

**THESE
POUR LE DIPLOME D'ETAT
DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

**Soutenue publiquement le 14 décembre 2020
Par Mademoiselle Pauline Roynard**

**DÉVELOPPEMENT DU SUIVI DE LA MALADIE RÉSIDUELLE DANS
LES LEUCÉMIES AIGÜES MYELOÏDES : EXEMPLE DES FUSIONS
*NUP98-NSD1 ET NUP98-KDM5A EN PCR DIGITALE***

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Nicolas Duployez, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille

Assesneur : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille



Université de Lille

Président :	Jean-Christophe CAMART
Premier Vice-président :	Nicolas POSTEL
Vice-présidente formation :	Lynne FRANJIE
Vice-président recherche :	Lionel MONTAGNE
Vice-président relations internationales :	François-Olivier SEYS
Vice-président stratégie et prospective	Régis BORDET
Vice-présidente ressources	Georgette DAL
Directeur Général des Services :	Pierre-Marie ROBERT
Directrice Générale des Services Adjointe :	Marie-Dominique SAVINA

Faculté de Pharmacie

Doyen :	Bertrand DÉCAUDIN
Vice-doyen et Assesseur à la recherche :	Patricia MELNYK
Assesseur aux relations internationales :	Philippe CHAVATTE
Assesseur aux relations avec le monde professionnel :	Thomas MORGENROTH
Assesseur à la vie de la Faculté :	Claire PINÇON
Assesseur à la pédagogie :	Benjamin BERTIN
Responsable des Services :	Cyrille PORTA
Représentant étudiant :	Victoire LONG

Liste des Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	DEPREUX	Patrick	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie

Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie
M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire

Liste des Professeurs des Universités

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	CHAVATTE	Philippe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	COURTECUISSÉ	Régis	Sciences Végétales et Fongiques
M.	CUNY	Damien	Sciences Végétales et Fongiques
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique et application de RMN
Mme	DEPREZ	Rebecca	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DEPREZ	Benoît	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DUPONT	Frédéric	Sciences Végétales et Fongiques
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique
Mme	GAYOT	Anne	Pharmacotechnie industrielle
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire

Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie thérapeutique
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	ROMOND	Marie-Bénédicte	Bactériologie - Virologie
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie
M.	SERGHERAERT	Éric	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle
M.	WILLAND	Nicolas	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants

Liste des Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	BALDUYCK	Malika	Biochimie
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie

Liste des Maîtres de Conférences

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	AGOURIDAS	Laurence	Chimie thérapeutique
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique
Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire
Mme	BARTHELEMY	Christine	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Mme	BEHRA	Josette	Bactériologie - Virologie
M.	BELARBI	Karim-Ali	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie
M.	BOSC	Damien	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale
Mme	CHARTON	Julie	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	FLIPO	Marion	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique

Mme	GROSS	Barbara	Biochimie
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie
M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique
Mme	LEHMANN	Hélène	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert LESPAGNOL
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences Végétales et Fongiques
M.	MORGENROTH	Thomas	Législation et Déontologie pharmaceutique
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques
M.	PIVA	Frank	Biochimie
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique
M.	POURCET	Benoît	Biochimie
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / service innovation pédagogique
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie

Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	WELTI	Stéphane	Sciences Végétales et Fongiques
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques

Professeurs Certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

Professeur Associé - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
M.	DHANANI	Alban	Législation et Déontologie pharmaceutique

Maîtres de Conférences ASSOCIES - mi-temps

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	GILLOT	François	Législation et Déontologie pharmaceutique
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

AHU

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

ATER

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	GHARBI	Zied	Biomathématiques
Mme	FLÉAU	Charlotte	Médicaments et molécules pour agir sur les systèmes vivants
Mme	N'GUESSAN	Cécilia	Parasitologie - Biologie animale
M.	RUEZ	Richard	Hématologie
M.	SAIED	Tarak	Biophysique et Laboratoire d'application de RMN
Mme	VAN MAELE	Laurye	Immunologie

Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Laboratoire
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie Galénique et Hospitalière

Faculté de Pharmacie de Lille

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

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

Remerciements :

A la présidente du jury,

Madame le Professeur Stéphanie Poulain

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire d'hématologie
Centre Hospitalier et Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse et d'avoir accepté de juger ce travail. Je vous remercie pour l'intérêt que vous avez porté à cette thèse, soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

Au jury,

Monsieur le Professeur Claude Preudhomme

Professeur des Universités – Praticien Hospitalier
Chef de service du laboratoire d'hématologie
Centre Hospitalier et Universitaire de Lille

Vous me faites l'honneur de participer à ce jury et d'apporter votre regard expérimenté à ce travail, je vous en suis très reconnaissante. Je vous remercie par ailleurs, de votre disponibilité et de votre écoute pendant cet internat et des réponses que vous avez su m'apporter. Soyez assuré de ma reconnaissance et de mon profond respect.

A mon directeur de thèse,

Monsieur le Docteur Nicolas Duployez

Maître de Conférences des Universités – Praticien Hospitalier
Laboratoire d'hématologie
Centre Hospitalier et Universitaire de Lille

Merci Nicolas de m'avoir fait l'honneur d'accepter de m'encadrer pour ce travail de thèse. Merci de m'avoir fait bénéficier de tes conseils avisés et de m'avoir prodigué les remarques pertinentes dont j'avais besoin aux bons moments. Je souhaite aussi t'adresser un remerciement particulier pour le livre d'hématologie que tu as rédigé et qui m'a tant aidée dans la préparation du concours de l'internat. Sois assuré de ma gratitude et de mon profond respect.

A l'équipe d'hématologie du CHU de Lille,

Merci à tous ceux que j'ai pu côtoyer pendant ces deux stages d'hématologie au sein du laboratoire. Aux techniciens, un grand merci pour tout ce que vous m'avez appris, pour votre disponibilité et votre gentillesse, particulièrement réconfortante en fin de garde ; aux biologistes d'hémostase, pour ces longues heures de validation partagées toujours avec votre entière disponibilité, j'en garde de très bons souvenirs ; aux biologistes de cytologie et de biologie moléculaire, merci de m'avoir enseigné cette discipline passionnante qu'est l'onco-hématologie.

Aux équipes de cytogénétique,

A l'équipe du CHU de Caen, où j'ai fait mes premiers pas en caryotype et à celle du CHU de Lille, où j'ai actuellement la chance de travailler. Merci aux biologistes qui m'ont encouragée dans cette voie. Matthieu Decamp, merci pour ta bienveillance (je n'oublierai pas de notifier à Wikipédia que tu es le premier à m'avoir parlé de *NUP98*...). Agnès Daudignon, merci de m'apprendre autant en cytogénétique, de ponctuer mes journées de ta bonne humeur et des sketches dont tu as le secret. Pr Catherine Roche-Lestienne, merci infiniment pour l'accueil chaleureux et bienveillant que vous avez su me faire dans le laboratoire et merci de m'accompagner dans mes choix, surtout quand il m'arrive d'être un peu perdue (et je ne parle pas du chemin de la cantine !), je vous en suis sincèrement très reconnaissante. Un merci aussi à tous les techniciens de Jeanne de Flandre et à l'antenne du plateau des Puces : Caro, Alexis, Sébastien, et les autres, qui m'avez également beaucoup appris et qui continueront certainement de m'apprendre encore beaucoup !

Aux services de bactério-virologie de Lille et de biochimie du CH Lens,

Merci à l'ensemble des personnes, secrétaires, techniciens, biologistes, que j'ai pu rencontrer au cours de mes stages dans vos laboratoires, c'était pour moi le début de l'internat et je me rends compte que c'est toujours avec plaisir que je repense à ces quelques mois de formations, enrichissantes tant sur le plan technique qu'humain. J'ai une pensée particulière pour Jonathan et Alexis du CH de Lens, merci pour votre bonne humeur et vos valeurs, j'espère que nos chemins auront l'occasion de se recroiser prochainement (peut-être à Bollaert ?).

A l'équipe des tumeurs solides,

Merci à tous de m'avoir accueillie parmi vous au dernier semestre, même s'il n'a duré que cinq mois, ce fut une superbe expérience pendant laquelle j'ai beaucoup appris. Merci de m'avoir fait profiter de la bonne ambiance de votre service et aussi de vos nombreux petits déjeuners !

A mes copains, co-internes et amis,

Les Champions du Monde de « ? » (mais de quoi d'ailleurs ?), Marie et Thomas, Clémence et Alex', Pauline et Julien, Julie, Sophie et Baptiste, Léo et Camille, Thomass, Aurore, merci de montrer qu'il n'y a pas d'âge pour avoir 4 ans dans sa tête, et ce même à 30 ans passés... J'espère que nous continuerons longtemps de se voir quelles que soient les villégiatures de chacun (Thomas tu auras compris le sous-entendu avec Sarralbe j'espère). Et puis merci Léo, je ne me souviens plus vraiment comment mais je crois bien que tu es à l'origine de ces rencontres.

L'équipe de l'Internium (enfin...), Laurine, Elisabeth, Louis, Gatien entre autres, ce ne sera peut-être pas cette année qu'on aura l'occasion de porter ces doudounes argentées, mais à défaut on pourra se retrouver pour aller gratter des Jackpots à Leffrinckoucke (et peut-être rembourser nos dettes) !

Les internes, des plus anciens à la nouvelle génération, ces dernières années avec vous ont été plus que mémorables. Mention spéciale pour le groupe du « love » Alex, Nico, Mélissa, Sophie, Augustin, Daniela, Doriane, Adé, Max, Benjam « soyons gros mais heureux » résume pas mal de choses, merci pour ce sacré semestre. Quentin, Mael, Thibault, KJ, Kitty, Alex, Micka, Imelda, Valentin, Victoria et mon petit Geoffrey pour un semestre chargé en blagues de haute subtilité, c'était un plaisir de le partager avec vous. Le bureau de la Tolérance, Julie, Tristan, Claire, Elias et Charlotte, merci d'avoir fait de ces cinq derniers mois un enchainement grandiose de conversations gênantes, sessions karaoké et fous-rires à plein temps ; Elias, vivement l'album et Claire, la prochaine fois qu'on se retrouve en stage tu seras interne, je compte sur toi ! Merci à Claire Lecigne pour l'aide morale (et pour la remise au sport...), JD pour les conseils immobiliers avisés, Camille et Malo d'avoir fait que la Normandie et la Bretagne ne soient pas si loin que ça, et les autres internes que j'oublie de citer !

Merci à Thomas Buissart, simplement pour ta présence sur Lille, à toutes heures.

Merci à ceux avec qui j'ai commencé ces études en PACES, Laure, Dounia, Charlotte et Benjam', je crois que les Figolus n'ont jamais plus eu la même saveur après cette première année. Les pharmas, les années sont passées vite au rythme des Rallyes-Galas, Rallas-Galys, barbecues, sorties myco et pêches à pied entre autres, je vous remercie car sans vous je n'en serais certainement pas arrivée là.

Aux copains du lycée et à Adrien Rousseau, j'ai bon espoir que l'orga Rousseau-Roynard ne meurt jamais, pas plus que la Mégateam d'ailleurs ! Cassou, Rita et Jeanne, je ne pourrais oublier de mentionner les femmes géniales que vous êtes mais aussi, le meilleur investissement de nos vies, que la jupe de Shag nous accompagne encore de longues années !

A ma famille,

Aux membres de ma famille, oncles, tantes, cousins, cousines, et particulièrement mes grands-parents Grand-mère et Tatou, Papi et Mamie, je vous remercie de toute l'attention que vous avez portée à mes études, j'espère vous rendre fiers autant que possible.

Mes parents, Marie-Dominique et Gilles Roynard, merci pour tout ce que vous avez fait pour moi ; Papa pour la cuisine sur mesure, Maman pour le ravitaillement pré-concours, exemples parmi tant d'autres. Merci d'avoir toujours été présents et de m'apporter votre soutien à chaque étape, je sais que j'ai de la chance de vous avoir comme parents.

Mes frères, Martin, merci d'être toujours dispo pour ta « petite sœur » (conseils informatiques et logement à Paris inclus), et Gab', merci pour les séances de yoga à distance, les tartines sans sueur et tout le reste que je ne saurais citer. Je suis très fière de vous.

Aux plus fidèles compagnons de révisions qui soient, Sam, Greg et Élie.

Table des matières :

I.	INTRODUCTION.....	21
1.	Les leucémies aigües myéloïdes.....	21
a.	Définition	21
b.	Epidémiologie.....	21
c.	Physiopathologie	22
d.	Hiérarchie et hématopoïèse clonales	25
e.	Clinique	26
f.	Diagnostic biologique	27
g.	Examens complémentaires	28
h.	Classification OMS 2016	31
i.	Pronostic	32
j.	Traitements conventionnels	33
2.	Maladie résiduelle.....	34
a.	Définition	34
b.	Intérêt	34
c.	Marqueurs et applications	35
d.	Techniques de suivi de la maladie résiduelle.....	38
3.	<i>NUP98</i> dans les LAM	44
a.	Généralités sur le gène <i>NUP98</i>	44
b.	Réarrangements de <i>NUP98</i>	45
c.	Fréquence et pronostic des réarrangements de <i>NUP98</i>	46
d.	<i>NUP98-NSD1</i>	47
e.	<i>NUP98-KDM5A</i>	49
f.	Signature transcriptionnelle des LAM <i>NUP98</i> réarrangées	50
g.	CDK6 comme cible thérapeutique.....	51
II.	OBJECTIFS	53
III.	MATERIEL ET METHODES	55
1.	Analyse bibliographique	55
2.	Détection des réarrangements de <i>NUP98</i>	55
3.	Sélection des échantillons	57
4.	PCR digitale en émulsion : quantification des transcrits <i>NUP98-NSD1</i> et <i>NUP98-KDM5A</i>	58
a.	Design du système.....	58
b.	Mode opératoire	59
c.	Optimisation de la ddPCR : température optimale d'hybridation	60
d.	Optimisation de la ddPCR : dilution des sondes.....	61
e.	Détermination des seuils de positivité	62

f.	Loi de Poisson.....	63
g.	Validation technique	64
IV.	RESULTATS	67
1.	Patient 1 LAM avec réarrangement <i>NUP98-KDM5A</i>	67
2.	Patient 2 LAM avec réarrangement <i>NUP98-NSD1</i>	67
3.	Patient 3 LAM avec réarrangement <i>NUP98-KDM5A</i>	68
V.	DISCUSSION	69
VI.	CONCLUSION.....	73

Abbreviations :

ADN	Acide désoxyribonucléique
ADNc	Acide désoxyribonucléique circulant
ARA-C	Cytarabine ou cytosine arabinoside
ARN	Acide ribonucléique
ATO	Trioxyde d'arsenic
ATRA	Acide tout-trans-rétinoïque
CD	Cluster of differentiation
ChIP-Seq	Chromatin Immunoprecipitation Sequencing
CSH	Cellule souche hématopoïétique
CIVD	Coagulation intravasculaire disséminée
CMF	Cytométrie en flux
DNase	Désoxyribonucléase
ELN	European Leukemia Net
FAB	French American British
FAM	6-Carboxyfluorescein
EDTA	Éthylènediaminetétraacétique
FISH	Fluorescence in situ hybridization
HEX	Hexachlorofluorescein
HR	Hazard ratio
IC_{95%}	Intervalle de confiance à 95%
IHC	Immunohistochimie
IV	Intra-veineux
LA	Leucémie aigüe
LAIP	Leukemia-associated aberrant immunophenotypes
LAL	Leucémie aigüe lymphoblastique
LAM	Leucémie aigüe myéloïde
LAP	Leucémie aigüe promyélocytaire
LD-RTPCR	Reverse transcription multiplex ligation-dependant probe amplification
MGG	May-Grünwald Giemsa
MPAL	Mixed phenotype acute leukemia
MPO	Myéloperoxydase
MRC	Medical Research Council
MRD	Minimal/mesurable residual disease
NGS	Next generation sequencing
NLS	Nuclear localization sequence

NUP214	Nucleoporin 214
NUP98	Nucleoporin 98
OMS	Organisation Mondiale de la Santé
P	P-value
PCR	Polymerase chain reaction
RNA-Seq	RNA Sequencing
RT-MLPA	Reverse transcription multiplex ligation-dependant probe amplification
RT-PCR	Reverse transcriptase polymerase chain reaction
SMD	Syndrome myélodysplasique
VAF	Variation de fréquence allélique
2-HG	2-hydroxyglutarate

I. INTRODUCTION

1. Les leucémies aigües myéloïdes

a. Définition

Les leucémies aigües désignent un ensemble de pathologies caractérisées par une prolifération clonale anormale de cellules immatures bloquées dans leur différenciation, les blastes.

L'insuffisance médullaire secondaire à l'envahissement du tissu hématopoïétique normal par les blastes et à l'échec de l'hématopoïèse physiologique contribuent à l'installation rapide de cytopénies périphériques responsables des symptômes cliniques de la maladie.

b. Epidémiologie

La leucémie aigüe est une pathologie grave, d'évolution rapide et létale sans traitement. Les leucémies aigües se divisent en deux grandes catégories : les leucémies aigües lymphoblastiques (LAL) et les leucémies aigües myéloïdes (LAM).

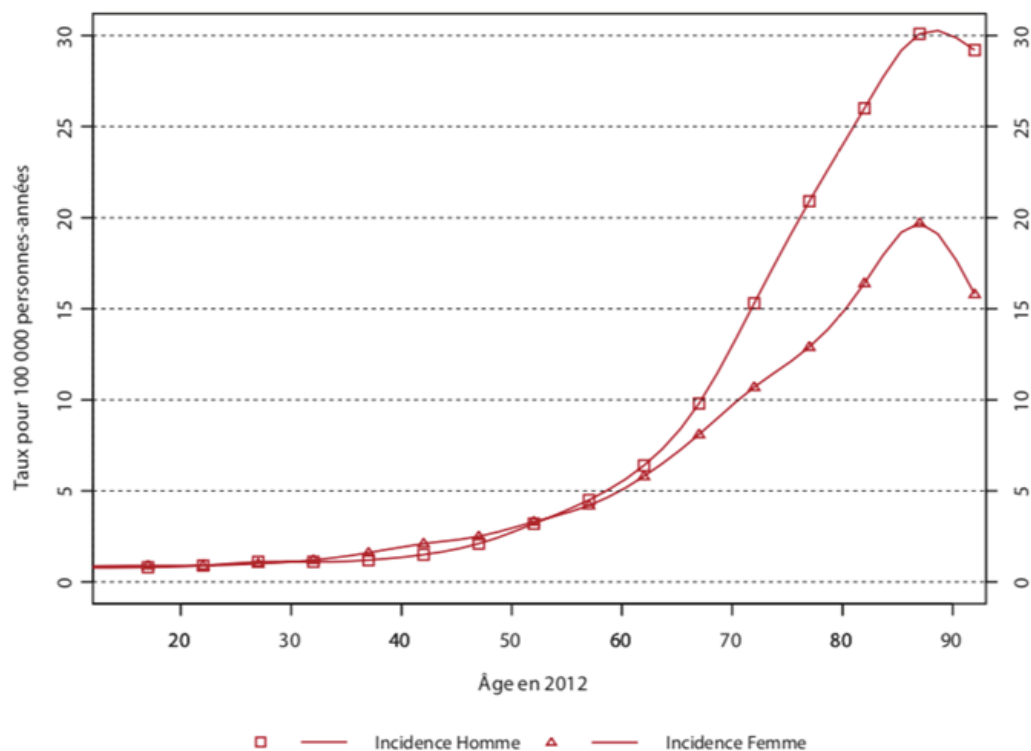


Figure 1 : Incidence des leucémies aigües myéloïdes par âge chez les hommes et les femmes en France en 2012 (1).

Les LAL sont les plus fréquentes des leucémies de l'enfant (âge de survenue essentiellement entre 2 et 15 ans) tandis qu'elles sont rares chez l'adulte. Les LAM sont plus fréquentes chez l'adulte et rares chez l'enfant (elles surviennent alors essentiellement avant 2 ans ou après 15 ans). Leur incidence augmente avec l'âge. La médiane d'âge au diagnostic des LAM en France est de 71 ans avec un *sex ratio* Homme/Femme de 1,1 avant 60 ans, puis en défaveur des hommes pour les âges plus avancés (Figure 1) (1).

Certains facteurs prédisposent aux leucémies aigües, parmi lesquels :

- des facteurs environnementaux : expositions au benzène et à ses dérivés, aux hydrocarbures aromatiques, au tabac et aux radiations ionisantes
- des facteurs génétiques dont le syndrome de Down (trisomie 21), le syndrome de Li Fraumeni (déficit de P53), l'anémie de Blackfan-Diamond, la neurofibromatose de type I et l'ataxie-télangiectasie
- des traitements antérieurs par chimiothérapies anticancéreuses notamment par les agents alkylants et les inhibiteurs de topoisomérase II
- des maladies hématologiques : syndrome myélodysplasique, syndrome myéloprolifératif dont la leucémie myéloïde chronique.

c. Physiopathologie

La leucémie aigüe est le résultat d'une série d'altérations génomiques affectant à la fois la prolifération, la survie et la différenciation cellulaire. En 2002, Gilliland *et al.* décrivent une hypothèse de leucémogénèse qu'ils nomment le « 2-hit model » (2). Ils évoquent deux classes de mutations nécessaires au processus menant à la leucémie aigüe.

Les mutations de classe I, telles que la duplication en tandem (ITD) du gène *FLT3*, confèrent un avantage de prolifération et de survie à la cellule. Sur les modèles murins, ces mutations ne suffisent pas à induire une leucémie mais engendrent un phénotype prolifératif. De plus, ces mutations (*FLT3*-ITD et *NRAS* par exemple) ne coexistent pas au sein du même clone, elles sont habituellement mutuellement exclusives les unes des autres.

Les mutations de classe II ont pour caractéristique commune d'entraîner un blocage de maturation des précurseurs hématopoïétiques. Elles impliquent des facteurs de transcription, par exemple le Core binding factor (CBF) qui est un facteur de transcription clé de la différenciation est dérégulé par les protéines de fusions *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11*. Comme les mutations de classe I, les mutations de classe II sont connues pour être mutuellement exclusives. Elles sont insuffisantes pour, à elles seules, initier une leucémie aigüe dans les modèles murins mais entraînent des anomalies proches d'un syndrome myélodysplasique qui peut évoluer secondairement vers une LAM après exposition à des mutagènes (3).

Depuis, d'autres altérations coopératrices ont été décrites. Actuellement, ces altérations sont schématiquement séparées en 8 catégories (Figure 2) (4).

