et al.*, « Determination of P-glycoprotein, MDR-related protein 1, breast cancer resistance protein, and lung-resistance protein expression in leukemic stem cells of acute myeloid leukemia », *Cytometry B Clin. Cytom.*, vol. 74B, n° 3, p. 163-168, mai 2008.
- [6] Cancer Genome Atlas Research Network *et al.*, « Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 368, n° 22, p. 2059-2074, 30 2013.
- [7] C. S. Grove et G. S. Vassiliou, « Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? », *Dis. Model. Mech.*, vol. 7, n° 8, p. 941-951, août 2014.
- [8] D. G. Gilliland, « Hematologic malignancies », *Curr. Opin. Hematol.*, vol. 8, n° 4, p. 189-191, juill. 2001.
- [9] J. P. Patel *et al.*, « Prognostic Relevance of Integrated Genetic Profiling in Acute Myeloid Leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 366, n° 12, p. 1079-1089, mars 2012.
- [10] L. Ding *et al.*, « Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing », *Nature*, vol. 481, n° 7382, p. 506-510, janv. 2012.
- [11] B. Y.-M. Yung et P.-K. Chan, « Identification and characterization of a hexameric form of nucleolar phosphoprotein B23 », *Biochim. Biophys. Acta BBA - Gen. Subj.*, vol. 925, n° 1, p. 74-82, juill. 1987.
- [12] Y. Liu *et al.*, « Expression of nucleophosmin/NPM1 correlates with migration and invasiveness of colon cancer cells », *J. Biomed. Sci.*, vol. 19, p. 53, mai 2012.
- [13] J. H. Chang et M. O. Olson, « Structure of the gene for rat nucleolar protein B23. », *The Journal of Biological Chemistry*, USA, p. 18227-18233, 25-oct-1990.
- [14] R. A. Borer, C. F. Lehner, H. M. Eppenberger, et E. A. Nigg, « Major nucleolar proteins shuttle between nucleus and cytoplasm », *Cell*, vol. 56, n° 3, p. 379-390, févr. 1989.
- [15] B. Falini *et al.*, « Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: molecular basis and clinical implications », *Leukemia*, vol. 23, n° 10, p. 1731-1743, oct. 2009.
- [16] S. Chen *et al.*, « Poor prognosis of nucleophosmin overexpression in solid tumors: a meta-analysis », *BMC Cancer*, vol. 18, n° 1, déc. 2018.