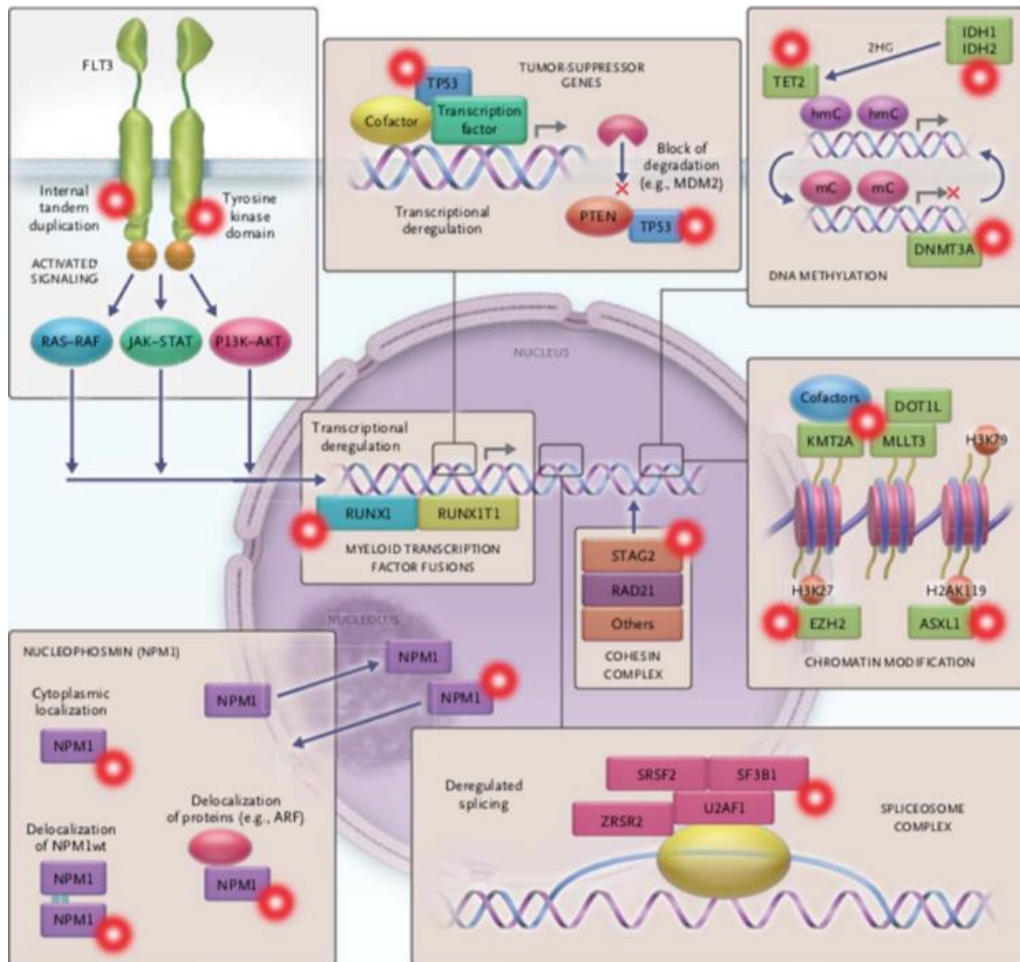


Figure 2 : Catégories fonctionnelles d'anomalies impliquées dans les LAM, d'après Döhner *et al.* (4)

Les mutations atteignant les voies de **signalisation cellulaire** sont présentes dans environ 59% des LAM et affectent des protéines intracellulaires (protéines RAS) ou leurs régulateurs (NF1) ainsi que des récepteurs transmembranaires tels que FLT3 ou KIT (5). Le gène *FLT3*, situé en 13q12.2, code pour un récepteur à activité tyrosine kinase. Il est muté dans environ 20% des LAM de l'adulte (6). Sa mutation entraîne une activation constitutive des voies de signalisation RAS-RAF, JAK-STAT et PI3K-AKT conférant ainsi à la cellule un avantage prolifératif. Les mutations de *FLT3* sont de deux types : *FLT3*-ITD correspondant à la duplication en tandem d'une région (sans décalage du cadre de lecture) dans la séquence codante pour le domaine juxta-membranaire du récepteur, associée à un mauvais pronostic lorsqu'elle est retrouvée à une haute fréquence allélique, et *FLT3*-TKD mutation ponctuelle affectant surtout les codons 835 ou 836 impliqués dans le domaine tyrosine kinase de la protéine avec un impact pronostic controversé.

Le gène *NPM1* codant pour la **nucléophosmine** est muté dans 27% des LAM (5). La forme wild-type de NPM1 assure habituellement un rôle dans le transport nucléo-cytoplasmique d'ARN et participe à la genèse des ribosomes (7), tandis que les formes mutées sont délocalisées vers le cytoplasme. De bon pronostic lorsqu'elles ne sont pas associées à la mutation *FLT3*-ITD, les LAM à mutation de *NPM1* sont identifiées comme une catégorie à part entière dans la dernière classification de l'OMS.

Des mutations dans les gènes régulant la **méthylation de l'ADN** sont recensées dans 44% des LAM (5). Les mutations d'*IDH1* et *IDH2*, codant respectivement pour deux isoformes d'une isocitrate déshydrogénase, engendrent une hyperméthylation de l'ADN via le 2-HG, un oncométabolite synthétisé suite au changement de fonction des protéines. Les mutations des gènes *DNMT3A* et *TET2* entraînent une perte de fonction de leurs protéines, DNA méthyl-transférase et méthylcytosine dioxygénase respectivement, impliquées dans la méthylation et la déméthylation des cytosines. Ces mutations ne semblent pas constituées à elles seules un driver oncogénique mais semblent plutôt participer à un stade pré-leucémique (3). Elles peuvent être retrouvées dans le sang d'individus sains avec une fréquence qui augmente avec l'âge (hématopoïèse clonale liée à l'âge).

Les histones subissent des **modifications post-traductionnelles** nécessaires à leur organisation structurale qui influent sur la compaction de l'ADN. Des mutations dans des gènes régulateurs de ces modifications sont décrites dans 30% des LAM. Parmi elles, les mutations des gènes *EZH2* et *ASXL1* qui codent pour des protéines participant au polycomb repressive complex 2. Elles entraînent un défaut de méthylation du résidu K27 de l'histone H3 (8). Les réarrangements de *KMT2A* (anciennement *MLL*) entraînent la perte du domaine H3K4-méthyltransférase recrutant alors DOT1L, l'histone-méthyltransférase H3K79 (9).

Les protéines du **complexe de la cohésine** contribuent à l'organisation structurale du génome, elles forment un anneau qui permet le maintien des chromatides sœurs. Ces protéines assurent un rôle essentiel dans la réplication, la réparation de l'ADN et la ségrégation des chromosomes à la mitose (10). En pathologie, elles interviennent également dans les modifications post-traductionnelles des histones. Des mutations dans les gènes de ce complexe (*SMC1*, *SMC3*, *RAD21*, *STAG1/2*) sont rapportées dans 13% des LAM (5). Elles ne sont pas reliées à un impact pronostic dans les LAM (11) et sont aussi décrites dans les syndromes myélodysplasiques et d'autres hémopathies (12). Elles sont généralement mutuellement exclusives (12). La dérégulation de ce complexe entraîne une modification de la transcription des gènes de l'hématopoïèse affectant alors l'auto-renouvellement et la différenciation des cellules (10,13).

Le **complexe du spliceosome** a pour fonction l'épissage des ARN pré-messagers dans le noyau, il fait notamment intervenir différentes protéines parmi lesquelles SRSF2, SF3B1, ZRSR2 et U2AF1. Les mutations dans ces gènes provoquent une dérégulation de l'épissage des ARN pré-messagers, affectant notamment certains gènes clés de l'hématopoïèse. Ce sont les mutations les plus communes des syndromes myélodysplasiques (14) et sont décrites dans 14% des LAM (5).

Les mutations (*CEBPA*, *RUNX1*) et les fusions (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, ...) touchant des **facteurs de transcriptions** sont décrites pour 18% des cas (5). Elles sont habituellement mutuellement exclusives les unes des autres. Les mutations de *CEBPA*, gène codant pour la protéine CCAAT/enhancer binding protein alpha, sont présentes dans environ 10% des LAM (6). *CEBPA* est un

facteur de transcription myéloïde dont les mutations bi-alléliques dans les LAM représentent un groupe de bon pronostic. Les deux mutations qui s'associent sont généralement : une première mutation dans le domaine N-terminal de la protéine, siège des domaines d'activation de la transcription et de l'activité anti-mitotique, ayant pour conséquence la synthèse d'une protéine tronquée inefficace, et une deuxième mutation dans le domaine C-terminal, région impliquée dans la dimérisation et la liaison à l'ADN, se caractérisant par une insertion ou délétion dans le cadre de lecture. Les mutations de *RUNX1*, gène codant pour la sous-unité alpha du Core Binding Factor, sont associées à un groupe de mauvais pronostic. Elles sont décrites dans les LAM des sujets jeunes et sont aussi retrouvées dans les syndromes myélodysplasiques (environ 10%) ce qui suggère que les mutations de *RUNX1* participent à la genèse de LAM secondaires via un clone pré-leucémique (6). Les fusions de gènes issues généralement de translocations chromosomiques sont parfois récurrentes (*PML-RARA*, *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*) et parfois plus rares. Elles sont souvent considérées comme des drivers oncogéniques et des mutations de classe II, bien que le mécanisme qui concourt à la leucémogénèse ne soit pas toujours précisément élucidé.

Des mutations sur les **gènes suppresseurs de tumeurs** sont décrites dans 16% des cas (5). Parmi ces gènes, *TP53*, situé sur le bras court du chromosome 17 (17p), est fréquemment altéré dans les pathologies tumorales incluant les LAM. La protéine TP53 joue un rôle dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence et le métabolisme. Les mutations de *TP53* entraînent une perte de fonction de la protéine et elles sont souvent associées à la perte du deuxième allèle ou à une perte d'hétérozygotie (15). Elles engendrent une résistance au traitement ayant pour conséquence de faibles taux de survie globale et de survie sans maladies (15).

d. Hiérarchie et hématopoïèse clonales

L'analyse complète du génome au diagnostic des LAM a révélé leur architecture complexe et dynamique impliquant l'acquisition séquentielle d'anomalies et l'existence de plusieurs clones et sous-clones (Figure 3). Les événements précoces impliquent essentiellement des gènes du contrôle épigénétique (ex : mutations de *DNMT3A*) ou de l'épissage des ARN et définissent des états pré-leucémiques, fréquemment identifiés dans la population vieillissante (16). Elles persistent d'ailleurs le plus souvent chez les patients en rémission complète de leur maladie. Ces anomalies sont insuffisantes pour induire une leucémie mais nécessitent l'apparition d'anomalies secondaires qui définissent le type de leucémie (ex : mutations de *NPM1*). Enfin, le diagnostic de LAM s'accompagne le plus souvent d'un ou plusieurs événements tardifs (ex : mutations de *FLT3*). Ces derniers définissent le plus souvent de multiples sous-clones évoluant indépendamment. Il n'est d'ailleurs pas rare de voir disparaître ou émerger un sous-clone lors d'une rechute ou sous la pression de sélection des traitements (16).

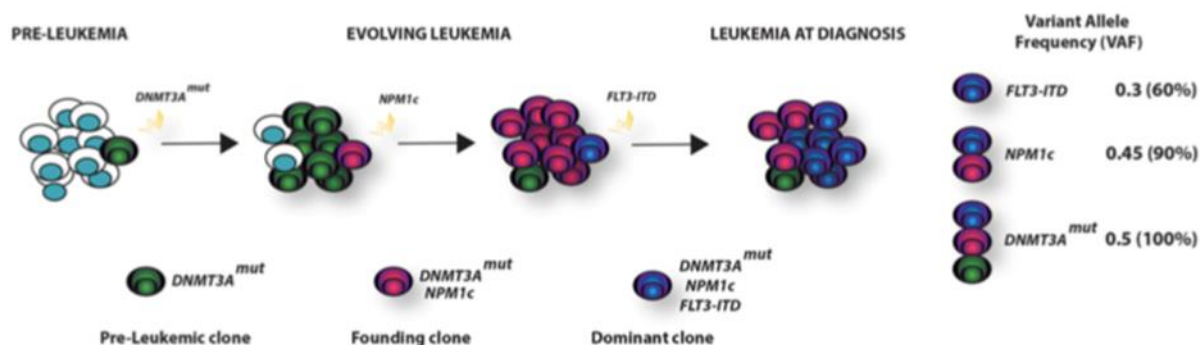


Figure 3 : Exemple d'évolution et hiérarchie clonales des LAM, d'après Grimwade *et al.* (6)

La mutation de *DNMT3A* est l'événement le plus précoce, et bien que facilitant l'expansion clonale, elle se produit avant le développement de la maladie. Par la suite, la mutation *NPM1* apparaît comme la mutation définissant la maladie dans le clone fondateur, avec l'acquisition d'une mutation *FLT3-ITD* tardive dans un clone hyperprolifératif lors de l'expansion de la leucémie et qui devient dominante au moment du diagnostic. La quantification de la fréquence des allèles variants (VAF) de chaque mutation permet de démontrer l'acquisition temporelle des mutations et la hiérarchie clonale de la leucémie. Pour simplifier, un schéma d'évolution linéaire est montré ici, bien que l'on puisse généralement démontrer une évolution en ramification.

e. Clinique

La clinique d'une leucémie aigüe est généralement peu spécifique. La pathologie peut se révéler par une altération de l'état général, une pâleur, un essoufflement à l'effort (syndrome anémique), mais également par de la fièvre, faisant rechercher un point d'appel (évocateur d'un syndrome infectieux), ou encore des troubles de la coagulation, manifestations cutanées principalement à type d'ecchymoses (syndrome hémorragique). Ces symptômes, peu spécifiques, ne sont pas constamment présents et nécessitent la réalisation d'un bilan sanguin.

L'hémogramme retrouvera tantôt une pancytopénie (anémie, thrombopénie et neutropénie) tantôt des cytopénies variables accompagnée(s) ou non d'une blastose sanguine.

Certaines présentations particulières sont décrites :

- Des leucémides (présentations cutanées) ou l'hypertrophie gingivale sont décrites dans les cas de leucémies aigües à composante monocyttaire.
- L'envahissement neuro-méningé, la présence d'adénopathie et de splénomégalie ou une hépatomégalie, les douleurs osseuses et les atteintes testiculaires sont des signes possiblement retrouvés bien qu'ils soient plus souvent décrits dans les leucémies aigües lymphoblastiques que dans les leucémies aigües myéloïdes.
- Une forte hyperleucocytose (parfois majeure >100G/L), qui constitue un risque de syndrome de leucostase, et le syndrome de coagulation intravasculaire disséminée (CIVD), qui est préférentiellement associé à certaines formes de LAM (LA promyélocytaire), représentent des situations d'urgences diagnostiques et thérapeutiques.

f. Diagnostic biologique

▪ Myélogramme

Le prélèvement de moelle osseuse est indispensable au diagnostic. Ce geste est réalisé au niveau sternal, iliaque ou tibial (chez le nouveau-né), sièges de l'hématopoïèse. La première goutte du prélèvement, la plus concentrée, est étalée sur des lames de verre immédiatement après la ponction, puis plusieurs millilitres sont recueillis dans des tubes anticoagulés pour les analyses d'immunophénotypage, de cytogénétique et de biologie moléculaire.

▪ Cytologie

Après coloration May-Grünwald Giemsa (MGG) des frottis médullaires, l'étude microscopique permet une analyse qualitative et quantitative des cellules observées et l'appréciation de la richesse médullaire. Elle sera généralement complétée d'une cytochimie à la recherche d'enzymes spécifiques des cellules myéloïdes (myélopéroxydase et éventuellement estérases). Par définition, le diagnostic de leucémie aigüe sera retenu pour un excès de blastes médullaires supérieur ou égal à 20%. La classification franco-américano-britannique (FAB) des leucémies aigües permet de distinguer 8 types de leucémies aiguës myéloïdes (Tableau 1). A noter que dans cette classification, le seuil de blastes était fixé à 30%. Il est aujourd'hui abaissé à 20% conformément aux recommandations de l'OMS. Ce taux n'est pas indispensable lorsque les anomalies génétiques suivantes sont retrouvées : l'inversion du chromosome 16 ou la translocation t(16;16) (fusion *CBFB-MYH11*), la translocation t(8;21) (fusion *RUNX1-RUNX1T1*) et la translocation t(15;17) (fusion *PML-RARA*) (17). L'aspect des blastes au frottis médullaire pourra permettre d'orienter le diagnostic vers une origine lymphoïde ou vers une origine myéloïde. Les blastes lymphoïdes sont généralement indifférenciés et ne contiennent pas de granulations ; *a contrario*, la présence de granulations cytoplasmiques est évocatrice de blastes myéloïdes, tandis que la découverte d'un ou plusieurs corps d'Auer affirmera l'origine myéloïde de la population blastique. L'existence d'anomalies morphologiques dans les autres précurseurs peut évoquer un syndrome myélodysplasique préexistant. Certaines anomalies cytologiques sont évocatrices de réarrangements moléculaires : l'inclusion « cup-like » dans le noyau des blastes fera penser aux mutations de *NPM1* et/ou de *FLT3-ITD*, un corps d'Auer piqué dans le noyau « en boussole » associé à un cytoplasme sable-rosé et un renforcement basophile périphérique évoquera la translocation t(8;21) et l'implication de *RUNX1-RUNX1T1*, la présence d'éosinophiles à granulations anormales évoquera une inv(16)/t(16;16), la présence de micromégacaryocytes en amas pourra être observée dans les cas des inversions du chromosome 3 ou de translocations t(3;3), par exemple. L'identification en particulier de la LAM3 (leucémie aigüe promyélocytaire) pathognomonique de la t(15;17) est essentielle : c'est une urgence vitale en raison d'un risque élevé de CIVD. Elle est toutefois hautement curable grâce à un traitement spécifique.

Tableau 1 : Classification FAB (French-American-British) des LAM (établie en 1976, révisée en 1985(18,19)).

LAM : leucémie aigüe myéloïde ; MPO : myéloperoxydase ; NaF : fluorure de sodium

Entités	Noms	Descriptions
LAM0	LAM avec différenciation minime	≥ 90% de blastes médullaires Aspect indifférencié des blastes MPO négative
LAM1	LAM sans maturation	≥ 90% de blastes médullaires Possibles granulations dans les blastes MPO positive
LAM2	LAM avec maturation	20 à 90% de blastes médullaires Granulations et corps d'Auer fréquents dans les blastes Différenciation granulocytaire ≥ 10 % et série monocyttaire < 20% des cellules médullaires MPO positive
LAM3 LAM3v	LA promyélocytaire	% variable de blastes, diagnostic posé si présence de la fusion <i>PML-RARA</i> LAM3 « classique » (leucopénique) : aspect de promyélocytes anormaux : noyau replié, bilobé, nombreuses granulations cytoplasmiques, corps d'Auer en fagots LAM 3 variante (souvent hyperleucocytaire) : blastes hypogranuleux, noyau bilobé en « aile de papillon » MPO fortement positive
LAM4 LAM4éo	LA myélomonocytaire	≥ 20% de blastes médullaires (promonocytes inclus) Série monocyttaire ≥ 20% des cellules médullaires ou monocytose sanguine ≥ 5 G/L LAM4 à éosinophiles : fusion <i>CBFB-MYH11</i> quel que soit le % de blastes : excès d'éosinophiles dystrophiques médullaires
LAM5a LAM5b	LA monoblastique	Lignée monocyttaire ≥ 80% des cellules leucémiques LAM5a : principalement des monoblastes LAM5b : principalement des promonocytes et monocytes MPO négative ou positive faible Estérases non spécifiques inhibées par le NaF
LAM6	Erythroleucémie	Leucémie érythroïde (n'existe plus dans la classification OMS 2016) : érythroblastes ≥ 50% des cellules médullaires, myéloblastes ≥ 20% des cellules non érythroïdes médullaires, dysérythropoïèse fréquente, MPO positive Leucémie érythroïde pure : ≥ 80% de précurseurs érythroblastiques, MPO négative
LAM7	LA mégacaryocytaire	≥ 20% des cellules médullaires dont au moins la moitié sont des mégacaryoblastes Myélofibrose

g. Examens complémentaires

▪ Immunophénotypage des blastes

La cytométrie en flux (CMF) caractérise les cellules suivant leur taille, leur contenu et les antigènes présents à leur surface. La technique utilise la diffraction et la déviation d'un rayon lumineux sur la cellule et simultanément une analyse fluorimétrique des antigènes. Les marqueurs de la population

blastique sont analysés afin de classer la leucémie. L'intérêt de la CMF pour le diagnostic des LAM réside essentiellement dans l'identification de marqueurs myéloïdes pour les leucémies aiguës à cytologie indifférenciée (LAM0, LAM6, LAM7 de la classification FAB) ou les rares leucémies aiguës de lignée ambiguë (MPAL). Le Tableau 2 reprend le panel d'anticorps recommandé par l'European Leukemia Net (ELN) au diagnostic d'une LAM (17). La cytométrie identifie également les marqueurs antigéniques aberrants du clone leucémique (LAIP) utiles pour le suivi de la maladie résiduelle.

Tableau 2 : Expression des marqueurs de surfaces cellulaires et cytoplasmiques pour le diagnostic de la LAM et de leucémie aiguë de lignée ambiguë (MPAL) (17).

Diagnostic de LAM	
Précurseurs	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Marqueurs granulocytaires	CD65, MPO cytoplasmique
Marqueurs monocytaires	CD14, CD36, CD64
Marqueurs mégacaryocytaires	CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa)
Marqueurs érythroïdes	CD235a (glycophorine A), CD36
Diagnostic de MPAL	
Lignée myéloïde	MPO (CMF, IHC ou cytochimie) ou différenciation monocyttaire (au moins deux parmi les suivants : estérase non spécifique en cytochimie, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
Lignée T	CD3 cytoplasmique fort (avec anticorps anti-chaîne ϵ) ou CD3 de surface
Lignée B	CD19 fort avec au moins un des marqueurs suivants exprimé(s) fortement : CD79a cytoplasmique, cCD22, ou CD10 Ou CD19 faible avec au moins deux des marqueurs suivants exprimés fortement : CD79a, cCD22, ou CD10

- Cytogénétique conventionnelle et moléculaire

La réalisation du caryotype au diagnostic de LAM permet de mettre en évidence des anomalies récurrentes ayant un intérêt diagnostique, thérapeutique, ou pronostique.

Le caryotype correspond au classement des chromosomes lorsque la cellule se trouve en mitose, plus précisément au moment de la métaphase. Après un minimum de 24h de culture cellulaire, l'échantillon est traité par colchicine (poison mitotique) afin de bloquer les cellules en métaphase. Les cellules sont ensuite lysées puis étalées, laissant alors sur la lame le matériel génique, soit en noyaux soit en chromosomes individualisés. La dénaturation puis la coloration permet ensuite la reconnaissance des chromosomes au microscope afin de mettre en évidence des anomalies du clone pathologique. Il peut s'agir d'anomalies numériques et/ou structurales, le plus souvent non aléatoires (récurrentes). Vingt métaphases doivent être analysées au minimum. Un clone est identifié par la présence d'au moins deux métaphases portant la même anomalie quand il s'agit d'un chromosome surnuméraire ou d'une anomalie de structure et d'au moins trois métaphases lorsqu'il s'agit de la perte d'un même

chromosome. Trois groupes pronostiques ont été mis ainsi en évidence : favorable, intermédiaire et défavorable, selon les anomalies retrouvées (20).

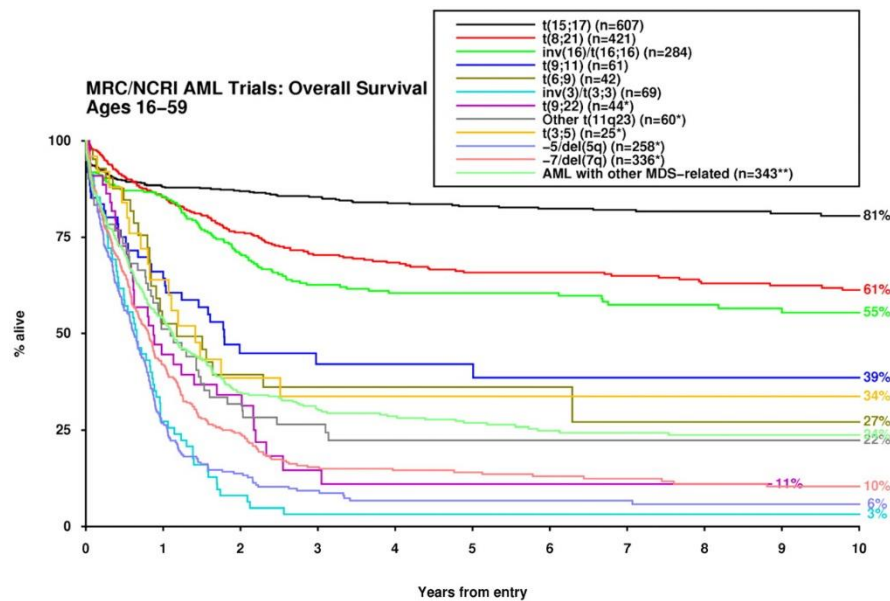


Figure 4 : Courbes de survie selon les anomalies cytogénétiques récurrentes dans les LAM (données issues de plus de 5800 patients âgés de 16 à 60 ans, traités dans les essais thérapeutiques du groupe Medical Research Council [MRC]) (20)

La FISH est une technique de cytogénétique moléculaire, elle correspond à l'hybridation de sondes spécifiques fluorescentes sur des régions ciblées de l'ADN. Elle est employée en complément du caryotype conventionnel car elle permet de préciser certains réarrangements, de rechercher la présence d'un clone et de mettre en évidence des remaniements non visibles en cytogénétique conventionnelle comme le sont, par exemple, les réarrangements cryptiques des gènes *KMT2A* ou *NUP98*.

■ Biologie moléculaire

Le screening moléculaire recommandé par l'ELN au diagnostic des LAM inclut la recherche des mutations de *NPM1*, *CEBPA*, *FLT3* (-ITD et -TKD), *RUNX1*, *ASXL1* et *TP53* ainsi que la recherche des réarrangements récurrents (*PML-RARA*, *CBFB-MYH11*, *RUNX1-RUNX1T1*, *BCR-ABL1*, *DEK-NUP214*, *KMT2A-MLL2* et autres réarrangements de *KMT2A*), guidée ou non par la cytogénétique conventionnelle. Ces analyses de biologie moléculaire nécessitent notamment l'utilisation des techniques de séquençage (séquençage Sanger ou séquençage à haut débit) pour les mutations et de RT-PCR ou RT-MLPA pour les transcrits de fusion (21). Ces anomalies présentent un intérêt pronostique et parfois thérapeutique (thérapie ciblée, indication d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques). A noter que la recherche des réarrangements de *NUP98* ne fait pas partie des recommandations de l'ELN. Le remaniement de *NUP98*, souvent cryptique en cytogénétique, identifie une entité distincte et rare de LAM. En raison de son impact pronostique défavorable, sa recherche est de plus en plus recommandée dans les protocoles d'essais thérapeutiques.

h. Classification OMS 2016

Les éléments cytologiques, cytogénétiques, moléculaires et cliniques (antécédents d'hémopathie ou de chimiothérapie, sarcome) permettent de classer les LAM selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS). La classification OMS des leucémies aigües myéloïdes, révisée en 2016 (22), distinguent six catégories de leucémies (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification OMS des leucémies aigües myéloïdes (22)

LAM avec anomalies génétiques récurrentes
LAM avec t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i>
LAM avec inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i>
LA promyélocytaire avec <i>PML-RARA</i>
LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-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-MKL1</i>
Entité provisoire : LAM avec <i>BCR-ABL1</i>
LAM avec mutation de <i>NPM1</i>
LAM avec mutations bi-alléliques de <i>CEBPA</i>
Entité provisoire : LAM avec mutation de <i>RUNX1</i>
LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies
Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie
LAM sans autre spécificité
LAM avec différenciation minimale
LAM sans maturation
LAM avec maturation
LA myélomonocytaire
LA monoblastique/monocytaire
Leucémie érythroïde pure
LA mégacaryocytaire
LA à composante basophile
LA avec myélofibrose (panmyélose aigüe)
Sarcome myéloïde
Prolifération myéloïde liée au syndrome de Down
Myélopoïèse transitoire anormale
Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down

i. Pronostic

■ Facteurs pronostiques liés au patient

Un âge avancé est un facteur de risque indépendant associé à un pronostic plus défavorable. Un état général diminué, la présence de comorbidités et un score de performance faible sont associés à une augmentation de la mortalité due au traitement, expliquée par une moins bonne tolérance de la toxicité des chimiothérapies intensives (17).

■ Facteurs pronostiques liés à la maladie

Les caractéristiques de la leucémie aigüe au diagnostic sont des indicateurs pronostiques. Ainsi, la leucocytose, la pré-existence de syndrome myélodysplasique, la prise de traitements cytotoxiques antérieurs et les marqueurs génétiques de la LAM peuvent contribuer à prédire la résistance au traitement de la leucémie (4). La prise en compte par l'ELN des marqueurs génétiques pour l'évaluation de la stratification pronostique est résumée dans le Tableau 4. Les LAM CBF, fusion *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11*, sont par exemple des LAM de bon pronostic, tout comme les mutations de *NPM1* cependant modéré par la co-existence d'un ratio *FLT3*-ITD bas ou absent.

Tableau 4 : Stratification pronostique d'après l'ELN 2017 (17).

FLT3-ITD_{low} signifie ratio allélique <0,5 ; **FLT3-ITD_{high}** signifie ≥0,5 ; *en l'absence d'anomalie récurrente classante selon l'OMS ; **présence d'une ou plusieurs monosomie(s) (X et Y exclus) avec au moins une autre monosomie ou un remaniement chromosomique ; ***marqueurs à ne pas prendre en compte si associés à une anomalie de bon pronostic

Risque	Anomalies génétiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutation de <i>NPM1</i> et absence de mutation <i>FLT3-ITD</i> ou <i>FLT3-ITD</i> ^{low} Mutations bi-alléliques de <i>CEBPA</i>
Intermédiaire	Mutation de <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i> ^{high} Absence de mutation de <i>NPM1</i> et absence de mutation <i>FLT3-ITD</i> ou <i>FLT3-ITD</i> ^{low} (sans autre(s) anomalie(s) génétique(s) de pronostic défavorable) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3-KMT2A</i> Toutes les autres anomalies non classées comme favorables ou défavorables
Défavorable	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23.3); 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 (EVI1)</i> -5, del(5q); -7; -17/anomalie (17p) Caryotype complexe (≥ 3 anomalies*), caryotype monosomal** Absence de mutation de <i>NPM1</i> et <i>FLT3-ITD</i> ^{high} Mutation de <i>RUNX1</i> *** Mutation de <i>ASXL1</i> *** Mutation de <i>TP53</i>

L'âge est associé à des anomalies génétiques de mauvais pronostic. Toutefois, ce sont les anomalies génétiques qui prédominent sur l'issue défavorable des patients à cause de la résistance au traitement qu'elles confèrent aux cellules, plus que le risque de mortalité dû au traitement lui-même. Et cela, d'autant plus que la tolérance des chimiothérapies a été améliorée ces dernières années (4).

j. Traitements conventionnels

■ Induction

Le schéma classique de la cure d'induction dit «3+7» consiste à l'administration pendant trois jours d'anthracycline IV (daunorubicine, idarubicine ou mitoxantrone) et de cytarabine en continu pendant sept jours.

Les anthracyclines sont des agents intercalants qui inhibent la réplication et la transcription de l'ADN. La cytarabine aussi appelée ARA-C est un analogue de la cytosine dont l'incorporation frauduleuse inhibe la réplication de l'ADN. Ces traitements sont généralement suivis d'une aplasie d'une durée d'environ quatre semaines.

L'objectif de ce traitement d'induction est l'obtention d'une rémission complète. La rémission complète est définie par les critères suivants : un taux de blastes médullaires inférieur à 5%, une absence de blastose circulante et de corps d'Auer dans les blastes, une absence de localisation extra-médullaire de la pathologie, un taux de polynucléaires neutrophiles supérieur à 1 G/L et un compte de plaquettes supérieur ou égal à 100 G/L (17). Elle est obtenue chez 60 à 85% des patients de moins de 60 ans et 40 à 60% chez les plus de 60 ans, à relier toutefois à une fréquence plus élevée de facteurs de mauvais pronostics dans la population des plus de 60 ans (4).

■ Consolidation

Après l'obtention d'une rémission complète, la stratégie thérapeutique consiste à faire perdurer cette rémission, en utilisant selon les cas la chimiothérapie ou l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH).

La chimiothérapie est indiquée chez les patients à risque génétique favorable telles que les LAM à Core Binding Factor. Elle consistera en deux à quatre cycles de cytarabine dont les doses seront adaptées en fonction de l'âge.

L'allogreffe de CSH est recommandée chez les patients jeunes à risque défavorable ou intermédiaire. Les taux de rechutes après allogreffe sont plus faibles qu'après une chimiothérapie. Cependant, la toxicité liée à la greffe doit faire discuter de son avantage au cas par cas, particulièrement pour les patients jeunes à risque intermédiaire et les patients de plus de 65 ans présentant des comorbidités pour lesquels une chimiothérapie serait plus profitable.

2. Maladie résiduelle

a. Définition

Le terme de maladie résiduelle ou maladie minimale détectable (MRD) désigne la persistance d'un clone leucémique détectable avec des techniques de sensibilité supérieure à celle de la cytologie (méthodes moléculaires et cytométriques) (Figure 5) (23).

b. Intérêt

On considère que le nombre de cellules tumorales au diagnostic de leucémie aigüe est de l'ordre de 10^{12} cellules. Dès que ce nombre passe en dessous de 10^{10} sous l'action des traitements, les cellules leucémiques ne sont plus détectées par l'examen cytologique et le patient est alors considéré en rémission complète. Selon sa définition, la rémission complète est affirmée en cytologie par une absence d'excès de blastes, avec un seuil de 5% au myélogramme. Cependant, la sensibilité de la cytologie est limitée : de l'ordre de 10^{-2} . Par ailleurs, morphologiquement il est difficile d'évaluer si les blastes observés au frottis sont des blastes de régénération ou des blastes responsables d'une rechute. L'intérêt de techniques sensibles dans le suivi des patients est aujourd'hui bien documenté, que ce soit en cytométrie en flux (24), ou en biologie moléculaire (25). L'utilisation de ces techniques de haute sensibilité permet de suivre l'évolution de la masse tumorale (le plus souvent avec un ou plusieurs marqueurs hautement spécifique(s) de la cellule leucémique) et permet ainsi de mieux apprécier la sensibilité des cellules à la chimiothérapie et d'évaluer la qualité ou « profondeur » de la rémission complète (Figure 5). De plus en plus, la MRD est utilisée comme un outil de stratification thérapeutique dans les essais cliniques. Des contrôles réguliers et suffisamment rapprochés permettent de détecter précocement une ascension du marqueur et éventuellement de proposer une intervention thérapeutique ou une orientation plus précoce vers l'intensification et l'allogreffe de CSH.

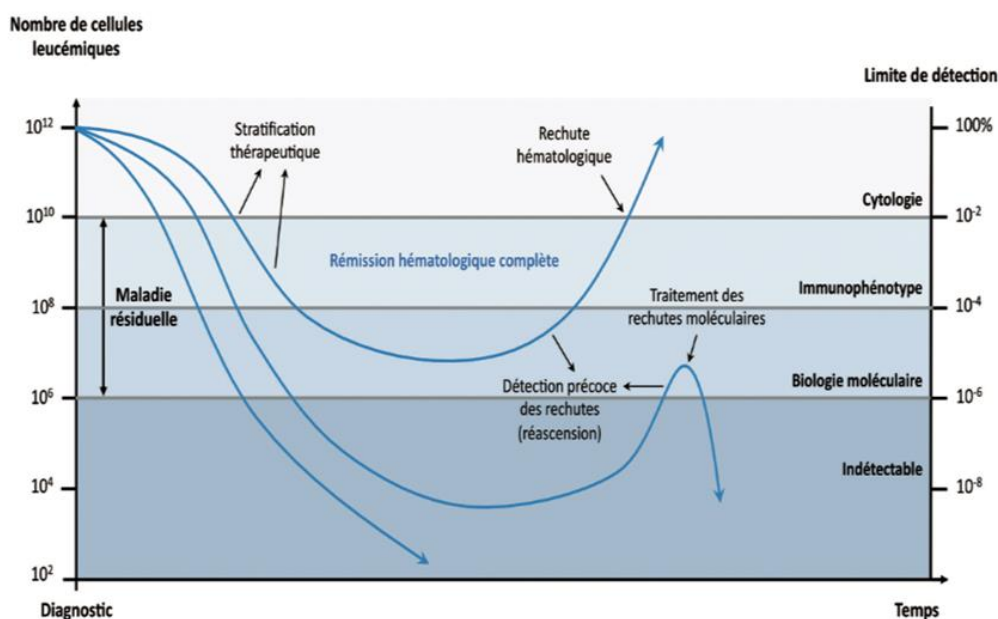


Figure 5 : Seuils de sensibilité des techniques de maladie résiduelle dans les LAM, d'après Duployez et Preudhomme (26)

c. Marqueurs et applications

Pour permettre son utilisation comme outil de stratification et de surveillance en pratique clinique, la MRD nécessite l'utilisation d'une technique sensible couplée à un marqueur spécifique de la leucémie et applicable à l'analyse en séries (anomalies récurrentes). Ceci exclut l'utilisation des anomalies pré-leucémiques (ex : mutations de *DNMT3A* ou *TET2*), non spécifiques de la leucémie, et des événements tardifs (ex : mutations de *FLT3*) qui peuvent être perdus à la rechute. Les meilleurs marqueurs remplissant ces critères sont donc constitués des transcrits de fusion récurrents (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *PML-RARA*) ou des mutations de *NPM1*, quantifiés par PCR quantitative en temps-réel (RQ-PCR) après une étape de rétro-transcription de l'ARN. Le suivi de la MRD est recommandé après chaque cure de traitement (la quantification du marqueur au diagnostic est un préalable nécessaire), puis classiquement tous les trois mois pendant 24 mois *a minima*, et au-delà, adapté selon le risque du patient et au cas par cas (17). Les échantillons seront dans l'idéal du sang et de la moelle prélevés en parallèle à chaque point de suivi mais les études récentes tendent à montrer que le sang est largement suffisant dans certains cas (27,28).

■ Transcrits de fusion *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11*

La fusion *RUNX1-RUNX1* issue de la translocation entre les bras longs des chromosomes 8 et 21, est retrouvée dans 4 à 8% des LAM. La fusion *CBFB-MYH11*, consécutive à la translocation t(16;16) ou à l'inversion du chromosome 16, est présente chez 5 à 10% des patients atteints de LAM. Ces 2 anomalies altèrent respectivement les sous-unités alpha (*RUNX1*) et bêta (*CBFB*) du Core Binding Factor.

Dans le cas des LAM CBF, l'enjeu de la MRD est de définir les patients à haut risque de rechute. En effet, ces LAM ont la particularité d'être de pronostic favorable en raison de leur excellente chimiosensibilité, obtenant dans plus de 90% des cas une rémission complète. Cependant les rechutes des LAM-CBF sont fréquentes et se manifestent chez environ 30% des patients (29).

Le protocole MRC AML-15 concernant les patients de plus de 15 ans nouvellement diagnostiqués d'une LAM-CBF au Royaume-Uni, a mis en évidence que l'utilisation du rapport logarithmique entre le taux de transcrit de fusion *RUNX1-RUNX1T1* en fin d'induction et le diagnostic est le paramètre le plus pertinent pour la détection des rechutes, facteur plus discriminant que puissent l'être des valeurs seuils définies dans la moelle et dans le sang (30). Ainsi, une diminution de plus de 3 log de *RUNX1-RUNX1T1* prédit un risque de rechute estimé à 4% alors qu'il est de 30% pour une diminution de moins de 3 log (HR par diminution logarithmique : 0.33; 0.15-0.73; P .004) (30). L'essai français CBF-2006 qui incluait les patients diagnostiqués d'une LAM-CBF entre 18 et 60 ans détermine une valeur pronostique de la MRD pour une diminution de 3 log entre le diagnostic et la fin de la première consolidation et ce pour les transcrits *RUNX1-RUNX1T1* et *CBFB-MYH11* (29). L'incidence cumulée de rechutes à 3 ans était de 54% et la survie sans rechute de 44% chez les patients n'atteignant pas au moins 3 log de réduction

au point de suivi MRD2 (pré-consolidation 2) contre 22% et 73% respectivement chez les bons répondeurs ($P < 0.001$) (29). La MRD restait le seul facteur prédictif du risque de rechute en analyse multivariée incluant la leucocytose et les mutations de *KIT* et *FLT3* (29). Une persistance des transcrits de fusion est observée chez certains patients en rémission complète prolongée (30), ayant été expliquée pour *RUNX1-RUNX1T1* par une expression du transcrit par des cellules souches quiescentes, des monocytes et de cellules B (31). La détection précoce des rechutes des LAM-CBF offre l'opportunité d'un traitement pré-emptif des patients, ne modifiant pas pour autant la stratégie utilisée. En effet ces précédentes études ont constaté que la survie globale est peu altérée par les rechutes des LAM-CBF en raison d'une sensibilité conservée de ces leucémies à la chimiothérapie (29,30). L'allogreffe, dont la toxicité est importante, pourrait avoir des effets plus délétères sur le patient qu'une chimiothérapie de rattrapage. D'autant plus qu'il est possible d'imaginer un schéma thérapeutique moins lourd en cohérence avec la masse tumorale alors bien plus faible au moment de la rechute moléculaire que lors de la rechute hématologique.

- Transcrit de fusion *PML-RARA*

Les leucémies aigües promyélocyaires (LAP), associées au transcrit *PML-RARA* issu de la translocation t(15 ;17), sont des LAM de bon pronostic sous réserve de l'initiation rapide d'un traitement spécifique par ATRA permettant la levée du blocage de différenciation des blastes. Utilisé d'abord en association avec la chimiothérapie pendant la cure d'induction, l'ATRA a ensuite été associé au trioxyde d'Arsenic (ATRA+ATO). Cette dernière association a montré sa supériorité sur la cohorte APL0406, améliorant la survie et diminuant les effets secondaires bien connus des chimiothérapies (32). Dans l'essai AML15 conduit sur 406 patients atteints de LAP, l'analyse multivariée définit la MRD en fin de consolidation comme le meilleur indicateur de rechute (HR : 17.87; IC_{95%} : 6.88–46.41; $P < .0001$) (33). En revanche, la réduction du taux de transcrit entre le diagnostic et la fin de l'induction n'est pas informatif du risque de rechute. La persistance du transcrit en fin d'induction dans le cas des LAP est possiblement expliquée par l'expression de *PML-RARA* par les cellules pathologiques entrées en différenciation. Le suivi moléculaire du transcrit *PML-RARA* dans les LAP est un modèle de MRD : en plus de son intérêt comme indicateur de rechute, il a aussi permis d'étayer l'intérêt des thérapies pré-emptives lors des rechutes moléculaires. Deux études des groupes GIMEMA (protocole AIDA) et PETHEMA (protocoles LPA 96 et LAP99) illustrent que le traitement instauré lors de la rechute moléculaire des patients atteints de LAP améliore significativement la survie à 2 et 5 ans respectivement. Dans le groupe GIMEMA par exemple, la survie estimée à 2 ans post-rechute est de 92% (IC_{95%} : 61% à 98%) pour des patients traités au moment de la rechute moléculaire tandis qu'elle est de 44% (IC_{95%} : 35% à 52%) dans une précédente étude pour des patients traités selon le même protocole mais au moment de la rechute hématologique (34). En 2018, Cicconi *et al.* encouragent à initier des traitements de rattrapage dès lors que la MRD se positive et demandent à considérer comme objectif thérapeutique la réponse moléculaire dans les prochaines études (35). Au-delà de l'impact pronostic pour le patient, la MRD fait

repenser la stratégie de suivi des patients : compte tenu de la très faible fréquence des rechutes chez les patients à risque faible et intermédiaire et qui montrent une MRD négative en fin de consolidation, il apparaît qu'un suivi au long cours des patients ne semblent peut-être pas bénéfique, en raison de son coût et de son impact sur la qualité de vie des patients (32).

- Mutations de *NPM1*

NPM1 est le gène de la nucléophosmine situé en 5q35.1. Il est l'un des gènes les plus fréquemment altérés dans les LAM : dans environ 25 à 30% des cas de LAM *de novo* et 50 à 60% des LAM à caryotype normal (36). Les mutations principales de *NPM1* sont des insertions de 4 nucléotides dans l'exon 12 du gène, entraînant un décalage du cadre de lecture et la synthèse d'une protéine tronquée. Les mutations les plus fréquentes sont les types A, B et D, pour lesquelles il existe des plasmides commerciaux permettant d'établir des gammes de quantification pour le suivi de la maladie résiduelle en RQ-PCR.

Parmi les différents points de suivi de MRD évalués au cours de l'essai du NCRI AML17 recrutant les patients LAM-*NPM1* mutée traités intensivement, le plus pertinent pour prédire la rechute est le prélèvement sanguin dans la phase de régénération qui suit le second cycle de chimiothérapie des patients en rémission complète. Lorsque la MRD est positive le risque de rechute à 3 ans est évalué à 82% alors qu'il n'est que de 30% chez les patients dont la MRD est négative (HR univarié : 4.80; IC_{95%} : 2.95 à 7.80; P<0.001) (37). De la même façon, une MRD positive est associée à un taux de survie plus faible (24%) que pour les patients dont la MRD est négative (75%) (HR univarié : 4.38; IC_{95%} : 2.57 à 7.47; P<0.001). Dans cette étude, la présence de mutation(s) *FLT3-ITD* et/ou de *DNMT3A*, que ce soit dans le groupe à MRD positive ou à MRD négative, n'apporte pas d'informations pronostiques supplémentaires en termes de rechute et de survie. La MRD du transcrit *NPM1* est le seul marqueur pronostic indépendant de rechute (HR : 5.09; IC_{95%} : 2.84 à 9.13; P<0.001) et de mortalité (HR : 4.84; IC_{95%} : 2.57 à 9.15; P<0.001) selon l'analyse multivariée. Lors des rechutes, le transcrit est retrouvé dans 69 cas sur les 70 de cette étude, montrant la grande spécificité du transcrit de *NPM1* muté vis-à-vis de la maladie (37).