- [17] D. M. Mitrea *et al.*, « Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1 », *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, n° 12, p. 4466-4471, mars 2014.
- [18] J. E. Herrera, R. Savkur, et M. O. Olson, « The ribonuclease activity of nucleolar protein B23 », *Nucleic Acids Res.*, vol. 23, n° 19, p. 3974-3979, oct. 1995.
- [19] D. Wang, A. Baumann, A. Szebeni, et M. O. Olson, « The nucleic acid binding activity of nucleolar protein B23.1 resides in its carboxyl-terminal end », *J. Biol. Chem.*, vol. 269, n° 49, p. 30994-30998, déc. 1994.
- [20] A. Szebeni et M. O. Olson, « Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities », *Protein Sci. Publ. Protein Soc.*, vol. 8, n° 4, p. 905-912, avr. 1999.
- [21] M. Okuwaki, K. Matsumoto, M. Tsujimoto, et K. Nagata, « Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone », *FEBS Lett.*, vol. 506, n° 3, p. 272-276, oct. 2001.
- [22] V. Swaminathan, A. H. Kishore, K. K. Febitha, et T. K. Kundu, « Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 25, n° 17, p. 7534-7545, sept. 2005.
- [23] S. Grisendi *et al.*, « Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis », *Nature*, vol. 437, n° 7055, p. 147-153, sept. 2005.
- [24] M. Okuda *et al.*, « Nucleophosmin/B23 is a target of CDK2/cyclin E in centrosome duplication », *Cell*, vol. 103, n° 1, p. 127-140, sept. 2000.
- [25] M. Okuda, « The role of nucleophosmin in centrosome duplication », *Oncogene*, vol. 21, n° 40, p. 6170-6174, sept. 2002.
- [26] S. Y. Lee, J.-H. Park, S. Kim, E.-J. Park, Y. Yun, et J. Kwon, « A proteomics approach for the identification of nucleophosmin and heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C1/C2 as chromatin-binding proteins in response to DNA double-strand breaks », *Biochem. J.*, vol. 388, n° Pt 1, p. 7-15, mai 2005.
- [27] S. Grisendi, C. Mecucci, B. Falini, et P. P. Pandolfi, « Nucleophosmin and cancer », *Nat. Rev. Cancer*, vol. 6, n° 7, p. 493-505, juill. 2006.
- [28] E. Colombo, J.-C. Marine, D. Danovi, B. Falini, et P. G. Pelicci, « Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53 », *Nat. Cell Biol.*, vol. 4, n° 7, p. 529-533, juill. 2002.
- [29] R. Honda, H. Tanaka, et H. Yasuda, « Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53 », *FEBS Lett.*, vol. 420, n° 1, p. 25-27, déc. 1997.
- [30] S. Kurki *et al.*, « Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation », *Cancer Cell*, vol. 5, n° 5, p. 465-475, mai 2004.
- [31] J. D. Weber, L. J. Taylor, M. F. Roussel, C. J. Sherr, et D. Bar-Sagi, « Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53 », *Nat. Cell Biol.*, vol. 1, n° 1, p. 20-26, mai 1999.
- [32] T. Kamijo *et al.*, « Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF », *Cell*, vol. 91, n° 5, p. 649-659, nov. 1997.

- [33] D. Bertwistle, M. Sugimoto, et C. J. Sherr, « Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23 », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n° 3, p. 985-996, févr. 2004.
- [34] M.-L. Kuo, W. den Besten, D. Bertwistle, M. F. Roussel, et C. J. Sherr, « N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor », *Genes Dev.*, vol. 18, n° 15, p. 1862-1874, août 2004.
- [35] S. Moulin, S. Llanos, S.-H. Kim, et G. Peters, « Binding to nucleophosmin determines the localization of human and chicken ARF but not its impact on p53 », *Oncogene*, vol. 27, n° 17, p. 2382-2389, avr. 2008.
- [36] M. Sugimoto, M.-L. Kuo, M. F. Roussel, et C. J. Sherr, « Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing », *Mol. Cell*, vol. 11, n° 2, p. 415-424, févr. 2003.
- [37] S. N. Brady, Y. Yu, L. B. Maggi, et J. D. Weber, « ARF impedes NPM/B23 shuttling in an Mdm2-sensitive tumor suppressor pathway », *Mol. Cell. Biol.*, vol. 24, n° 21, p. 9327-9338, nov. 2004.
- [38] B. Falini, I. Nicoletti, M. F. Martelli, et C. Mecucci, « Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features », *Blood*, vol. 109, n° 3, p. 874-885, févr. 2007.
- [39] B. Falini *et al.*, « Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): is it a distinct entity? », *Blood*, vol. 117, n° 4, p. 1109-1120, janv. 2011.
- [40] D. Grimwade, A. Ivey, et B. J. P. Huntly, « Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance », *Blood*, vol. 127, n° 1, p. 29-41, janv. 2016.
- [41] R. G. W. Verhaak *et al.*, « Mutations in nucleophosmin (NPM1) in acute myeloid leukemia (AML): association with other gene abnormalities and previously established gene expression signatures and their favorable prognostic significance », *Blood*, vol. 106, n° 12, p. 3747-3754, déc. 2005.
- [42] G. Cazzaniga, « Nucleophosmin mutations in childhood acute myelogenous leukemia with normal karyotype », *Blood*, vol. 106, n° 4, p. 1419-1422, août 2005.
- [43] C. Thiede *et al.*, « Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML) », *Blood*, vol. 107, n° 10, p. 4011-4020, mai 2006.
- [44] C. Thiede, E. Creutzig, D. Reinhardt, G. Ehninger, et U. Creutzig, « Different types of NPM1 mutations in children and adults: evidence for an effect of patient age on the prevalence of the TCTG-tandem duplication in NPM1-exon 12 », *Leukemia*, vol. 21, n° 2, p. 366-367, févr. 2007.
- [45] B. Falini *et al.*, « NPM1 mutations and cytoplasmic nucleophosmin are mutually exclusive of recurrent genetic abnormalities: a comparative analysis of 2562 patients with acute myeloid leukemia », *Haematologica*, vol. 93, n° 3, p. 439-442, mars 2008.
- [46] F. Mosna, D. Capelli, et M. Gottardi, « Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia: Still a Work in Progress? », *J. Clin. Med.*, vol. 6, n° 6, juin 2017.
- [47] E. M. Heath, S. M. Chan, M. D. Minden, T. Murphy, L. I. Shlush, et A. D. Schimmer, « Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML », *Leukemia*, vol. 31, n° 4, p. 798-807, 2017.