La précision par la MRD de groupes pronostics au sein des LAM *NPM1* mutés pourrait être un outil intéressant pour le recours ou non à la greffe. Les patients présentant une MRD positive après leur deuxième cure de chimiothérapie peuvent ne pas être dans les critères d'éligibilité à la greffe (*FLT3* non muté) alors que leur rechute est probable compte tenu du résultat de la MRD (37). D'autre part, des patients auront recours à la greffe selon leur statut *FLT3* alors que le bénéfice de la greffe n'est pas mis en évidence chez les patients ayant une réduction de plus de 4 log de MRD en post-induction sur le sang, démontré par les résultats du protocole ALFA-0702 sur les patients de 18 à 60 ans présentant une LAM *de novo* traités intensivement (28).

- Surexpression de *WT1*

Le gène *WT1* (Wilm's Tumor 1) est exprimé au stade précoce de la différenciation myéloïde. Ce facteur de transcription est ensuite mis sous silence et n'est plus retrouvé dans les cellules hématopoïétiques matures (38). Sa surexpression dans plus de 80% des LAM l'a très tôt rendu attractif comme marqueur de la maladie résiduelle. Le défi de sa quantification était de mettre au point un essai reproductible entre les laboratoires et offrant la meilleure sensibilité possible. Le test recommandé actuellement par l'ELN pour sa quantification mesure jusqu'à une sensibilité de 10^{-4} . Des taux physiologiques de ce marqueur sont retrouvés dans la moelle (<250 copies/ 10^4 copies d'*ABL*) et très faiblement dans le sang (<50 copies/ 10^4 copies d'*ABL*) (39), raison pour laquelle ce marqueur apparaît plus sensible au niveau sanguin. En revanche, sa surexpression n'est pas liée au phénomène de régénération qui suit les traitements et donc ne sera pas source d'interférence avec les valeurs obtenues en sortie d'aplasie (39). Sa valeur pronostique en fin d'induction est discriminante, montrant un risque de rechute significativement augmenté lorsque le transcrit n'a pas montré une diminution de plus de 2 log par rapport au diagnostic ($P=0,004$) (39). L'impact pronostic de la MRD de *WT1* en fin d'induction a aussi été mis en évidence par la cohorte française ALFA-0702 concernant des patients âgés de 18 à 60 ans avec une LAM *de novo* et traités intensivement. L'incidence cumulée de rechute à 4 ans était de 36,5% pour les patients ayant une MRD négative (*WT1* inférieur aux taux physiologiques) et de 69,2% pour ceux ayant une MRD positive (HR : 2.88 [1.93-4.29]; $p<0.001$), tandis que la survie sans rechute à 4 ans était de 60,9% pour les patients MRD négative par rapport à 24,9% chez les patients MRD positive (HR : 2.69 [1.89-3.83]; $p<0.001$) (40).

d. Techniques de suivi de la maladie résiduelle

- Approche cytométrique : généralités

Une des stratégies d'évaluation de la maladie résiduelle est l'utilisation de la cytométrie en flux. Cette technique repose sur l'étude des caractéristiques morphométriques (taille et structure) et des clusters de différenciation (CD) exprimés à la surface des cellules d'intérêt. Le flux permet une analyse individuelle des cellules contenues dans l'échantillon. Des représentations graphiques permettent ensuite de distinguer les différentes populations leucocytaires et de les quantifier par leur immunophénotype.

La taille et la structure d'une cellule sont déterminées par la mesure de la diffraction et de la déviation d'un rayon lumineux (laser) sur une cellule. La détermination des CD portés par la cellule fait appel à la fluorescence : les échantillons sont incubés en présence de solution d'anticorps marqués qui seront détectés après excitation des fluorophores à différentes longueurs d'ondes au moment du passage dans la chambre d'analyse de l'appareil.

- Approches cytométriques : DfN et LAIP

Deux approches de quantification cytométrique de la MRD existent : LAIP pour Leukemia Associated Immunophenotype, et DfN, pour Différence from Normal. Le LAIP identifie les caractéristiques immunophénotypiques des blastes au diagnostic. La population de cellules ayant les mêmes caractéristiques immunophénotypiques sera recherchée et quantifiée pour évaluer la maladie résiduelle dans les échantillons de suivi. La DfN utilise les caractères immunophénotypiques aberrants des blastes pour distinguer la population anormale des populations normales, cette seconde approche à l'avantage de s'affranchir de l'étude cytométrique du diagnostic. L'ELN recommande une utilisation combinée de ces deux techniques pour l'évaluation de la MRD.

Avec une sensibilité de 10^{-4} (1 cellule pour 10 000 leucocytes), la cytométrie présente l'avantage d'être applicable en théorie à toutes les formes de leucémies aiguës myéloïdes. De plus, l'équipement et la simplicité technique en font un réel avantage pour le suivi des patients. En revanche, le possible switch phénotypique des blastes est un inconvénient dans l'évaluation de la MRD en CMF. La rechute est possible à partir d'un blaste ne possédant pas les mêmes caractères antigéniques que le blaste présent au diagnostic et par conséquent, la maladie résiduelle ne permettra pas de détecter la rechute. Il est aussi important de souligner la difficulté dans certains types de leucémies aiguës de différencier les immunophénotypes des populations normales et anormales, comme par exemple le cas des leucémies à composante monocyttaire.

- Approche moléculaire : généralités

L'identification au diagnostic d'une anomalie génétique, dans environ 50% des leucémies aiguës, en fait une cible de choix comme marqueur de la maladie. Les mécanismes génétiques impliqués sont souvent des mutations (exemple : *NPM1*) ou des translocations chromosomiques à l'origine d'un nouveau gène (exemple : *RUNX1-RUNX1T1*). L'identification au diagnostic de ces cibles moléculaires puis leur quantification au cours du temps permet un suivi spécifique de la maladie et de ses rechutes.

L'outil privilégié actuellement en biologie moléculaire est la PCR. Mise au point par Kary Mullis en 1985, la PCR ou réaction de polymérisation en chaîne, consiste en l'amplification exponentielle d'une séquence d'acides nucléiques (39). Le principe technique repose sur la répétition de cycles de température permettant successivement la dénaturation, l'hybridation puis l'élongation de la séquence par une enzyme thermorésistante : la polymérase.

Les applications de la PCR dans le domaine de la biologie sont larges, elles peuvent permettre le séquençage d'une cible mais aussi sa quantification notamment par les approches de PCR temps-réel et de digitale PCR (Figure 6).

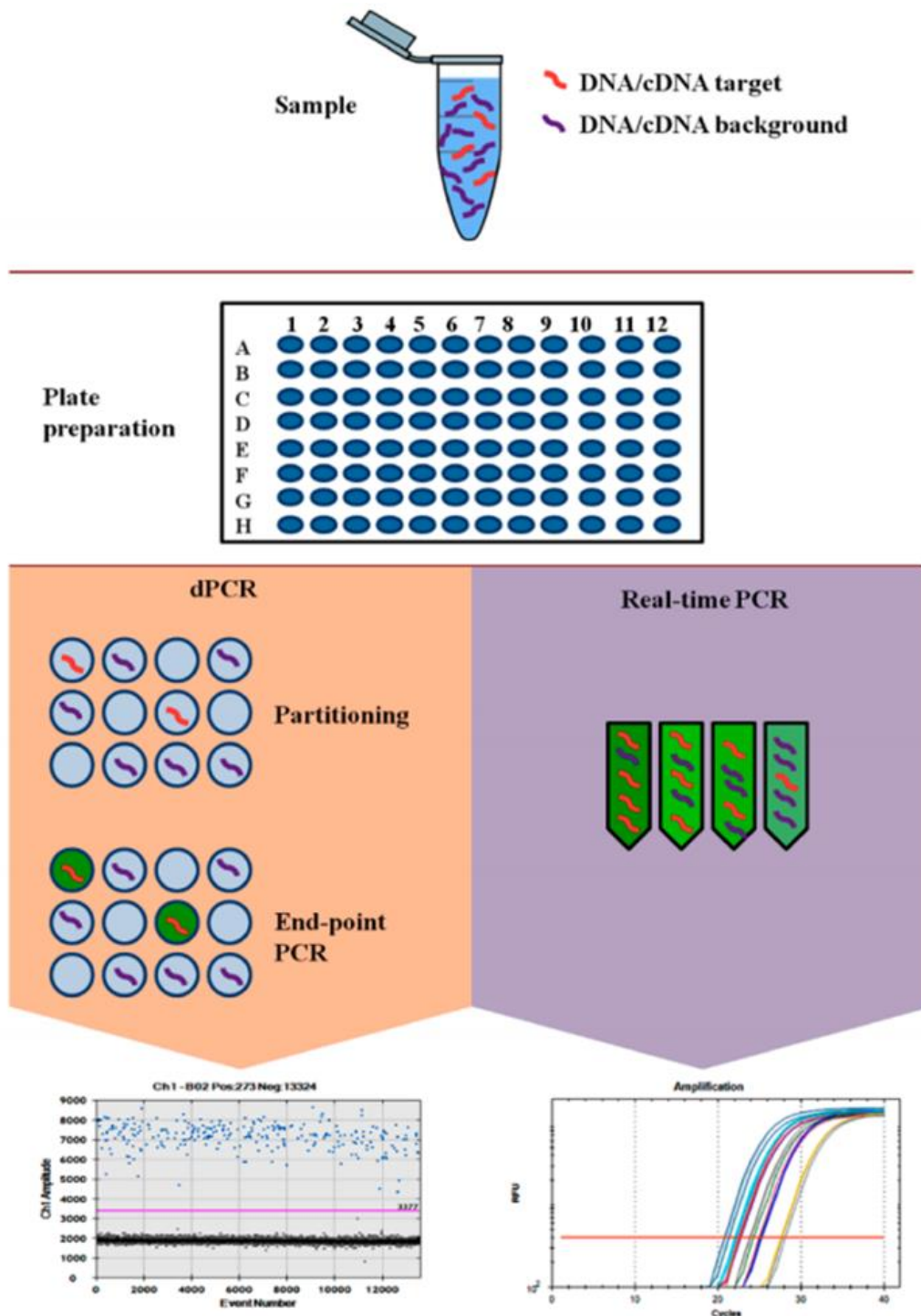


Figure 6 : Schématisation des techniques de PCR temps-réel et PCR digitale (41)

- Approche moléculaire : la PCR temps réel ou Q-PCR

Basée sur le suivi de la fluorescence dans le milieu réactionnel, la Q-PCR permet la quantification de la séquence cible dans l'échantillon initial (42).

La fluorescence provient d'un marqueur adjoint au milieu réactionnel, spécifique de la séquence amplifiée (sondes Taqman par exemple) ou non (SYBR green). A chaque cycle, la fluorescence mesurée suit une relation de proportionnalité avec le produit de PCR formé. La mesure du Ct « concentration threshold », défini comme le nombre de cycle requis pour obtenir un signal fluorescent significatif et

déTECTABLE, permettra de déterminer la quantité initiale de la séquence d'intérêt par comparaison avec la gamme de calibration établie pour cette cible (Figure 7).

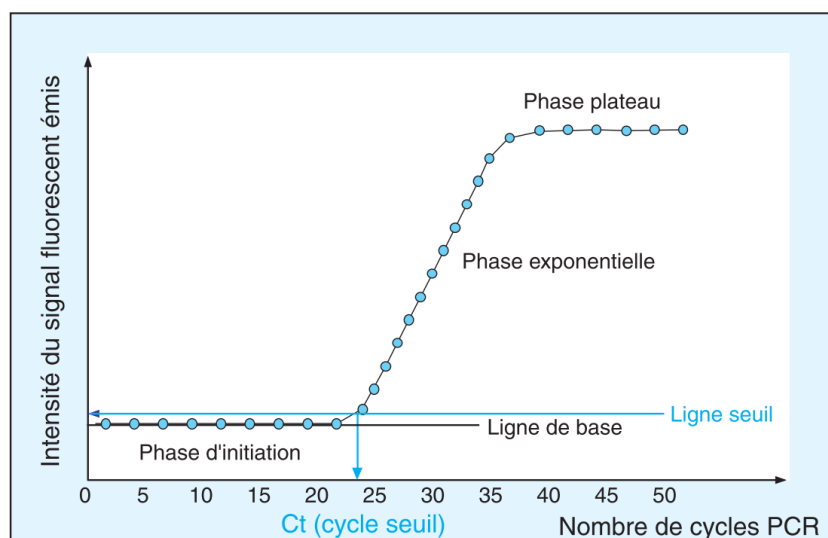


Figure 7 : Cinétique de la réaction de PCR et illustration du Ct (Concentration threshold) (42)

Actuellement la Q-PCR est considérée comme une des méthodes les plus sensibles pour le suivi moléculaire de la maladie résiduelle, allant jusqu'à la sensibilité de 10^{-6} pour certaines cibles, soit la détection d'une copie de l'anomalie pour 1 000 000 de copies du gène de référence. L'accès à des kits commerciaux permet d'obtenir des résultats reproductibles entre les centres mais ces kits ne couvrent pas l'ensemble des anomalies moléculaires retrouvées dans les leucémies aigües myéloïdes.

D'autre part, le recours systématique à une courbe de calibration est consommateur de temps, de matériel et représente un biais de mesure. La calibration est faite pour des cibles obtenues à partir de plasmides commerciaux. Les erreurs de précision sont multipliées par deux étant donné que sera prise en compte l'erreur de précision de la mesure du tube patient mais aussi celle des tubes de la gamme de calibration. De plus, les efficacités de PCR (pouvant être impactées par la présence d'inhibiteurs par exemple) peuvent être différentes entre les milieux réactionnels de la gamme et ceux du patient, biaisant ainsi l'extrapolation du Ct sur la gamme étalon.

- **Approche moléculaire : la PCR digitale ou dPCR**

La PCR digitale apparait dans la littérature en 1999. Le principe repose sur la compartimentation du milieu réactionnel et la lecture en point final de la présence ou non d'amplification au sein de chaque compartiment (41).

Cette PCR emploie les mêmes composants qu'une PCR temps-réel classique, à savoir un couple d'amorces, de l'ADN, des désoxynucléotides triphosphates, une polymérase, une solution tampon contenant aussi du $MgCl_2$, et une (ou plusieurs) sonde(s) fluorescente(s) spécifique(s) de la/de(s)

cible(s) à amplifier. L'échantillon initial est incorporé au milieu réactionnel alors qu'il a été préalablement dilué jusqu'à une dilution dite « limite » afin de pouvoir appliquer la loi de Poisson.

La sensibilité, de l'ordre de 10^{-6} , est adaptée au suivi des anomalies moléculaires des leucémies aigües. De plus, à la différence de la Q-PCR, il n'est pas nécessaire de réaliser une gamme de calibration puisqu'une cible témoin peut être recherchée en parallèle en utilisant une sonde d'une autre fluorescence, permettant aussi de s'affranchir des problèmes d'efficacité de PCR. La lecture de fluorescence ne se fait plus après chaque cycle mais en point final, le traitement informatique secondaire permettant de définir un seuil entre les compartiments positifs (avec fluorescence, la cible a été amplifiée ; il y avait au moins une copie) et les compartiments négatifs (non fluorescents, la cible n'a pas été amplifiée ; elle n'était pas présente). Le fractionnement du milieu est possible en support solide ou en support liquide. Parmi les technologies en support liquide, la PCR digitale en émulsion présente l'avantage d'être économe à la fois en matériel et en échantillon, puisque dans un puits peut être généré 20 000 gouttelettes et qu'un seul puits est nécessaire par échantillon (ou deux pour le passage en duplicate).

Parmi les inconvénients de cette méthode, deux inconvénients notables sont inhérents à la technique. Le biais d'échantillonnage est lié à la technique : la prise d'essai est un volume faible de l'échantillon primaire afin de pouvoir réaliser une dilution dite « limite », mais lorsque l'échantillon primaire est trop faiblement concentré, la prise d'essai peut ne pas être représentative de cet échantillon et donc la quantification de l'échantillon primaire sera faussée. L'erreur de partitionnement, erreur liée à la loi statistique de Poisson, est à l'origine d'une estimation faussée du nombre de copies dans le cas de faibles ou très fortes concentrations de cible.

- Approche moléculaire : NGS « Next generation sequencing »

Le séquençage haut débit, aussi appelé NGS, est une technique capable de séquencer parallèlement plusieurs milliers de séquences d'ADN ayant été amplifiées préalablement selon des cibles d'intérêt. Un traitement informatique puissant intervient secondairement pour rapporter les variants de l'ADN séquencés par rapport à un ADN témoin. Ces variants peuvent être des SNP, ou single nucleotide polymorphism c'est-à-dire des variants ne portant pas à conséquence sur la séquence, ou bien des mutations ayant des conséquences supposées ou affirmées sur la séquence d'ADN, ces mutations permettront alors de caractériser le(s) clone(s) anormal(aux).

Cette technologie est prometteuse pour la détection de la maladie résiduelle des leucémies aigües car elle serait capable de détecter et quantifier plusieurs mutations au sein d'un même échantillon. La combinaison de plusieurs anomalies moléculaires offrirait d'une part l'opportunité de suivre l'ensemble des LAM, y compris celles sans marqueur moléculaire récurrent identifié, et d'autre part de surveiller l'émergence de sous-clones ayant des caractéristiques morphologiques, cytométriques, moléculaires différentes du clone initial mais potentiellement impliqués dans la rechute.

Malheureusement, la technologie se heurte à différentes limites ne permettant pas son usage actuel en routine. Tout d'abord le manque de sensibilité vis-à-vis du bruit de fond, l'amplification préalable au séquençage génère des erreurs de polymérase qui apparaissent à faible fréquence et peuvent ne pas être différenciées d'une réelle mutation présente chez le patient sur un clone leucémique résiduel. La sensibilité attendue du NGS serait de l'ordre de 10^{-4} . D'autre part, cette technologie génère un nombre de données informatiques très important qu'il faut être en mesure de stocker, ce qui peut poser problème à l'échelle du nombre de prélèvements à traiter et du coût que cela imposerait.

Method	Sensitivity	Advantage	Disadvantage
Conventional Morphology: blast count	1 in 20 cells	-	-
FISH: numeric and structural cytogenetic aberrations	1 in 100–500 cells	- standardized - widely available	- insensitive - limited patients with aberrant karyotype (appr. 50%)
MFC: LAIP, DfN	1 in 1000–100,000	- applicable to nearly all AML cases (90%) - can distinguish viable from death cells - short turn around time	- operator-dependent, high experience needed - lower sensitivity and specificity than PCR - difficult to standardize - leukemic phenotype can change over time
qRT-PCR: molecular aberrations	1 in 100,000–1,000,000 cells	- high sensitivity - high specificity - existing standardization efforts - operator-independent - short turn around time - widely available	- restricted applicability to patients harboring the specific target (30–50%)
NGS: molecular aberrations	1 in 100,000–1,000,000 cells	- high sensitivity - allows to analyze a large number of mutations in a single experiment - easy to perform	- new methodology - currently not widely available - CHIP mutations can be detected in healthy people or may persist in AML remission - limited standardization - intrinsic error rate may limit sensitivity

Abbreviations: CHIP, clonal hematopoiesis of indetermined potential; DfN, different from normal; FISH, fluorescence in situ hybridization; LAIP, leukemia-associated immunophenotype; MFC, multicolor flow cytometry; NGS, next generation sequencing; qRT-PCR, quantitative real-time polymerase chain reaction.

Figure 8 : Limites de sensibilité, avantages et inconvénients des techniques de détection de la MRD des LAM, d'après Jentzsch *et al.* (43)

3. *NUP98* dans les LAM

a. Généralités sur le gène *NUP98*

NUP98, ou gène de l'isoforme 1 de la nucléoporine 98kDa, est localisé sur le chromosome 11 en 11p15.4. Ce gène code pour la protéine NUP98 exprimée dans divers organes avec une expression prédominante dans le sérum et les cellules sanguines mononuclées périphériques. A l'échelle cellulaire, la protéine NUP98 est essentiellement localisée au niveau nucléaire (Figure 9).

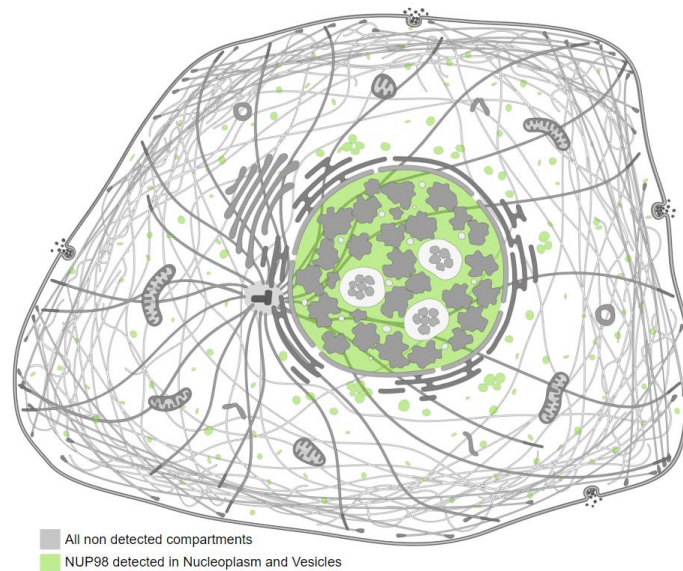


Figure 9 : Expression cellulaire de NUP98.

Credit image: Human Protein Atlas Cell Atlas NUP98 available from v19.3.proteinatlas.org

La protéine NUP98 se compose de plusieurs domaines fonctionnels : du côté N-terminal se trouvent deux groupements de répétitions GLFG (enchainement d'acides aminés hydrophobes dont la Phenylalanine (F) et la Glycine (G)) séparés par un domaine GBD (GLEBS binding domain) et au niveau C-terminal un domaine de liaison à l'ARN et le site de clivage autoprotéolytique (Figure 10) (44). Lors de la maturation post-traductionnelle de NUP98 le clivage du domaine NLS par autoprotéolyse est une étape essentielle, et très conservée au cours de l'évolution, à l'aiguillage de NUP98 vers le Complexe de Pore Nucléaire (45).

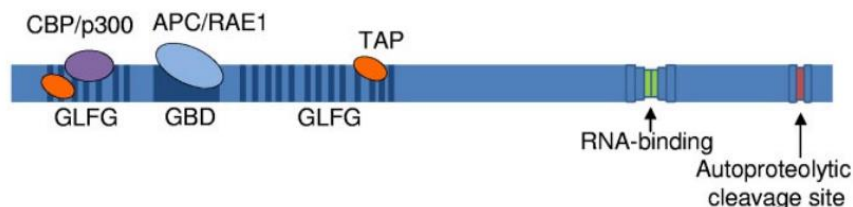


Figure 10 : Représentation des domaines fonctionnels de la protéine NUP98, d'après Gough *et al.* (44)

Le Complexe de Pore Nucléaire (NPC) est un organite localisé dans la membrane nucléocytoplasmique. Il permet le transport bidirectionnel entre le noyau et le cytoplasme d'ions et de petites

protéines par diffusion et de plus grosses molécules (ARNm et protéines >40kDa) par l'intermédiaire de protéines porteuses (44). Il est composé de près d'une trentaine de protéines différentes dont certaines sont présentes en plusieurs exemplaires. NUP98 au sein de ce complexe se localise à l'interface nucléocytoplasmique, au cœur du complexe (46). Les domaines fonctionnels de NUP98 interviennent dans le transport des molécules : les domaines GLFG (ou FG repeat) sont des sites d'accueil pour les karyoprotéines, tandis que la liaison simultanée du facteur RAE1 au domaine GLEBS et de TAP au domaine FG permet le transport d'une molécule simple brin d'ARN (44). NUP98 a aussi une fonction dans la transcription, en interagissant avec Wdr82 il forme un complexe menant à la triméthylation du résidu lysine 4 l'histone 3 (H3K4) (47,48). Il intervient aussi dans la progression mitotique en régulant l'activation de gènes du cycle cellulaire (49).

b. Réarrangements de *NUP98*

Les réarrangements impliquant *NUP98* sont décrits dans différentes hémopathies. Principalement recensées dans les leucémies aigües myéloïdes (*de novo* ou secondaires), des fusions de *NUP98* sont aussi rapportées dans les syndromes myélodysplasiques (dont secondaires), les leucémies myéloïdes chroniques en phase blastique et les leucémies aigües lymphoblastiques de lignée T (46). Aucune fusion de *NUP98* n'a été décrite dans des hémopathies à cellules B et dans les syndromes myéloprolifératifs chroniques (44).

Depuis la description en 1996 (50,51) du premier partenaire de *NUP98*, *HOXA9*, une trentaine d'autres gènes sont aujourd'hui décrits. Toutes les fusions de *NUP98* décrites conservent la partie N-terminale de NUP98 contenant les domaines GLFG et GBD, tandis que le transcrit réciproque est inconstamment retrouvé.

Les partenaires de réarrangement de *NUP98* sont variés mais ils peuvent être regroupés selon leurs caractéristiques fonctionnelles dont certaines présentent des similitudes.

▪ Gènes *HOX* de classe I

Ces gènes à homéodomaine (domaine fonctionnel de liaison à l'ADN), codent pour des facteurs de transcription de gènes impliqués dans le développement embryonnaire (45). Les gènes HOX dits « de classe I » ont la particularité d'être localisés au sein de quatre clusters de gènes répartis sur le génome : les *HOXA* sur le chromosome 7, les *HOXB* sur le chromosome 17, les *HOXC* sur le chromosome 12 et les *HOXD* sur le chromosome 2 (45). Des fusions de *NUP98* sont décrites avec *HOXA9*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC11*, *HOXC13*, *HOXD11*, *HOXD13* (46). A noter que les gènes *HOXA*, *HOXB* et *HOXC* jouent un rôle physiologique dans l'hématopoïèse et que leur expression est perdue lorsque la cellule s'engage dans une lignée de différenciation (52,53).

- Gènes *HOX* de classe II

Les gènes *HOX* de classe II correspondent à des gènes à homéodomaine également mais ils sont quant à eux dispersés sur le génome (45). Dans cette catégorie se trouvent *HHEX*, *GSX2*, *PRRX1*, *PRRX2*, *POU1F1* (46).

- Autres partenaires

Les autres gènes partenaires ne contiennent pas d'homéodomaine mais ont en commun une structure coiled-coil commune associée ou non à d'autres domaines fonctionnels.

Les gènes *BPTF*, *JADE2*, *KDM5A*, *MLLT10*, *NSD1*, *PHF23* ont en plus un domaine PHD (Plant homeodomain), *KMT2A*, *NSD1* et *NSD3* ont un domaine SET et *SETBP1*, *KAT7* et *PSIP1* sont des gènes ayant un rôle dans la régulation de transcription ou l'épigénétique (46).

Certains partenaires sont plus fréquemment associés à une hémopathie, c'est le cas des fusions *NUP98-NSD1* retrouvées principalement dans les leucémies aigües myélomonocytaires (LAM4/5), les fusions *NUP98-KDM5A* étant plutôt décrites dans les leucémies aigües monocytaires, érythroïdes ou mégacaryocytaires (LAM5, 6 et 7), et les fusions *NUP98-RAP1GDS1* dans les leucémies aigües lymphoblastiques de lignée T (46).

c. Fréquence et pronostic des réarrangements de *NUP98*

Habituellement associés à un pronostic péjoratif, les réarrangements impliquant *NUP98* sont plus fréquemment décrits dans la population pédiatrique et chez l'adulte jeune (54).

Les réarrangements de *NUP98* recherchés par FISH sur une cohorte de 574 LAM pédiatriques identifient 22 patients soit une fréquence de 3,8%. A l'échelle des LAM pédiatriques, il s'agit donc du quatrième remaniement chromosomique le plus fréquent, derrière les réarrangements de *KMT2A*, *RUNX1-RUNX1T1*, *PML-RARA* et *CBFB-MYH11* (55).

Dans les cohortes de LAM de l'adulte, le réarrangement *NUP98-HOXA9* est retrouvé chez 3 patients sur 208 (1,5%) et 11 sur 482 patients (2,23%) atteints de LAM, dans deux cohortes asiatiques respectivement (56,57). Bien que le nombre de patients soit faible, ces études montrent un pronostic défavorable de *NUP98-HOXA9* sur la survie des patients et un âge plus jeune comparativement aux autres patients des cohortes. De plus, l'étude de Chou *et al.* montre une association entre la présence du transcrit *NUP98-HOXA9* chez les patients et les mutations *WT1* et *KRAS*, et désigne *NUP98-HOXA9* comme un facteur indépendant de mauvais pronostic en termes de survie, de risque de rechute et de survie sans évènement ($P = 0.015$, 0.001 and 0.003 , respectivement) (57). La fusion *NUP98-NSD1* est décrite chez 7 des 237 patients adultes, soit 3%, de la cohorte SWOG (étude américaine, patients adultes diagnostiqués d'une LAM, LAP exclue). Ce transcrit est lui aussi associé à un âge jeune (le patient *NUP98-NSD1* le plus âgé de cette étude avait 50 ans au diagnostic) et à la présence de mutations *WT1* (54).

Globalement, malgré la difficulté de rassembler des cohortes suffisantes, il semble que les réarrangements de *NUP98* dans les LAM, pédiatriques ou adultes, soient associés à un pronostic défavorable sur la survie et le risque de rechute et à un âge plutôt jeune (44).

d. *NUP98-NSD1*

Le réarrangement de *NUP98* (11p15) avec le partenaire *NSD1* (5q35) est issu de la translocation t(5;11)(q35;p15). Ce remaniement peut passer au travers de l'analyse cytogénétique conventionnelle et nécessite alors le recours à la FISH pour être mis en évidence (translocation cryptique).

La localisation de la protéine NUP98-NSD1 au niveau cellulaire se retrouve principalement dans le noyau, avec une répartition non homogène, en agrégat (Figure 11).

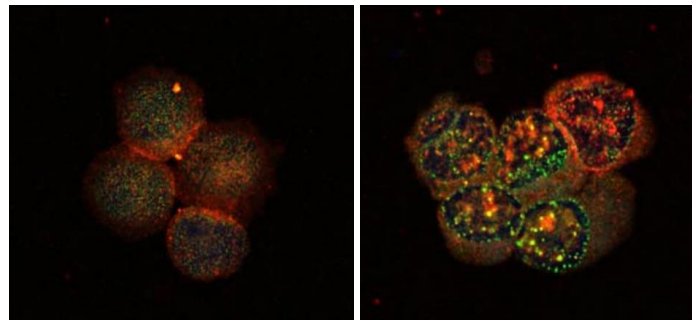


Figure 11 : NUP98 (vert) et NSD1 (rouge) en immunofluorescence par anticorps anti-NUP98 partie N-terminale et anti-NSD1 partie C-terminale sur cellules leucémiques.

Cellules *NUP98-NSD1* négatives à gauche et *NUP98-NSD1* positives à droite. Crédit image : Hollink *et al.* (58)

La protéine NSD1 sauvage, nuclear receptor binding SET domain protein 1, a pour fonction l'activation transcriptionnelle des récepteurs aux androgènes. Elle se compose de plusieurs domaines fonctionnels parmi lesquels un domaine SET et quatre domaines PHD dans la partie C-terminale conservées lors de la fusion *NUP98-NSD1*.

Ce réarrangement de *NUP98-NSD1* est décrit comme associé à un pronostic très défavorable dans les cohortes pédiatriques (54,58–60) et adultes (54,58).

L'étude de Hollink *et al.* décrit une population pédiatrique de 293 patients de 0 à 18 ans issue des cohortes néerlandaise, tchèque, allemande et française, et une population adulte de 808 patients (de 15 à 77 ans) issue des cohortes belge et allemande. Les patients *NUP98-NSD1* sont associés avec une leucocytose au diagnostic supérieure à celle des autres patients (58,61) et ce réarrangement est plus fréquemment observé dans le sous-type FAB M4/M5 chez les patients adultes (58). La présence de *NUP98-NSD1* est mutuellement exclusive des mutations de classe II (58). L'analyse multivariée met en évidence *NUP98-NSD1* comme marqueur indépendant de mauvais pronostic pour le risque de rechute (HR : 2.6; P = 0.001), la survie (HR : 1.7; P = 0.049) et la survie sans rechute (HR : 2.5; P = 0.001) (Figure 12) (58).

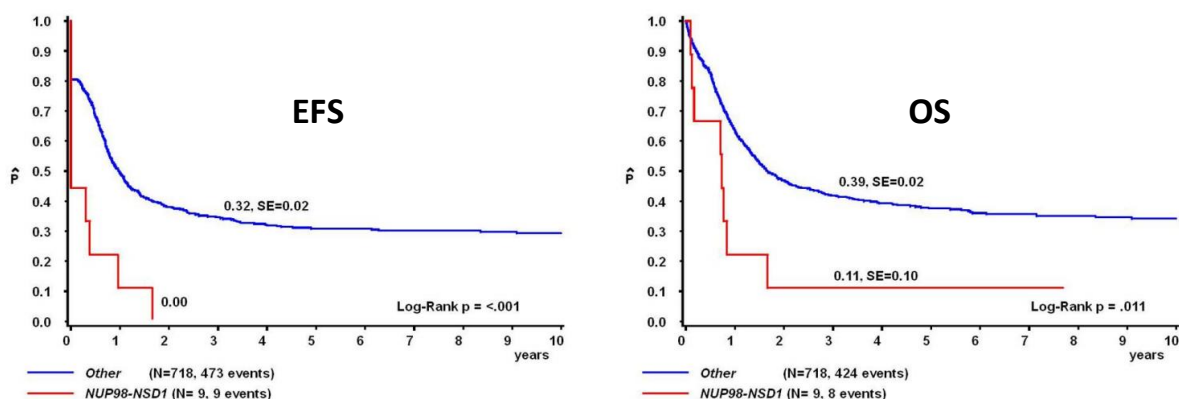


Figure 12 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) dans la cohorte adulte, d'après Hollink *et al.* (58)

Les cohortes de patients LAM *NUP98-NSD1* montrent toutes une issue très défavorable en termes de rechute et de survie (54,60–62).

Les données de la cohorte pédiatrique ELAM02 de 385 patients atteints de LAM *de novo* identifient 10 patients porteurs d'un réarrangement de *NUP98* (dont 9 d'entre eux ont pour partenaire *NSD1*). Leur survie à 3 ans est de 25% (IC_{95%} : 0–54) comparée à 77.3% (IC_{95%} : 73.1–81.6) pour les LAM *NUP98* négative et leur survie sans évènement est de 10% à 3 ans (IC_{95%} : 0–28.6) tandis qu'elle est de 60.5% (IC_{95%} : 55.5–65.5) chez les patients *NUP98* non réarrangés (Figure 13) (59).

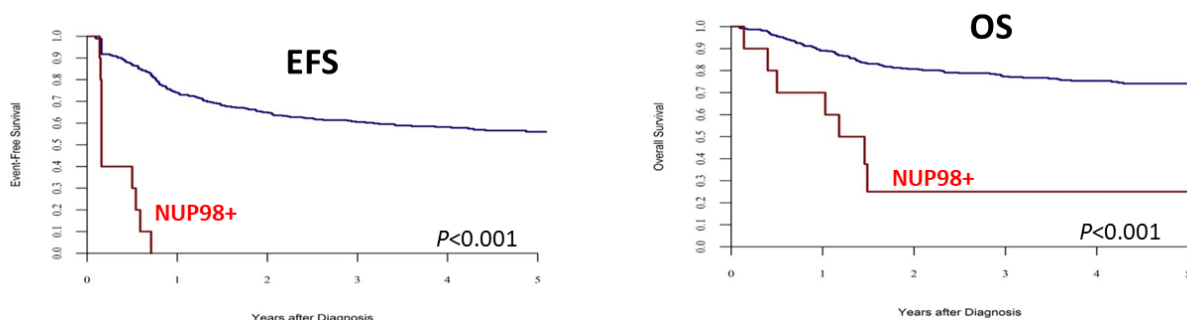


Figure 13 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) de la cohorte ELAM02, d'après Marceau-Renaut *et al.* (59)

L'association de *NUP98-NSD1* avec des mutations de classe I (*FLT3-ITD*, *WT1*) a été montrée par plusieurs études (58,60,61,63).

L'étude de Mc Neer *et al.* faisant état du profil génomique des LAM pédiatriques issues des protocoles AAML0531 et AAML03P1 du Children's Oncology Group montre que 50% des LAM en échec d'induction sont des LAM avec réarrangement de *NUP98-NSD1* (Figure 14) (64). Dans cette cohorte COG, l'échec d'induction des patients *NUP98-NSD1* est corrélé au statut *FLT3-ITD* : le taux de rémission post-induction est de 28% chez les patients *FLT3-ITD* + *NUP98-NSD1* alors qu'il est de 69% chez les patients *FLT3-ITD* sans *NUP98-NSD1* (P = 0.0001) (54).

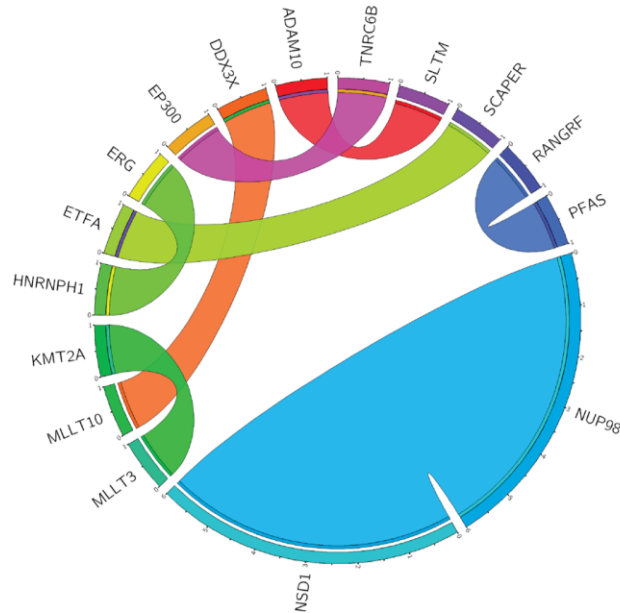


Figure 14 : Circos plot diagram des gènes de fusions présents au diagnostic chez les patients en échec d'induction, d'après Mc Neer *et al.* (64)

La présence d'une mutation de *WT1* apporte aussi un pronostic péjoratif : la présence de la mutation *WT1* associée ou non à la mutation *FLT3-ITD* chez les patients *NUP98-NSD1* entraîne une survie globale à 3 ans significativement plus faible que chez les patients *NUP98-NSD1* sans mutation ou les patients mutés *FLT3-ITD* et/ou *WT1* (60).

e. NUP98-KDM5A

Principalement décrit dans les LAM7 (mégacaryoblastiques), le transcrit *NUP98-KDM5A* est aussi retrouvé dans les LAM5 et les LAM6. Il est issu de la translocation t(11;12)(p15;p13).

Le gène partenaire *KDM5A*, lysine-spécific demethylase 5A, est un gène situé sur le chromosome 12. La protéine issue de ce gène est une enzyme ayant pour fonction la déméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 et joue aussi un rôle dans la régulation transcriptionnelle des gènes *HOX* et des cytokines.

L'étude de Noort *et al.* réunit deux cohortes pédiatriques, les cohortes du COG Children's Oncology Group et de l'European AML study group, afin d'étudier les profils d'expression moléculaire de ce sous-type de LAM (65). Sur les 2393 patients de l'étude, 47 d'entre eux, soit 2%, présentent le réarrangement *NUP98-KDM5A*. Les données relatives à la survie montrent que ce groupe de LAM a une survie globale et une survie sans événement bien plus faible que le groupe des autres LAM, l'EFS à 5 ans est de 29,6% +/- 14,6% par rapport à 47% +/- 2,1% (p=0,005) et une survie globale à 5 ans de 34,1% +/- 16,1% par rapport à 63,7% +/- 2,1% (p<0,001) dans les groupes *NUP98-KDM5A* réarrangés et *NUP98-KDM5A* négatifs respectivement. Le risque de rechute est plus élevé chez les patients *NUP98-KDM5A*, il est de 62,6% +/- 16,7% contre 42,5% +/- 2,3% (p=0,002) chez les autres patients de l'étude. L'analyse multivariée met en évidence que *NUP98-KDM5A* est un facteur de risque indépendant de la survie globale et du risque de rechute (65).

f. Signature transcriptionnelle des LAM *NUP98* réarrangées

Le profil transcriptionnel des LAM *NUP98-NSD1* est bien particulier. En effet, en étudiant un groupe de 13 échantillons de LAM *NUP98-NSD1* pédiatriques par rapport à 261 autres LAM pédiatriques sur puce HGU133, Hollink *et al.* mettent en évidence un profil commun d'expression des LAM *NUP98-NSD1* consistant en une surexpression des gènes *HOXA* et *HOXB*. A la différence des LAM CBF qui n'expriment ni les gènes *HOXA* ni les gènes *HOXB* et des LAM *MLL* réarrangées dont l'expression des gènes *HOXA* est retrouvée mais où celle des gènes *HOXB* est absente (Figure 15).

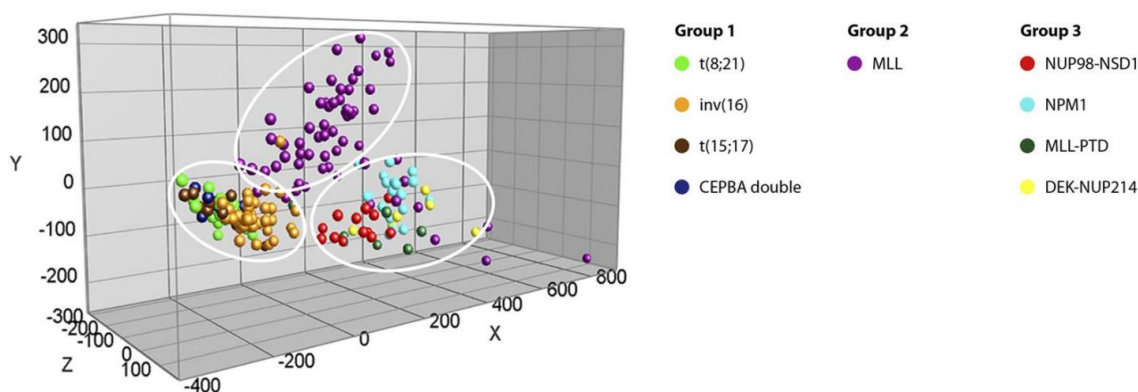


Figure 15 : Expression des gènes *HOXA* et *HOXB* selon les groupes de LAM, par Hollink *et al.* (58)

Dans le cas des fusions *NUP98-NSD1*, les travaux de Wang *et al.* permettent d'expliquer la surexpression des gènes *HOXA* par cette fusion. En effet, le domaine PHD (doigts I-IV) de la protéine NSD1 interagit avec la région promotrice des gènes *HOXA*. Dans les LAM-*NUP98* cette interaction persiste et entraîne des modulations épigénétiques sur les histones à proximité. Le SET domaine de NSD1 induit la méthylation du résidu lysine 36 de l'histone H3 (H3K36) et les domaines FG répétés de *NUP98* recrutent les protéines CBP/p300 à activité acétyltransférase entraînant l'acétylation des histones H3/H4. Dans cette configuration de méthylation et d'acétylation, la région promotrice des gènes *HOXA* favorise leur transcription. De plus, l'activité répressive du complexe EZH2 est inhibée : il ne peut exercer son activité de méthylation du résidu K27 de l'histone 3 (66).

Le profil d'expression moléculaire des LAM *NUP98-KDM5A* a récemment été étudié par Noort *et al.*. Obtenu par RNAseq, il confirme la surexpression des gènes *HOXA* et *HOXB* induite par les réarrangements de *NUP98* mais cependant il pointe quelques différences entre les sous-groupes *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A* (Figure 16). Parmi les gènes étudiés, la surexpression de *E2F* et *FLT3* et la diminution d'expression de *TP53* et *HDAC* sont communes entre les réarrangements *NUP98-KDM5A* et *NUP98-NSD1*. En revanche, certaines voies de signalisation et leurs cibles respectives ont un profil d'expression opposé entre ces deux groupes : *STAT5*, *NF1* et *NOTCH1* sont surexprimées dans les LAM *NUP98-NSD1* tandis qu'elles ne le sont pas dans les LAM *NUP98-KDM5A* (65).