- [48] Y. Yu *et al.*, « Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export », *Mol. Cell Biol.*, vol. 26, n° 10, p. 3798-3809, mai 2006.
- [49] W. Wang, A. Budhu, M. Forgues, et X. W. Wang, « Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication », *Nat. Cell Biol.*, vol. 7, n° 8, p. 823-830, août 2005.
- [50] Y. Nishimura, T. Ohkubo, Y. Furuichi, et H. Umekawa, « Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal Region of Protein B23.1 are Important for Its Nucleolar Localization », *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, vol. 66, n° 10, p. 2239-2242, janv. 2002.
- [51] N. Bolli *et al.*, « Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin leukemic mutants », *Cancer Res.*, vol. 67, n° 13, p. 6230-6237, juill. 2007.
- [52] B. Falini *et al.*, « Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+ AML », *Blood*, vol. 107, n° 11, p. 4514-4523, juin 2006.
- [53] C. G. Grummitt, F. M. Townsley, C. M. Johnson, A. J. Warren, et M. Bycroft, « Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia », *J. Biol. Chem.*, vol. 283, n° 34, p. 23326-23332, août 2008.
- [54] P. Brown *et al.*, « The incidence and clinical significance of nucleophosmin mutations in childhood AML », *Blood*, vol. 110, n° 3, p. 979-985, avr. 2007.
- [55] I. H. I. M. Hollink *et al.*, « Favorable prognostic impact of NPM1 gene mutations in childhood acute myeloid leukemia, with emphasis on cytogenetically normal AML », *Leukemia*, vol. 23, n° 2, p. 262-270, févr. 2009.
- [56] M. Braoudaki, C. Papathanassiou, K. Katsibardi, N. Tourkadoni, K. Karamolegou, et F. Tzortzatou-Stathopoulou, « The frequency of NPM1 mutations in childhood acute myeloid leukemia », *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol*, vol. 3, n° 1, déc. 2010.
- [57] W. den Besten, M.-L. Kuo, R. T. Williams, et C. J. Sherr, « Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein », *Cell Cycle Georget. Tex*, vol. 4, n° 11, p. 1593-1598, nov. 2005.
- [58] E. Colombo *et al.*, « Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 6, p. 3044-3050, mars 2006.
- [59] B. Falini *et al.*, « Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 108, n° 6, p. 1999-2005, sept. 2006.
- [60] P. Sportoletti *et al.*, « Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse », *Blood*, vol. 111, n° 7, p. 3859-3862, avr. 2008.
- [61] P. Bonetti, T. Davoli, C. Sironi, B. Amati, P. G. Pelicci, et E. Colombo, « Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma », *J. Cell Biol.*, vol. 182, n° 1, p. 19-26, juill. 2008.

- [62] R. Di Micco *et al.*, « Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication », *Nature*, vol. 444, n° 7119, p. 638-642, nov. 2006.
- [63] X. Gu *et al.*, « Leukemogenic nucleophosmin mutation disrupts the transcription factor hub that regulates granulomonocytic fates », *J. Clin. Invest.*, vol. 128, n° 10, p. 4260-4279, oct. 2018.
- [64] L. Brunetti *et al.*, « Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression », *Cancer Cell*, vol. 34, n° 3, p. 499-512.e9, sept. 2018.
- [65] J. L. Patel *et al.*, « Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia », *Leuk. Res.*, vol. 56, p. 7-12, 2017.
- [66] D. P. Steensma *et al.*, « Clonal hematopoiesis of indeterminate potential and its distinction from myelodysplastic syndromes », *Blood*, vol. 126, n° 1, p. 9-16, juill. 2015.
- [67] L. Busque *et al.*, « Recurrent somatic TET2 mutations in normal elderly individuals with clonal hematopoiesis », *Nat. Genet.*, vol. 44, n° 11, p. 1179-1181, nov. 2012.
- [68] A. Liso *et al.*, « In human genome, generation of a nuclear export signal through duplication appears unique to nucleophosmin (NPM1) mutations and is restricted to AML », *Leukemia*, vol. 22, n° 6, p. 1285-1289, juin 2008.
- [69] H. J. Olney et M. M. Le Beau, « Evaluation of recurring cytogenetic abnormalities in the treatment of myelodysplastic syndromes », *Leuk. Res.*, vol. 31, n° 4, p. 427-434, avr. 2007.
- [70] R. E. Gale *et al.*, « The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 111, n° 5, p. 2776-2784, mars 2008.
- [71] H. Döhner *et al.*, « Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel », *Blood*, vol. 129, n° 4, p. 424-447, 26 2017.
- [72] C. Haferlach *et al.*, « AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features », *Blood*, vol. 114, n° 14, p. 3024-3032, oct. 2009.
- [73] J. B. Micol *et al.*, « The role of cytogenetic abnormalities in acute myeloid leukemia with NPM1 mutations and no FLT3 internal tandem duplication », *Blood*, vol. 114, n° 20, p. 4601-4602, nov. 2009.
- [74] M. Pratcorona *et al.*, « Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: relevance to post-remission therapy », *Blood*, vol. 121, n° 14, p. 2734-2738, avr. 2013.
- [75] D. A. Arber *et al.*, « The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia », *Blood*, vol. 127, n° 20, p. 2391-2405, 19 2016.
- [76] A. Monnereau, *Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012 : étude à partir des registres des cancers du réseau Francim Partie 2 – Hémopathies malignes*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2013.