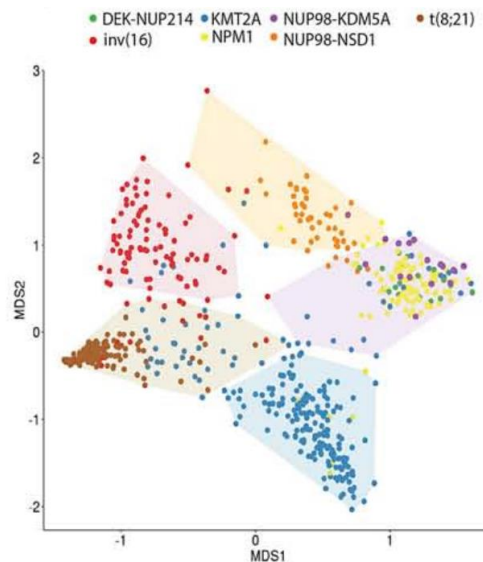


Figure 16 : Expression des gènes HOXA et HOXB selon les groupes de LAM, Coordinate analysis par Noort *et al.* (65)

g. CDK6 comme cible thérapeutique

Le très mauvais pronostic et l'absence de thérapeutique spécifique des réarrangements de *NUP98* ont poussé à chercher de nouvelles stratégies dans le traitement de ce sous-groupe de LAM. Comme décrit par Hollink *et al.* et Noort *et al.*, un profil d'expression bien particulier semble être un point commun entre les LAM porteuses de réarrangement de *NUP98*. C'est dans cette optique que Schmoellerl *et al.* ont étudié les profils d'expression de modèles murins porteurs des transcrits *NUP98-NSD1*, *NUP98-JARID1A* (ou *NUP98-KDM5A*) et *NUP98-DDX10* et ont tenté de découvrir une cible critique.

Les fusions de *NUP98* transplantés aux modèles murins reproduisent les caractéristiques phénotypiques des LAM (pathologie agressive associant notamment cytopénies et envahissement médullaire) et transcriptionnelles (expression de gènes des précurseurs myéloïdes et granulocytaires témoignant de l'appartenance à une lignée hématopoïétique immature, et surexpression des gènes *HOXA*, comme décrit dans les LAM *NUP98* humaines). En l'absence d'intervention, les souris meurent en quelques jours. En revanche l'inactivation du plasmide comportant le réarrangement de *NUP98* entraîne une régression tumorale et induit la différenciation myéloïde, preuve de l'oncogénicité des transcrits *NUP98*.

Secondairement, Schmoellerl *et al.* ont recherché les cibles d'expression communes des transcrits *NUP98*. En étudiant de façon séquentielle les modifications transcriptionnelles dans la cellule à 3 jours puis à 5 jours après l'inactivation du transcrit, ils mettent en évidence des cibles directes et des cibles plus indirectes. En confondant les données de RNA-Seq et de ChIP-seq, CDK6 se présente comme une cible directe des transcrits *NUP98* à l'origine de la régulation de nombreux gènes inclus dans la signature transcriptionnelle des fusions de *NUP98*. Les modèles *in vivo* permettent de confirmer son implication dans la leucémogénèse : son inhibition entraîne un arrêt de la prolifération, l'induction de l'apoptose et la différenciation des cellules.

Une molécule, le palbociclib, inhibiteur de CDK6 déjà indiqué dans le cancer du sein, a été testée *in vivo* et montre un effet temps et concentration dépendants sur les souris *NUP98-KDM5A* et *NUP98-NSD1* avec une augmentation significative de leur survie. Ces résultats sont très prometteurs et bien que la perte de *RB1* et des mutations de *TP53* puissent expliquer une résistance au traitement dans certains cas, l'opportunité de ce traitement pour les LAM *NUP98* aux pronostics catastrophiques mérite d'être étudié (67).

II. OBJECTIFS

Devant les enjeux prometteurs de la maladie résiduelle des LAM pour juger de l'efficacité thérapeutique, du risque de rechute et de sous-groupes de mauvais pronostic, il paraît intéressant de développer le suivi de cibles moléculaires spécifiques des LAM.

Les transcrits *NUP98* dans les LAM apparaissent comme des cibles de choix pour le suivi de la MRD. Ils sont hautement spécifiques de la maladie et leur fréquence est relativement élevée chez les patients pédiatriques et adultes jeunes leur associant généralement un pronostic défavorable.

D'un point de vue technique, l'utilisation de la PCR digitale semble judicieuse pour la quantification des transcrits *NUP98*. Hautement sensible, elle permet également de pallier l'absence de kits de PCR temps-réel, indisponibles en raison de la pluralité des partenaires de *NUP98* et de la fréquence relativement basse de ces réarrangements à l'échelle de toutes les leucémies aigües myéloïdes.

L'objet de ce travail est de démontrer la cohérence et la potentielle plus-value d'un suivi de la maladie résiduelle des transcrits *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A*, chez des patients atteints de LAM.

III. MATERIEL ET METHODES

1. Analyse bibliographique

Une revue de la littérature sur les principaux marqueurs moléculaires de maladie résiduelle des LAM (*RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, *WT1*, *PML-RARA*, mutations de *NPM1*) a été faite, se concentrant surtout sur les études de cohortes des groupes européens et américains.

Le gène *NUP98* et ses réarrangements, les hypothèses de la pathogénicité de ses transcrits et les intérêts thérapeutiques qui en découlent ont été recherchés par une analyse bibliographique utilisant les bases de données PubMed, GeneBank, Gene Cards, UniProt, UCSC et l'atlas de génétique et cytogénétique en oncologie et hématologie.

2. Détection des réarrangements de *NUP98*

Les fusions de *NUP98* ont été identifiées par biologie moléculaire en utilisant la technique de RT-MLPA décrite par Ruminy *et al.*, appliquée sur les échantillons de diagnostic des patients. Préalablement à cette technique les échantillons (sang et moelle sur tube EDTA) doivent être préparés selon plusieurs étapes successives : isolement cellulaire, extraction de l'ARN, rétrotranscription.

■ Isollements cellulaires

A partir des hématies, plaquettes et leucocytes présents dans l'échantillon primaire, l'isolement des leucocytes est essentiel puisqu'ils constituent les cellules d'intérêt dans les leucémies aigües. Le protocole d'isolement suit les étapes suivantes :

- Lyse des hématies par tampon de lyse 45 mL (chlorure d'ammonium)
- Incubation de 15 minutes
- Centrifugation 10 min 3000 tours/min à 4°C
- Elimination du surnageant, mise en suspension du culot cellulaire dans 45 mL de solution de lavage.
- Centrifugation 10 min 3000 tours/min à 4°C. Reprise du culot dans 10 mL de solution de lavage.
- Numération des leucocytes sur l'automate Horiba.
- Elimination du surnageant, remise en suspension dans la solution de lavage, répartition de la suspension en aliquots (5 ou 10 millions de cellules par aliquot)
- Centrifugation des aliquots 4 minutes, 12000 tours/min à 4°C
- Elimination du surnageant, reprise des culots dans 1 mL de TRIzol (extraction manuelle) ou 200 microlitres de solution de travail (extraction sur l'automate Maxwell)
- Conservation à -80°C des culots cellulaires

■ Extraction de l'ARN

En technique manuelle, l'extraction de l'ARN à partir de l'isolement cellulaire suit les étapes suivantes :

- Décongélation lente

- Ajout de 200 microlitres de chloroforme
- Centrifugation 15 minutes, 12000 G à 4°C
- Obtention de trois phases : ARN en phase aqueuse supérieure, protéines phase intermédiaire, ADN en phase inférieure
- Précipitation de l'ARN par 500 microlitres d'isopropanol froid
- Congélation 1h à -20°C
- Centrifugation 30 minutes, 12000 G à 4°C
- Elimination du surnageant, lavage du précipitat à l'éthanol 75% froid
- Centrifugation (immédiate) 5 minutes, 7500 G à 20°C, élimination du surnageant et séchage 30 min à l'air libre
- Dissolution du culot d'ARN dans 20 microlitres d'eau DNase free
- Stockage à 4°C pour dosage dans la journée, sinon -80°C

En technique semi-automatisée, l'extraction par l'automate Maxwell 16 Instrument se fait à partir du kit Maxwell 16 LEV simply RNA Cells (Promega) dans lequel les cellules vont passer dans plusieurs bains de réactif par l'intermédiaire de billes magnétiques. L'ARN extrait est récupéré dans de l'eau DNase/RNase free, stockable dans les mêmes conditions que l'ARN extrait manuellement. Ce dosage est plus rapide et l'ARN extrait est de très bonne qualité. Toutefois, son application n'est pas toujours possible.

- Dosage et normalisation des ARN extraits

Les extraits sont dosés par spectrophotométrie sur l'appareil DropSense, puis normalisés autant que possible à une concentration de 100 ng/microlitres.

- Rétro-transcription et PCR multiplex dépendante de la ligation

Mise au point par Ruminy *et al.* et publiée en 2016, la LD-RTPCR ou RT-PCR dépendante de la ligation a pour objectif d'identifier les fusions récurrentes des leucémies aigües bien que parfois rares (21).

Concrètement, la technique se décompose en plusieurs étapes. D'abord la rétro-transcription, c'est-à-dire la synthèse d'un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à l'ARN par l'intermédiaire d'une ADN polymérase ARN dépendante (aussi appelée rétro-transcriptase). Ensuite, les amorces vont s'hybrider sur leur gène cible. L'ajout de la ligase détermine une étape clé : l'apposition côte à côte de deux amorces sur deux gènes ayant fusionnés permet la ligation des amorces entre elles par la ligase. Une étape de PCR vient amplifier la fusion à partir des extrémités des amorces qui possèdent une séquence commune (Figure 17). Le séquençage par la technique de Sanger puis l'analyse de ces séquences permettent de conclure à la présence d'un transcrit de fusion chez le patient ou non.

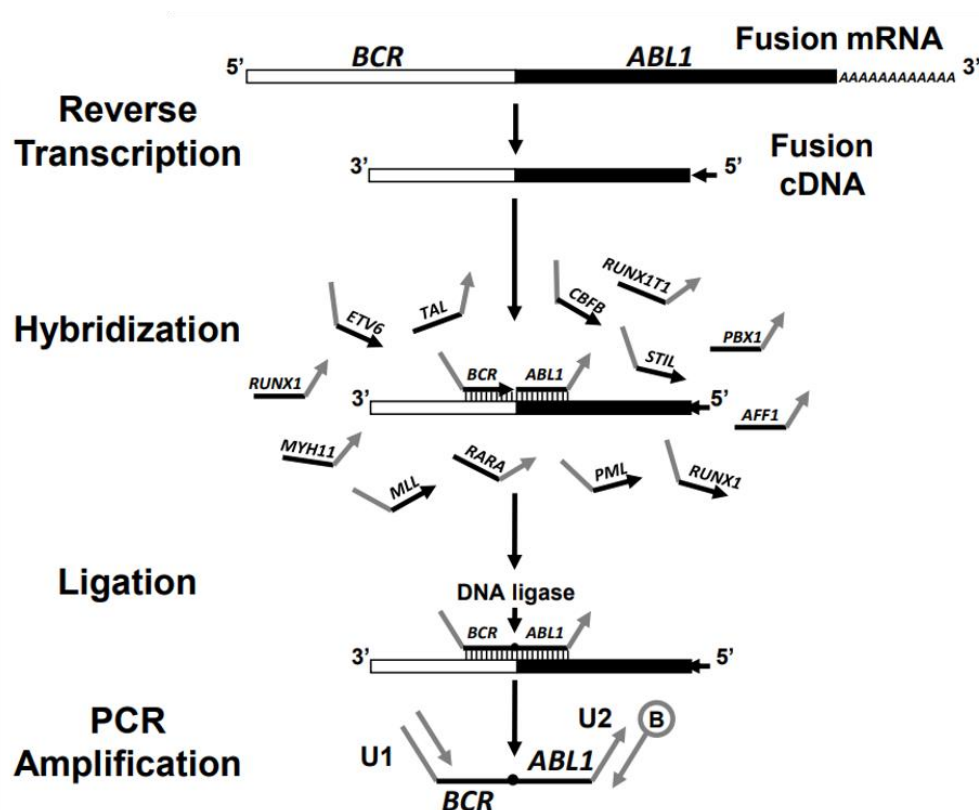


Figure 17 : Etapes de la LD-RT-PCR, d'après Ruminy *et al.* (21)

Les 153 amorces contenues dans la méthode ciblent plus de cinquante gènes qui interviennent dans les remaniements des leucémies ainsi que trois mutations de NPM1. Les points de cassures dans les gènes étant souvent localisés dans les régions introniques, le recours à l'ARN pour cette technique est donc avantageux/judicieux : une fusion rapproche les deux mêmes exons tandis que le point de cassure dans l'intron diffère d'un patient à l'autre. De plus, trouver une fusion sur l'ARN implique que cet ARN est exprimé dans la cellule ce qui constitue un argument de pathogénicité du remaniement. Même si un grand nombre de translocations est identifiable au caryotype conventionnel, la résolution limitée de certains cas et les translocations cryptiques peuvent échapper à l'analyse. L'utilisation de la FISH serait théoriquement une alternative à leurs détections, mais en pratique il n'est pas réalisable de rechercher une cinquantaine de réarrangements (coût et temps considérables), seules les translocations ayant un impact pronostique majeur seront recherchées par FISH et en l'absence d'anomalies classantes sur le caryotype.

Il est à noter que cette technique possède des limites de sensibilité, l'échantillon de départ doit donc contenir au moins 20% de cellules tumorales.

3. Sélection des échantillons

Les analyses de RT-MLPA réalisées par le laboratoire d'hématologie du CHU de Lille ont été extraites entre le 1^{er} janvier 2017 et 3 août 2020. Elles consistent au recueil de près de 3000 résultats. Cette

analyse étant effectuée au diagnostic de leucémies aigües (incluant les LAL), le nombre annuel moyen de RT-MLPA pour les LAM est estimé à 650.

Les réarrangements impliquant *NUP98* ont été recensés. Les fusions *NUP98-NSD1* (18 patients), *NUP98-KDM5A* (3 patients), *NUP98-TOP1* (2 patients), *NUP98-KMT2A* (1 patient) et *NUP98-DDX10* (2 patients) ont été mises en évidence et ont donné suite à une extraction des échantillons disponibles par patient (diagnostic et prélèvements de suivi).

4. PCR digitale en émulsion : quantification des transcrits *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A*

a. Design du système

Le système de PCR idéal pour la quantification d'un transcrit de fusion utilise une amorce de part et d'autre du point de cassure et une sonde sur la jonction des deux gènes. L'amorce sens sur le premier gène impliqué, l'amorce antisens sur le deuxième gène impliqué et la sonde sur le point de cassure garantissent la spécificité du produit de PCR amplifié. Le fluorochrome FAM est privilégié pour le transcrit en raison d'une fluorescence légèrement supérieure au fluorochrome HEX, qui sera alors réservé pour la détection du gène contrôle dont la présence dans l'échantillon est censée être relativement constante.

Le fournisseur Eurofins propose un service de design de système en ligne, modulable suivant la température T_m souhaitée, la taille des amorces et du produit de PCR souhaitée et d'autres paramètres pouvant intervenir dans les conditions de la PCR. La T_m ou « melting temperature » est la température à laquelle la moitié des amorces est hybridée à sa cible et l'autre moitié est libre, elle tient compte de la richesse en nucléotides GC et est calculée en utilisant la formule de Baldino *et al.* corrigée par Rychlik *et al.* (68,69).

Dans le cas des systèmes de *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A*, les T_m choisis doivent être proches des T_m du système utilisé pour quantifier le gène contrôle *ABL* puisque la PCR est effectuée en multiplex.

Tableau 5 : Amorces et sondes utilisées pour les systèmes *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A*.

Système ddPCR <i>NUP98-NSD1</i>		Séquence
<i>NUP98</i> exon 12	Amorce S	TTGGGGCCCCCTGGATTTAATAC
<i>NSD1</i> exon 6	Amorce AS	GCTTCCTAAGGCGTTTCTTCTC
Jonction <i>NUP98-NSD1</i>	Sonde FAM	CCCCCAGGCCCCAGTAGCTGTGCGGT
<i>ABL1</i> exon 2	Amorce S	TGGAGATAACACTCTAAGCATACTAAAGGT
<i>ABL1</i> exon 3	Amorce AS	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>ABL1</i> exon 3	Sonde HEX	CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT

Système ddPCR <i>NUP98-KDM5A</i>		Séquence
<i>NUP98</i> exon 13	Amorce S	CCAGCAGCACATCAATAGTC
<i>KDM5A</i> exon 27	Amorce AS	TTCCGTTTCCGTTTCTTCTC
<i>KDM5A</i> exon 27	Sonde FAM	TCTCTTCATGCTGTCATCCTCTTCCTTCT
<i>ABL1</i> exon 2	Amorce S	TGGAGATAAACTCTAAGCATAACTAAAGGT
<i>ABL1</i> exon 3	Amorce AS	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA
<i>ABL1</i> exon 3	Sonde HEX	CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT

b. Mode opératoire

Le mix réactionnel (ddPCR Supermix for Probes (No dUTP) 2X, amorces et sondes) et les échantillons des patients sont préparés puis insérés dans l'automate QX200 Automated Droplet Generator. L'échantillon et le mix réactionnel en solution aqueuse sont fractionnés en gouttelettes « eau dans huile » grâce à la cartouche à émulsion DG32 Automated Droplet Generator Cartridges (Figure 18A). L'émulsion est composée de milliers de gouttelettes contenant en théorie 0, 1 ou 2 fragments d'ADN (séquence cible et séquence contrôle) (Figure 18B), cependant elles contiennent parfois plus de 2 fragments, ce qui sera pris en compte par l'estimation de la loi de Poisson (cf. page 63). Les échantillons en émulsion sont très fragiles, la plaque est thermoscellée en prenant soin de garder les émulsions à 4°C puis la PCR doit être lancée dans l'heure après la génération de l'émulsion. La PCR est réalisée sur le thermocycleur T100 Thermal Cycler, pour une durée de 2 heures selon le protocole de température suivant :

- 10 minutes à 95°C : phase d'activation de la Taq polymérase (étape 1)
- 30 secondes à 94°C : dénaturation initiale (étape 2)
- 1 minute à 58°C : hybridation des amorces et élongation des séquences par la Taq polymérase (étape 3)
- 10 minutes à 98°C : inactivation de l'enzyme (étape 4)
- Mise à 12°C jusqu'à récupération des échantillons (étape 5)

Ce protocole inclut 40 cycles de dénaturation-hybridation, soit 40 répétitions des étapes 2 et 3 réalisées entre les étapes 1 et 4.

Le système de PCR employé utilise des sondes à hydrolyse Taqman dont le principe est illustré sur la Figure 18C. La lecture par l'automate QX200 Droplet Reader consiste à la détection de la fluorescence présente dans chaque gouttelette (Figure 18D). Elle peut être faite immédiatement après la PCR mais l'optimisation de la technique a montré qu'une conservation à 4°C de la plaque après PCR pendant une

nuit favorisait une homogénéisation de la taille de gouttelettes améliorant ainsi le nombre de gouttelettes interprétables et donc la sensibilité de la méthode. La visualisation des résultats se fait sur le logiciel QuantaSoft (Figure 18).

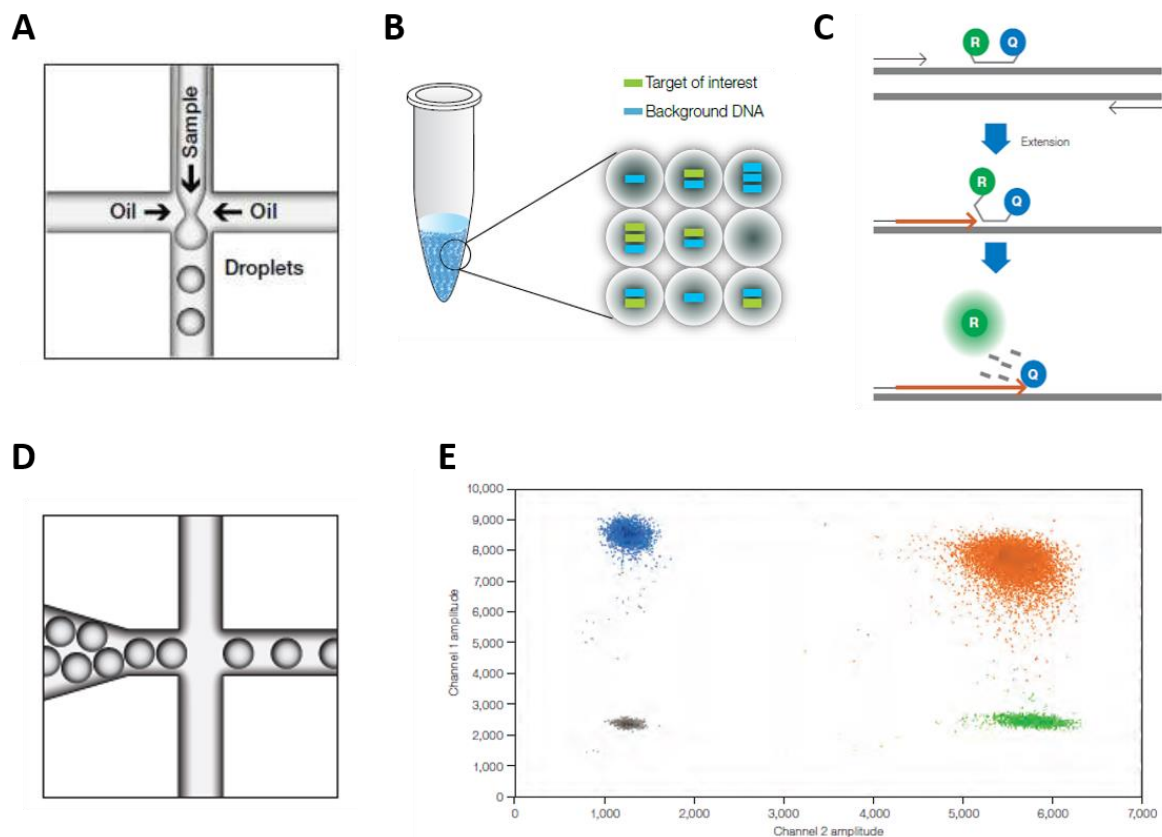


Figure 18 : Les étapes de la PCR digitale en émulsion, d'après Bio-Rad.

A : fractionnement du milieu réactionnel **B** : Emulsion d'un échantillon, les gouttelettes contiennent la cible, le contrôle, les deux ou sont vides **C** : PCR sonde à hydrolyse Taqman. Hybridation de la sonde. Le Reporter (R) et Quencher (Q) sont à proximité, il n'y a pas de fluorescence. Elongation du brin complémentaire, hydrolyse de la sonde, le Reporter et le Quencher sont éloignés : fluorescence du Reporter **D** : lecture des gouttelettes **E** : visualisation des gouttelettes sur QuantaSoft. En gris : gouttelettes vides, en bleu : gouttelettes avec cible amplifiée, en vert : gouttelettes avec contrôle amplifié, en orange : gouttelettes avec cible et contrôle amplifiés

c. Optimisation de la ddPCR : température optimale d'hybridation

Malgré les calculs théoriques des T_m des amorces, le système PCR doit être testé pour déterminer la température optimale d'hybridation. La température est optimale quand les gouttelettes positives et négatives sont bien séparées sur la représentation graphique ci-dessous (Figure 19). Une température trop faible génère une hybridation non spécifique des amorces sur l'ADN tandis qu'une température trop importante diminue le rendement de la PCR.