- [77] G. Gatta *et al.*, « Childhood cancer survival in Europe 1999-2007: results of EUROCare-5--a population-based study », *Lancet Oncol.*, vol. 15, n° 1, p. 35-47, janv. 2014.
- [78] F. Binder-Foucard, *Estimation nationale de l'incidence et de la mortalité par cancer en France entre 1980 et 2012: étude à partir des registres des cancers du réseau Francim Partie 1 - tumeurs solides*. Saint-Maurice: Institut de veille sanitaire, 2013.
- [79] H. Döhner *et al.*, « Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet », *Blood*, vol. 115, n° 3, p. 453-474, janv. 2010.
- [80] A. E. Perl, « The role of targeted therapy in the management of patients with AML », *Blood Adv.*, vol. 1, n° 24, p. 2281-2294, nov. 2017.
- [81] H. Döhner, D. J. Weisdorf, et C. D. Bloomfield, « Acute Myeloid Leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 373, n° 12, p. 1136-1152, sept. 2015.
- [82] U. Creutzig *et al.*, « Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in children and adolescents: recommendations from an international expert panel », *Blood*, vol. 120, n° 16, p. 3187-3205, oct. 2012.
- [83] J. M. Bennett *et al.*, « Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group », *Br. J. Haematol.*, vol. 33, n° 4, p. 451-458, août 1976.
- [84] E. Papaemmanuil *et al.*, « Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, n° 23, p. 2209-2221, juin 2016.
- [85] K. H. Metzeler *et al.*, « Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 128, n° 5, p. 686-698, 04 2016.
- [86] H. D. Klepin, A. V. Rao, et T. S. Pardee, « Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes in Older Adults », *J. Clin. Oncol.*, vol. 32, n° 24, p. 2541-2552, août 2014.
- [87] D. Grimwade *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*, vol. 92, n° 7, p. 2322-2333, oct. 1998.
- [88] G. J. Schuurhuis *et al.*, « Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party », *Blood*, vol. 131, n° 12, p. 1275-1291, mars 2018.
- [89] H. Dombret et C. Gardin, « An update of current treatments for adult acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 127, n° 1, p. 53-61, janv. 2016.
- [90] R. K. Hills *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.*, vol. 15, n° 9, p. 986-996, août 2014.
- [91] M. Levis, « Midostaurin approved for FLT3-mutated AML », *Blood*, vol. 129, n° 26, p. 3403-3406, 29 2017.

- [92] H. Dombret *et al.*, « International phase 3 study of azacitidine vs conventional care regimens in older patients with newly diagnosed AML with >30% blasts », *Blood*, vol. 126, n° 3, p. 291-299, juill. 2015.
- [93] H. M. Kantarjian *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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 30, n° 21, p. 2670-2677, juill. 2012.
- [94] E. Jourdan *et al.*, « Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 121, n° 12, p. 2213-2223, mars 2013.
- [95] A. Ivey *et al.*, « Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML », *N. Engl. J. Med.*, vol. 374, n° 5, p. 422-433, févr. 2016.
- [96] D. Grimwade *et al.*, « Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy », *J. Clin. Oncol. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, n° 22, p. 3650-3658, août 2009.
- [97] J. Gabert *et al.*, « Standardization and quality control studies of “real-time” quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program », *Leukemia*, vol. 17, n° 12, p. 2318-2357, déc. 2003.
- [98] D. Cilloni *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. Off. J. Am. Soc. Clin. Oncol.*, vol. 27, n° 31, p. 5195-5201, nov. 2009.
- [99] F. Buccisano *et al.*, « Prognostic and therapeutic implications of minimal residual disease detection in acute myeloid leukemia », *Blood*, vol. 119, n° 2, p. 332-341, janv. 2012.
- [100] P. Gorello *et al.*, « Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations », *Leukemia*, vol. 20, n° 6, p. 1103-1108, juin 2006.
- [101] D. Grimwade et S. D. Freeman, « Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? », *Blood*, vol. 124, n° 23, p. 3345-3355, nov. 2014.
- [102] K. Döhner *et al.*, « Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations », *Blood*, vol. 106, n° 12, p. 3740-3746, déc. 2005.
- [103] M. Hubmann *et al.*, « Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse », *Haematologica*, vol. 99, n° 8, p. 1317-1325, août 2014.
- [104] N. Shayegi *et al.*, « The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML », *Blood*, vol. 122, n° 1, p. 83-92, juill. 2013.