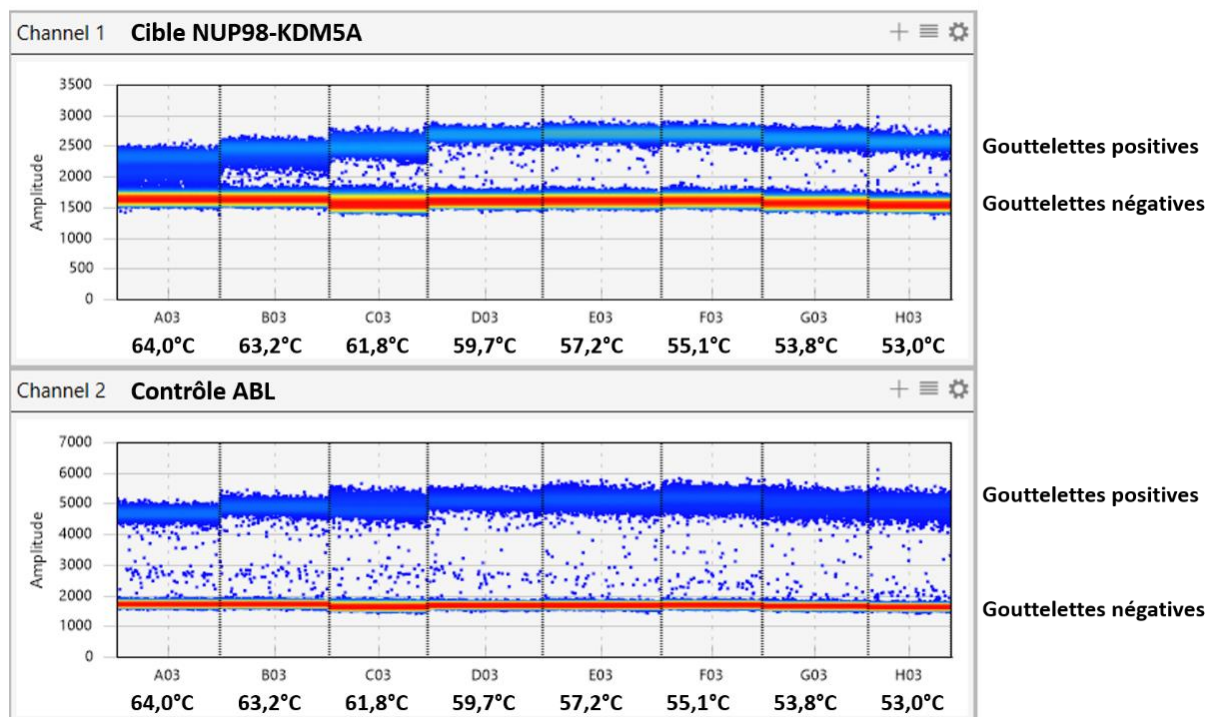


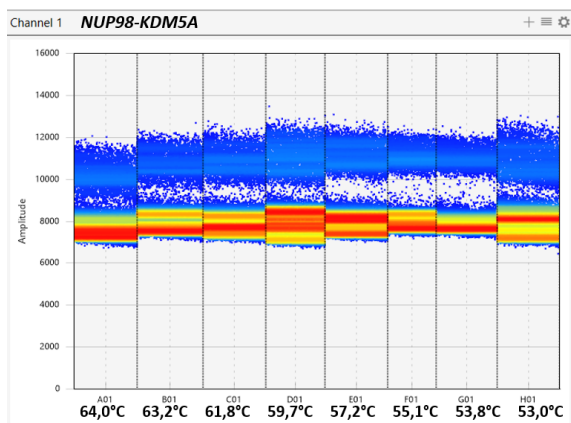
Figure 19 : Gradient de température des puits A (64,0°C) à H (53,0°C) pour le transcrit *NUP98-KDM5A*

La température optimale retenue est 58°C pour les deux systèmes *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A*.

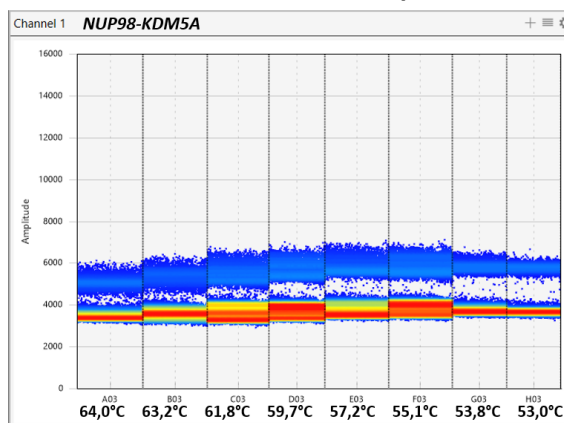
d. Optimisation de la ddPCR : dilution des sondes

La bonne séparation des gouttelettes négatives et positives peut être conditionnée par la dilution de la sonde. Dans certains systèmes, la séparation est optimale en utilisant la sonde fournie sans dilution préalable, c'est le cas du système *NUP98-NSD1*. En revanche, la sonde non diluée ne convient pas au système *NUP98-KDM5A* : les gouttelettes négatives et positives ne sont pas bien séparées lorsque la sonde n'est pas diluée, ou sont insuffisamment séparées à la dilution au demi et ce quelque soit la température d'hybridation (Figure 20). La dilution retenue pour le système *NUP98-KDM5A* est 1/5^{ème}.

Sonde dilution au pur



Sonde dilution au 1/2



Sonde dilution au 1/5ème

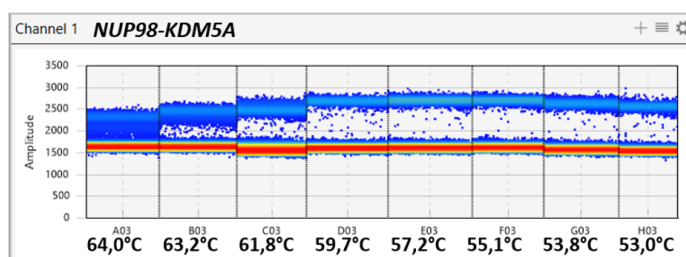


Figure 20 : Visualisation des résultats du système *NUP98-KDM5A* selon le gradient de température pour trois dilutions de sondes différentes : au pur, à gauche ; au demi, à droite ; au cinquième, en bas

e. Détermination des seuils de positivité

Le seuil de positivité détermine le seuil de fluorescence à partir duquel une gouttelette est considérée comme positive. Pour le système *ABL*, le seuil est fixé à 3000. Le seuil de positivité du système *NUP98-NSD1* a été fixé à 6000 et celui de *NUP98-KDM5A* à 2500 (Figure 21).

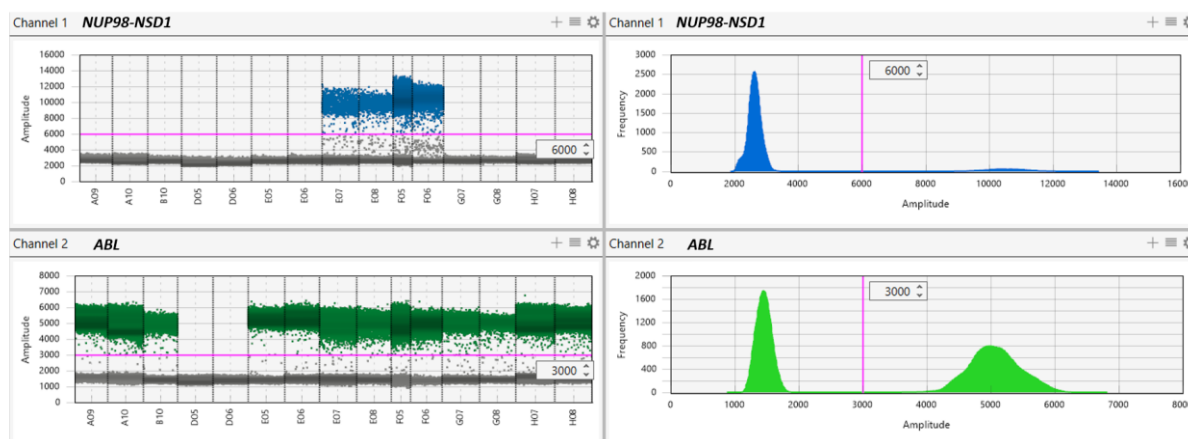


Figure 21 : Résultats d'une série de PCR *NUP98-NSD1* par puits (à gauche) et représentation en histogramme 1D d'un puits (à droite)

f. Loi de Poisson

La loi de Poisson ou loi de probabilité discrète permet d'estimer la probabilité p de contenir au moins une cible dans un compartiment (70). Le compartiment en PCR digitale correspond à une gouttelette.

En considérant m comme le nombre de cibles, et n le nombre de compartiments, la probabilité p que la gouttelette contienne au moins une cible après la distribution est égale à $p = 1 - \left(1 - \frac{1}{n}\right)^m$ en l'approchant par une loi binomiale de paramètres m et p . On l'assimile à un tirage aléatoire de m cibles parmi n compartiments. Le résultat de ce tirage est 1 avec une probabilité de $\frac{1}{n}$ (car il s'agit de tirages indépendants) ou 0.

$p(0)$ la probabilité que le compartiment soit vide est aussi donnée par la loi de Poisson telle que $p(0) = \left(1 - \frac{1}{n}\right)^m$.

Par développement limité pour un nombre n de compartiments suffisants, $\frac{1}{n}$ tend vers 0 donc $p(0) = \left(1 - \frac{1}{n}\right)^m \approx 1 - \frac{m}{n}$. Avec $\lambda = \frac{m}{n}$ alors $p(0) \approx e^{-\lambda}$ (principe de développement limité $e^{-\lambda} = 1 - \lambda$) et donc λ est estimé pour n assez grand par $\lambda = -\ln(p(0))$ avec λ le nombre moyen de cibles dans un compartiment.

En pratique, le nombre de gouttelettes vides $p(0)$ sera connu, ce sont les gouttelettes dites négatives où aucune fluorescence n'aura été observée. Le nombre de gouttelettes contenant au moins une cible p est aussi connu, ce sont celles où la fluorescence aura été détectée. Ces données permettront dans un premier temps d'estimer le nombre moyen de cibles λ dans une gouttelette, puis de corriger la proportion de gouttelettes positives et ainsi de déduire la concentration de la cible dans l'échantillon initial (Figure 22).

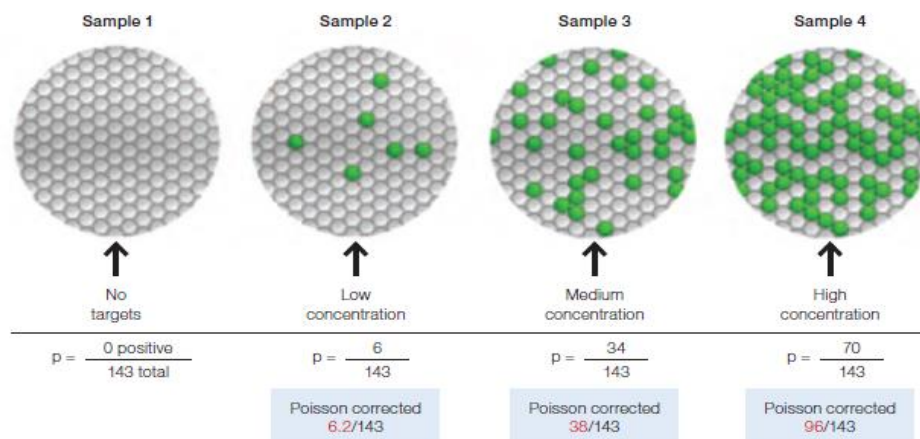


Figure 22 : Représentation schématique de cas pratique de l'estimation du nombre de copies après application de la loi de Poisson, d'après Bio-Rad.

Par exemple, l'échantillon 3 compte 34 gouttelettes positives et 143 gouttelettes totales. L'estimation de λ par la loi de Poisson est de 0,27 soit un nombre de gouttelettes théoriquement positives de 38 au lieu de 34. Le ratio de copies par gouttelettes positives est 1,1 (38/34).

La précision est maximale pour un ratio de 1,6 copies par gouttelette (Figure 23). Au-delà, le coefficient de variation s'accroît en raison de l'erreur de partitionnement (erreur d'estimation du nombre de copies par la loi de Poisson).

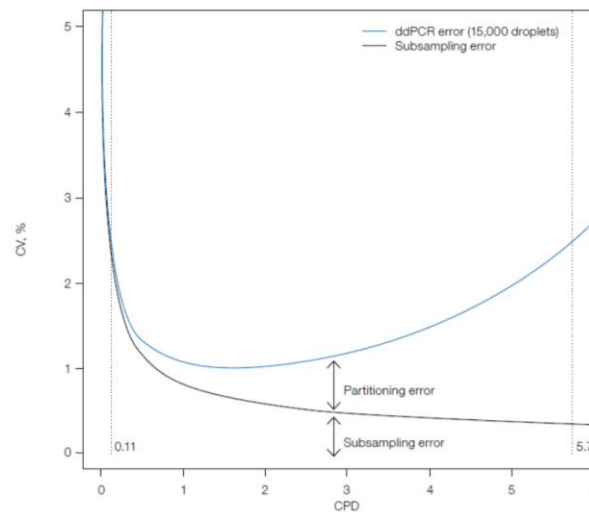


Figure 23 : Représentation graphique des erreurs de partitionnement (courbe bleue) et d'échantillonnage (courbe noire), d'après Bio-Rad.

CV : coefficient de variation, CPD : copies per droplet

g. Validation technique

Avant toute quantification il convient de s'assurer de la validation technique de la méthode. Chaque échantillon est passé en duplicate au sein d'une série qui compte obligatoirement un témoin positif, un témoin négatif et un blanc.

En l'absence de témoin commercial, le témoin positif utilisé est l'échantillon du diagnostic du patient. La présence d'une amplification détectable garantit l'efficacité du système de PCR. Le blanc est évalué par le passage systématique d'un échantillon d'eau en remplacement de l'ADN du patient à chaque série. Il permet également d'apprécier la contamination. Le témoin négatif consiste à l'utilisation d'un ADN chez qui la cible recherchée n'est théoriquement pas présente. Ainsi, pour les transcrits *NUP98*, l'ADN de n'importe quel autre patient peut être utilisé dès lors que ce patient ne présente pas de réarrangement de *NUP98*, l'absence d'amplification dans cet échantillon affirme la spécificité du système pour la cible.

La limite de linéarité du système est établie par la dilution successive de l'échantillon initial du diagnostic du patient. Cette limite garantit la proportionnalité entre la quantification de la cible et la quantité théorique sur une gamme de mesure. Pour les systèmes *NUP98*, tout comme le témoin positif, il n'existe pas de gamme commerciale standardisée. Le recours à l'échantillon diagnostique du patient à partir duquel sera effectuée une dilution en série permettra de vérifier la linéarité de la méthode.

Pour chaque puits il convient de s'assurer que le nombre de gouttelettes analysées est suffisant, un minimum de 15 000 gouttelettes est requis pour considérer applicable l'estimation de la loi de Poisson.

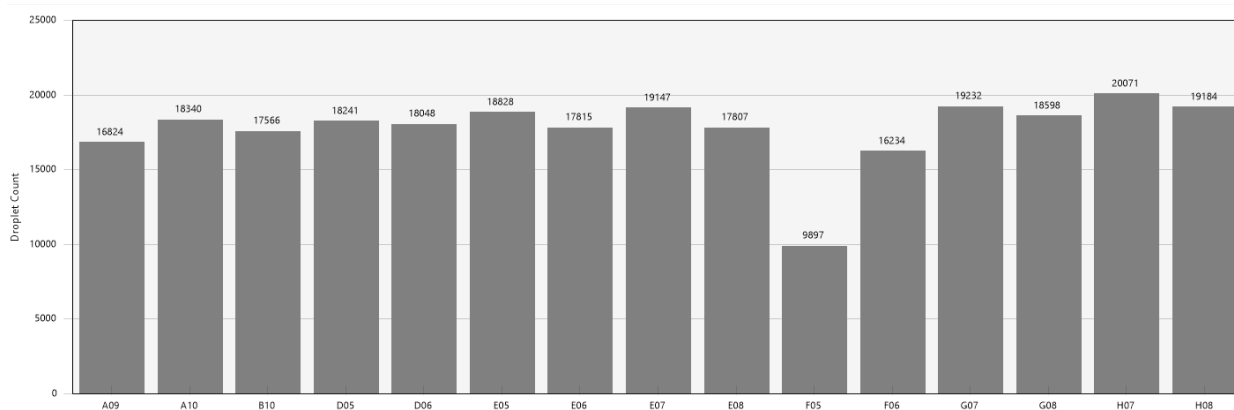


Figure 24 : Histogramme représentant le nombre de gouttelettes dénombrées par puits.
Les puits A9 à H08, hormis le puits F05, ont un nombre suffisant de gouttelettes. Le puits F05 sera exclu de l'analyse.

IV. RESULTATS

1. Patient 1 LAM avec réarrangement *NUP98-KDM5A*

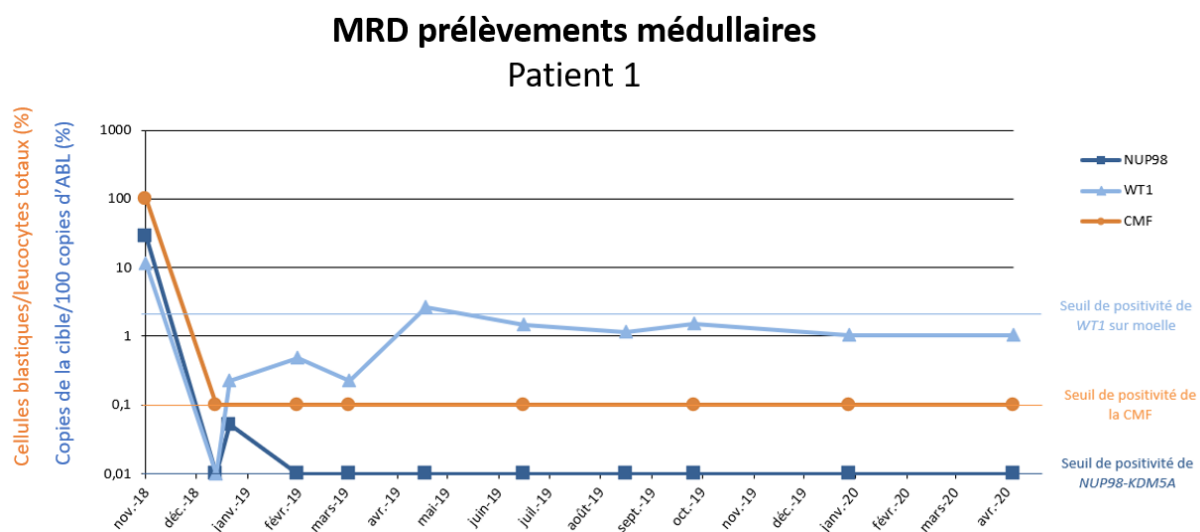


Figure 25 : Représentation graphique de la maladie résiduelle du patient 1

Le patient 1 a bénéficié d'un suivi de sa maladie résiduelle par biologie moléculaire et cytométrie en flux. L'analyse des différents points de suivi auxquels s'ajoutent les quantifications rétrospectives du transcrit *NUP98-KDM5A* par PCR digitale, montre une bonne cohérence entre les différents marqueurs. Toutefois, *WT1* apparaît faiblement positif au point de suivi n°4 alors que le transcrit *NUP98-KDM5A* est bien négatif (Figure 25). Le prélèvement discordant provient d'un échantillon de moelle osseuse, où la présence de *WT1* est physiologique mais dont l'interprétation dans ce cas est délicate.

2. Patient 2 LAM avec réarrangement *NUP98-NSD1*

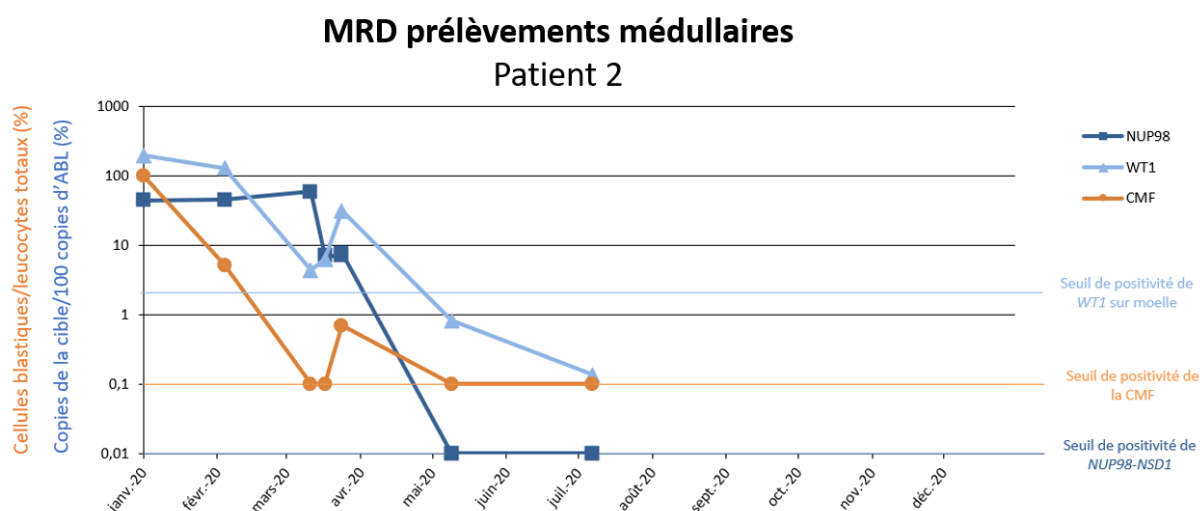


Figure 26 : Représentation graphique de la maladie résiduelle du patient 2

Le patient 2 a été suivi en biologie moléculaire et en cytométrie en flux. Le premier point de suivi retrouve entre les trois marqueurs une MRD positive (Figure 26). En revanche, le deuxième point de

MRD est discordant : la cytométrie retrouve une MRD négative tandis que *WT1* est quantifié au-dessus du seuil de positivité. La quantification ultérieure du transcrit *NUP98-NSD1* à ce point de suivi est également positive, en faveur de la persistance de cellules tumorales dans l'échantillon mais qui n'auraient pas été détectées par la cytométrie. Les points suivants sont cohérents entre eux et ce quelque soit le marqueur.