- [105] F. Forghieri, P. Comoli, R. Marasca, L. Potenza, et M. Luppi, « Minimal/Measurable Residual Disease Monitoring in NPM1-Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Clinical Viewpoint and Perspectives », *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, n° 11, nov. 2018.
- [106] G. Ossenkoppele et G. J. Schuurhuis, « MRD in AML: does it already guide therapy decision-making? », *Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program*, vol. 2016, n° 1, p. 356-365, déc. 2016.
- [107] J. Lambert *et al.*, « MRD assessed by *WT1* and *NPM1* transcript levels identifies distinct outcomes in AML patients and is influenced by gemtuzumab ozogamicin », *Oncotarget*, vol. 5, n° 15, août 2014.
- [108] W.-C. Chou *et al.*, « Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: the age-dependent incidences and the stability during disease evolution », *Cancer Res.*, vol. 66, n° 6, p. 3310-3316, mars 2006.
- [109] N. Patkar *et al.*, « Clinical impact of measurable residual disease monitoring by ultradeep next generation sequencing in NPM1 mutated acute myeloid leukemia », *Oncotarget*, vol. 9, n° 93, p. 36613-36624, nov. 2018.
- [110] M. Jongen-Lavrencic *et al.*, « Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia », *N. Engl. J. Med.*, vol. 378, n° 13, p. 1189-1199, mars 2018.
- [111] X. Thomas *et al.*, « Randomized Phase II Study of Clofarabine-Based Consolidation for Younger Adults With Acute Myeloid Leukemia in First Remission », *J. Clin. Oncol.*, vol. 35, n° 11, p. 1223-1230, avr. 2017.
- [112] M. Balsat *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.*, vol. 35, n° 2, p. 185-193, janv. 2017.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
MEMOIRE de DIPLOME D'ETUDES SPECIALISEES
(tenant lieu de Thèse en vue du Diplôme d'Etat de Docteur en Pharmacie)
Année Universitaire 2018/2019

Nom : LESIEUR
Prénom : Auriane

Titre du mémoire / thèse :

Suivi de la maladie résiduelle dans les Leucémies Aigües Myéloïdes par quantification des mutations rares de *NPM1* par PCR digitale

Mots-clés :

Leucémie aigüe myéloïde, Maladie résiduelle, *NPM1*, PCR digitale

Résumé :

Les mutations du gène *NPM1* constituent un facteur pronostique majeur des LAM à caryotype normal. En pratique clinique la quantification des transcrits *NPM1*-mutés est réalisée par RT-qPCR pour les formes A, B et D mais n'est pas réalisée pour les variants rares. L'objectif de cette étude est d'évaluer l'aptitude de la PCR digitale à quantifier les mutations rares de *NPM1* afin de valider cette technique pour une utilisation prospective.

La PCR digitale permet une quantification absolue de séquences d'acides nucléiques cibles par fractionnement du milieu réactionnel puis discrimination et dénombrement des fractions positives ou négatives. Les performances de la méthode sont évaluées sur la forme classique A. Nous avons analysé 16 types de variants rares de *NPM1*.

Les résultats sont encourageants. Le bruit de fond est négligeable, la technique est linéaire sur une gamme dynamique allant de 10^5 à 3,2 copies de *NPM1* et la limite de détection est au moins égale à 0.01%. La comparaison de méthodes a montré des résultats tout à fait concordants avec la méthode de référence. La PCR digitale est très souple d'utilisation et offre plusieurs avantages par rapport à la qPCR. Ici, la quantification de *NPM1*-muté par rapport au gène contrôle *ABL* est réalisée en multiplex sur ADNc. Cette quantification simultanée du transcrit muté et du gène *ABL* autorise un débit élevé et permet de s'affranchir des aléas de pipetage. La quantification directe sans extrapolation à partir d'une courbe de calibration offre également une meilleure précision. D'un point de vue clinique, la PCR digitale permet de suivre la maladie résiduelle chez des patients mutés *NPM1* là où *WT1* peut faire défaut.

La PCR digitale se présente comme une alternative à la qPCR pour le suivi des patients *NPM1*-mutés. Adaptée à la quantification des variants rares de *NPM1*, cette technique permettra de suivre l'évolution de la maladie résiduelle et de détecter précocement une rechute chez ces patients.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie POULAIN

Asseseurs : Monsieur le Docteur Olivier NIBOUREL
Monsieur le Docteur Nicolas DUPLOYEZ

Directeur de thèse : Monsieur le Professeur Claude PREUDHOMME