3. Patient 3 LAM avec réarrangement *NUP98-KDM5A*

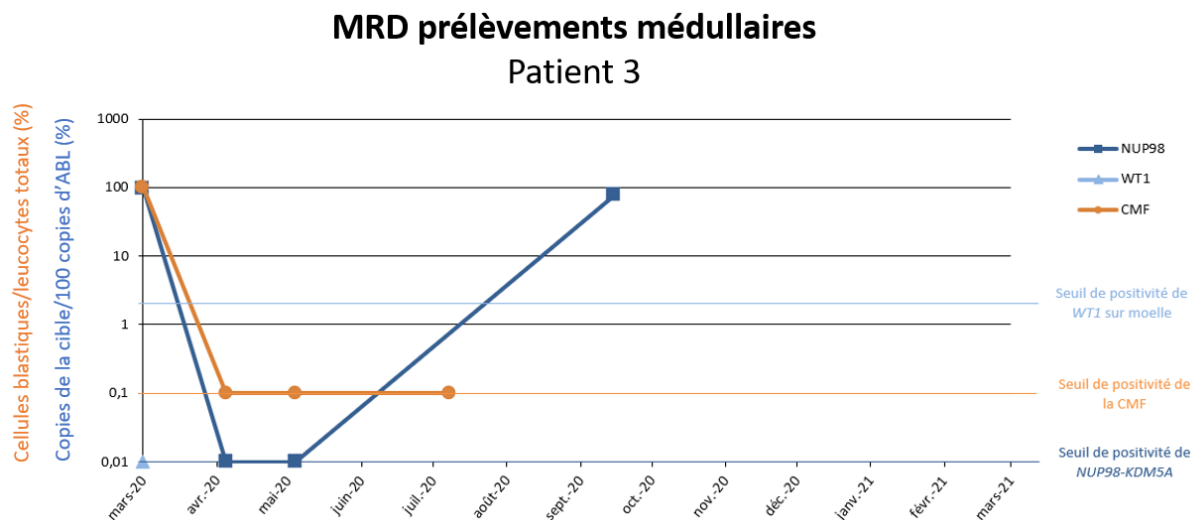


Figure 27 : Représentation graphique de la maladie résiduelle du patient 3

Le patient 3 n'était pas suivable en biologie moléculaire par *WT1*. En revanche, le suivi de la MRD par cytométrie montre un premier point de MRD négatif en faveur d'une rémission moléculaire post-induction qui concorde également avec la quantification négative du transcrit *NUP98-KDM5A* (Figure 27). Le patient 3 a rechuté au mois de septembre : le myélogramme mettait en évidence 15% de blastes à cette date concordant alors avec l'ascension du transcrit *NUP98-NSD1* au point de suivi n°3.

V. DISCUSSION

Le réarrangement de *NUP98* apparaît au travers des études récentes comme un marqueur rare mais récurrent des leucémies aigües myéloïdes pédiatriques et de l'adulte jeune (55,58,59). Il est associé indépendamment des critères habituels à un mauvais pronostic. Les patients présentant ce remaniement ont des survies catastrophiques expliquées d'une part par la résistance qu'il induit aux chimiothérapies (les échecs d'induction sont fréquents chez les patients *NUP98*-réarrangés) et d'autre part par un taux de rechute important.

Contrairement à d'autres anomalies moléculaires dont les pronostics sont connus, les remaniements de *NUP98* ne sont pas systématiquement recherchés au diagnostic des LAM, alors que nombre de ces remaniements sont cryptiques (58,65). La technique de RT-MLPA de Ruminy *et al.* identifie certains réarrangements de *NUP98* mais elle n'est toutefois pas exhaustive (21). Dernièrement, la recherche par sonde FISH des réarrangements de *NUP98* a été introduite en systématique dans les LAM pédiatriques du protocole MyeChild. Le pendant dans la population adulte ne figure pas actuellement dans les protocoles. Le gène *NUP98* est recensé avec plus de trente partenaires différents à l'heure actuelle. En l'absence de recherche systématique du réarrangement de *NUP98*, la fréquence de ses fusions est vraisemblablement sous-estimée et la liste de ses partenaires potentiellement incomplète. L'identification manquée d'un réarrangement de *NUP98* au diagnostic peut être considérée comme une perte de chance pour le patient, entraînant une prise en charge par chimiothérapie longue et coûteuse se soldant souvent par un échec et un recours secondaire et tardif à la greffe.

Les protéines de fusion de *NUP98* semblent se comporter comme des drivers oncogéniques, menant à un blocage de maturation des blastes *in vivo* (66,67). Leurs présences lors des rechutes en font de bons candidats pour le suivi spécifique de la maladie. Sur le même modèle que les transcrits de fusions récurrents, il semble intéressant de poursuivre l'étude de cohortes de patients *NUP98* afin de déterminer les points de suivi pertinents, la nature du prélèvement et les limites d'interprétation de ce transcrit à l'image des travaux réalisés pour *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* et *PML-RARA* (25–28,30,31,33).

Si les cohortes de patients permettent aujourd'hui de connaître les points qui semblent les plus pertinents pour l'évaluation de la MRD et la nature de l'échantillon la plus appropriée, il faut constater qu'il n'existe pas un schéma standard applicable à tous les marqueurs mais que co-existent plusieurs schémas différents selon le marqueur moléculaire suivi (24).

De ces modèles de transcrits que nous connaissons aujourd'hui, la puissance de la MRD a fait ses preuves pour distinguer les patients à haut risque de rechute et ceux chez qui la réponse à la chimiothérapie n'était pas suffisante. La possibilité d'une adaptation thérapeutique précoce voire d'une indication à la greffe est un nouveau champ d'application de la MRD dans ce contexte (72).

Les données de la MRD en post-greffe représentent une autre voie d'application qu'il convient d'étudier à long terme pour conclure à la pertinence clinique qu'elles apportent (25). Les leucémies aigües présentant une fusion de *NUP98* devraient être intéressantes pour étayer la MRD autour de la greffe car elle apparaît comme une des seules thérapeutiques efficaces de ces patients.

Du point de vue technique, la mise en place de la PCR digitale pour le suivi des fusions comme celles impliquant *NUP98* est très prometteuse. Exemple pour le suivi spécifique d'une anomalie moléculaire, elle est toutefois sujette à quelques freins. La spécificité de cette PCR est dépendante d'un design d'amorces autour de l'anomalie, il est important de noter que pour se conformer aux points de suivi actuels et à leur implication pronostique, les résultats de cette PCR doivent être connus à l'issue du premier ou deuxième cycle de chimiothérapie (soit dès 10 jours après le diagnostic). Or, le design et la commande des couples amorces et sondes spécifiques de l'anomalie est d'environ 3 semaines auxquelles s'ajoute un temps technique irréductible. Cela ne prend pas en compte le temps de mise au point que nécessite la technique (dilution des sondes, optimisation de la température d'hybridation des amorces, linéarité de la méthode, ...) ; autant de paramètres qui sont pourtant essentiels pour fournir un résultat de qualité.

Les méthodes d'évaluation de la MRD sont diverses : DfN et LAIP en cytométrie, Q-PCR, dPCR et prochainement NGS en biologie moléculaire. Les recommandations actuelles encouragent le croisement entre les différentes sources. Cependant, il n'y a pas de consensus sur les conduites à tenir en cas de discordance entre ces résultats. Le patient 2 de notre étude illustre parfaitement la difficulté qui peut surgir quand la quantification cytométrique discorde de la quantification moléculaire. L'explication de ce cas réside dans les données pré-analytiques du prélèvement qui montraient une dilution de l'échantillon : un biais probable était souligné dans l'analyse cytométrique tandis que la biologie moléculaire semblait moins affectée par cette dilution. En biologie moléculaire, la quantification du gène de contrôle ABL est un contrôle interne de l'échantillon : les prélèvements n'atteignant pas un taux de ce transcrit suffisant sont jugés ininterprétables. La fiabilité des techniques concernant la dilution ne serait donc pas équivalente. Qu'en est-il des autres biais ? Sur quels critères est-il possible de juger de la qualité de la mesure de la maladie résiduelle, en cytométrie ? en biologie moléculaire ? Quelles seront les règles décisionnelles privilégiant l'une ou l'autre des techniques ? Ces questions trouveront réponses par l'analyse rigoureuse des grandes cohortes de patients dans les prochaines années.

En vertu des données expérimentales et épidémiologiques recueillies sur les patients décrits, la présence d'un remaniement de *NUP98* est constamment associée à la présence d'une protéine de fusion conservant la partie N-terminale de *NUP98*. Le processus de leucémogénèse induite par cette protéine n'est encore que partiellement élucidé, montrant une interaction avec des séquences régulatrices de l'ADN et un profil d'expression particulier qui en découle. L'étude de l'expression

génique, RNA-Seq notamment, se développe actuellement et montre au travers des LAM *NUP98* qu'elle est un moyen judicieux afin d'identifier des cibles thérapeutiques prometteuses (67).

VI. CONCLUSION

Les leucémies aigües myéloïdes représentent des entités de pathologies aux caractéristiques morphologiques, antigéniques et moléculaires variées. Si les connaissances actuelles permettent de les regrouper en entités distinctes et de les classer dans un sous-groupe pronostique selon leurs caractéristiques, il apparaît que l'identification de leurs anomalies n'est pas exhaustive. Certaines de ces anomalies offrent, comme c'est le cas des réarrangements de *NUP98*, la possibilité de les utiliser comme outils de mesure de la maladie résiduelle spécifique. Le concept de MRD s'ancre désormais dans la prise en charge des patients : à la fois indicateur précoce d'échappement thérapeutique, de pronostic et de risque de rechute. Son évaluation sur des cohortes prospectives ces prochaines années sera déterminante pour préciser et standardiser son application en routine. La PCR digitale représente une excellente technique pour la quantification d'anomalies moléculaires rares du fait de sa spécificité et de ses performances de sensibilité. Bien que le développement en routine pour les transcrits rares ne soit pas complètement applicable à ce jour (notamment pour les premiers points de suivi) il apparaît que le suivi au long cours et en post-greffe soit très prometteur.

Références bibliographiques :

1. Maynadié M, Troussard X. Épidémiologie des leucémies aiguës. Rev Francoph Lab. 1 avr 2015;2015(471):29-33.
2. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. Blood. 1 sept 2002;100(5):1532-42.
3. Kitamura T, Watanabe-Okochi N, Enomoto Y, Nakahara F, Oki T, Komeno Y, et al. Novel working hypothesis for pathogenesis of hematological malignancies: combination of mutations-induced cellular phenotypes determines the disease (cMIP-DD). J Biochem (Tokyo). janv 2016;159(1):17-25.
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 17 sept 2015;373(12):1136-52.
5. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. N Engl J Med. 30 mai 2013;368(22):2059-74.
6. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. Blood. 7 janv 2016;127(1):29-41.
7. Falini B. Acute myeloid leukemia with mutated nucleophosmin (NPM1): molecular, pathological, and clinical features. Cancer Treat Res. 2010;145:149-68.
8. Rinke J, Chase A, Cross NCP, Hochhaus A, Ernst T. EZH2 in Myeloid Malignancies. Cells. 8 juill 2020;9(7).
9. Winters AC, Bernt KM. MLL-Rearranged Leukemias-An Update on Science and Clinical Approaches. Front Pediatr. 2017;5:4.
10. Cuartero S, Innes AJ, Merkschlager M. Towards a Better Understanding of Cohesin Mutations in AML. Front Oncol. 2019;9:867.
11. Thol F, Bollin R, Gehlhaar M, Walter C, Dugas M, Suchanek KJ, et al. Mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia: clinical and prognostic implications. Blood. 6 févr 2014;123(6):914-20.
12. Kon A, Shih L-Y, Minamino M, Sanada M, Shiraishi Y, Nagata Y, et al. Recurrent mutations in multiple components of the cohesin complex in myeloid neoplasms. Nat Genet. oct 2013;45(10):1232-7.
13. Mazumdar C, Majeti R. The role of mutations in the cohesin complex in acute myeloid leukemia. Int J Hematol. janv 2017;105(1):31-6.
14. Kim E, Ilagan JO, Liang Y, Daubner GM, Lee SC-W, Ramakrishnan A, et al. SRSF2 Mutations Contribute to Myelodysplasia Through Mutant-Specific Effects on Exon Recognition. Cancer Cell. 11 mai 2015;27(5):617-30.
15. Panuzzo C, Signorino E, Calabrese C, Ali MS, Petiti J, Bracco E, et al. Landscape of Tumor Suppressor Mutations in Acute Myeloid Leukemia. J Clin Med. 16 mars 2020;9(3).
16. Jaiswal S, Fontanillas P, Flannick J, Manning A, Grauman PV, Mar BG, et al. Age-related clonal hematopoiesis associated with adverse outcomes. N Engl J Med. 25 déc 2014;371(26):2488-98.

17. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.
18. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. août 1976;33(4):451-8.
19. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposed revised criteria for the classification of acute myeloid leukemia. A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*. oct 1985;103(4):620-5.
20. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 22 juill 2010;116(3):354-65.
21. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. mars 2016;30(3):757-60.
22. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2391-405.
23. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 22 mars 2018;131(12):1275-91.
24. Dix C, Lo T-H, Clark G, Abadir E. Measurable Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia Using Flow Cytometry: A Review of Where We Are and Where We Are Going. *J Clin Med*. 3 juin 2020;9(6):1714.
25. Preudhomme C. Place de la maladie résiduelle dans la prise en charge des leucémies aiguës myéloïdes. 2019;25:14.
26. Duployez N, Preudhomme C. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab*. avr 2015;2015(471):51-64.
27. Willekens C, Blanchet O, Renneville A, Cornillet-Lefebvre P, Pautas C, Guieze R, et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica*. 1 mars 2016;101(3):328-35.
28. Balsat M, Renneville A, Thomas X, de Botton S, Caillot D, Marceau A, 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*. 10 janv 2017;35(2):185-93.
29. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, Delabesse E, Renneville A, Cornillet P, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 21 mars 2013;121(12):2213-23.
30. Yin JAL, O'Brien MA, Hills RK, Daly SB, Wheatley K, Burnett AK. Minimal residual disease monitoring by quantitative RT-PCR in core binding factor AML allows risk stratification and

predicts relapse: results of the United Kingdom MRC AML-15 trial. *Blood*. 4 oct 2012;120(14):2826-35.

31. Miyamoto T, Weissman IL, Akashi K. AML1/ETO-expressing nonleukemic stem cells in acute myelogenous leukemia with 8;21 chromosomal translocation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 20 juin 2000;97(13):7521-6.
32. Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, Thiede C, Paoloni F, Vignetti M, et al. Improved Outcomes With Retinoic Acid and Arsenic Trioxide Compared With Retinoic Acid and Chemotherapy in Non-High-Risk Acute Promyelocytic Leukemia: Final Results of the Randomized Italian-German APL0406 Trial. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 20 févr 2017;35(6):605-12.
33. Grimwade D, Jovanovic JV, Hills RK, Nugent EA, Patel Y, Flora R, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 août 2009;27(22):3650-8.
34. Lo Coco F, Diverio D, Avvisati G, Petti MC, Meloni G, Pogliani EM, et al. Therapy of molecular relapse in acute promyelocytic leukemia. *Blood*. 1 oct 1999;94(7):2225-9.
35. Cicconi L, Fenaux P, Kantarjian H, Tallman M, Sanz MA, Lo-Coco F. Molecular remission as a therapeutic objective in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. 2018;32(8):1671-8.
36. Bataller A, Oñate G, Diaz-Beyá M, Guijarro F, Garrido A, Vives S, et al. Acute myeloid leukemia with *NPM1* mutation and favorable European LeukemiaNet category: outcome after preemptive intervention based on measurable residual disease. *Br J Haematol*. 8 juin 2020;bjh.16857.
37. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, Jovanovic JV, Gilkes A, Grech A, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 4 févr 2016;374(5):422-33.
38. Ariyaratana S, Loeb DM. The role of the Wilms tumour gene (WT1) in normal and malignant haematopoiesis. *Expert Rev Mol Med*. mai 2007;9(14):1-17.
39. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, Hills RK, Daly S, Jovanovic JV, 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*. 1 nov 2009;27(31):5195-201.
40. Lambert J, Lambert J, Thomas X, Marceau-Renaut A, Renneville A, Coude M-M, et al. Early Detection of WT1 minimal Residual Disease Predicts Outcome in Acute Myeloid Leukemia and Identify Patients with High Risk of Relapse Independently of Allogeneic Stem Cell Transplantation. *Blood*. 7 déc 2017;130(Supplement 1):29-29.
41. Cilloni D, Petiti J, Rosso V, Andreani G, Dragani M, Fava C, et al. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR? *Int J Mol Sci*. 7 mai 2019;20(9):2249.
42. C. Tse, J. Capeau. Quantification des acides nucléiques par PCR quantitative en temps réel. *Ann Biol Clin (Paris)*. 1 mai 2003;61(3):279-93.
43. Jentzsch M, Schwind S, Bach E, Stasik S, Thiede C, Platzbecker U. Clinical Challenges and Consequences of Measurable Residual Disease in Non-APL Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 23 oct 2019;11(11):1625.
44. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*. 8 déc 2011;118(24):6247-57.

45. Lam D, Aplan P. NUP98 gene fusions in hematologic malignancies. *Leukemia*. nov 2001;15(11):1689-95.
46. Michmerhuizen NL, Klcio JM, Mullighan CG. Mechanistic insights and potential therapeutic targets for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood*. 7 août 2020;blood.2020007093.
47. Sump B, Brickner JH. Nup98 regulation of histone methylation promotes normal gene expression and may drive leukemogenesis. *Genes Dev*. 15 nov 2017;31(22):2201-3.
48. Franks TM, McCloskey A, Shokhirev MN, Benner C, Rathore A, Hetzer MW. Nup98 recruits the Wdr82–Set1A/COMPASS complex to promoters to regulate H3K4 trimethylation in hematopoietic progenitor cells. *Genes Dev*. 15 nov 2017;31(22):2222-34.
49. Kalverda B, Pickersgill H, Shloma VV, Fornerod M. Nucleoporins Directly Stimulate Expression of Developmental and Cell-Cycle Genes Inside the Nucleoplasm. *Cell*. févr 2010;140(3):360-71.
50. Nakamura T, Largaespada DA, Lee MP, Johnson LA, Ohyashiki K, Toyama K, et al. Fusion of the nucleoporin gene NUP98 to HOXA9 by the chromosome translocation t(7;11)(p15;p15) in human myeloid leukaemia. *Nat Genet*. févr 1996;12(2):154-8.
51. Borrow J, Shearman AM, Stanton VP, Becher R, Collins T, Williams AJ, et al. The t(7;11)(p15;p15) translocation in acute myeloid leukaemia fuses the genes for nucleoporin NUP98 and class I homeoprotein HOXA9. *Nat Genet*. févr 1996;12(2):159-67.
52. Thorsteinsdottir U, Sauvageau G, Humphries RK. HOX HOMEODOMAIN GENES AS REGULATORS OF NORMAL AND LEUKEMIC HEMATOPOIESIS. *Hematol Oncol Clin North Am*. 1 déc 1997;11(6):1221-37.
53. Sauvageau G, Lansdorp PM, Eaves CJ, Hogge DE, Dragowska WH, Reid DS, et al. Differential expression of homeobox genes in functionally distinct CD34+ subpopulations of human bone marrow cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 6 déc 1994;91(25):12223-7.
54. Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB, Loken MR, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. NUP98/NSD1 and FLT3/ITD coexpression is more prevalent in younger AML patients and leads to induction failure: a COG and SWOG report. *Blood*. 9 oct 2014;124(15):2400-7.
55. Struski S, Lagarde S, Bories P, Puiseux C, Prade N, Cuccini W, et al. NUP98 is rearranged in 3.8% of pediatric AML forming a clinical and molecular homogenous group with a poor prognosis. *Leukemia*. mars 2017;31(3):565-72.
56. Kwong YL, Pang A. Low frequency of rearrangements of the homeobox gene HOXA9/t(7;11) in adult acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer*. mai 1999;25(1):70-4.
57. Chou W-C, Chen C-Y, Hou H-A, Lin L-I, Tang J-L, Yao M, et al. Acute myeloid leukemia bearing t(7;11)(p15;p15) is a distinct cytogenetic entity with poor outcome and a distinct mutation profile: comparative analysis of 493 adult patients. *Leukemia*. juill 2009;23(7):1303-10.
58. Hollink IHIM, van den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood*. 29 sept 2011;118(13):3645-56.
59. Marceau-Renaut A, Duployez N, Ducourneau B, Labopin M, Petit A, Rousseau A, et al. Molecular Profiling Defines Distinct Prognostic Subgroups in Childhood AML: A Report From the French ELAM02 Study Group. *HemaSphere*. janv 2018;2(1):e31.

60. Niktoreh N, Walter C, Zimmermann M, von Neuhoff C, von Neuhoff N, Rasche M, et al. Mutated *WT1*, *FLT3-ITD*, and *NUP98-NSD1* Fusion in Various Combinations Define a Poor Prognostic Group in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Oncol*. 30 juill 2019;2019:1-15.
61. Akiki S, Dyer SA, Grimwade D, Ivey A, Abou-Zeid N, Borrow J, et al. NUP98-NSD1 fusion in association with FLT3-ITD mutation identifies a prognostically relevant subgroup of pediatric acute myeloid leukemia patients suitable for monitoring by real time quantitative PCR. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013;52(11):1053-64.
62. Bolouri H, Farrar JE, Triche T, Ries RE, Lim EL, Alonzo TA, et al. The molecular landscape of pediatric acute myeloid leukemia reveals recurrent structural alterations and age-specific mutational interactions. *Nat Med*. janv 2018;24(1):103-12.
63. Ostronoff F, Othus M, Gerbing RB, Loken MR, Raimondi SC, Hirsch BA, et al. NUP98/NSD1 Translocation Further Risk-Stratifies Patients With FLT3/ITD In Acute Myeloid Leukemia: A Report From Children's Oncology Group and SWOG. *Blood*. 15 nov 2013;122(21):488-488.
64. McNeer NA, Philip J, Geiger H, Ries RE, Lavallée V-P, Walsh M, et al. Genetic mechanisms of primary chemotherapy resistance in pediatric acute myeloid leukemia. *Leukemia*. août 2019;33(8):1934-43.
65. Noort S, Wander P, Alonzo TA, Smith J, Ries RE, Gerbing RB, et al. The clinical and biological characteristics of NUP98-KDM5A in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 7 mai 2020;haematol.2019.236745.
66. Wang GG, Cai L, Pasillas MP, Kamps MP. NUP98–NSD1 links H3K36 methylation to Hox-A gene activation and leukaemogenesis. *Nat Cell Biol*. juill 2007;9(7):804-12.
67. Schmoellerl J, Barbosa IAM, Eder T, Brandstoetter T, Schmidt L, Maurer B, et al. CDK6 is an essential direct target of NUP98 fusion proteins in acute myeloid leukemia. *Blood*. 23 juill 2020;136(4):387-400.
68. Baldino F, Chesselet MF, Lewis ME. High-resolution in situ hybridization histochemistry. *Methods Enzymol*. 1989;168:761-77.
69. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*. 11 nov 1990;18(21):6409-12.
70. Quan P-L, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 20 avr 2018;18(4).
71. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of Minimal Residual Disease in *NPM1* -Mutated Acute Myeloid Leukemia: A Study From the German-Austrian Acute Myeloid Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 1 juill 2011;29(19):2709-16.
72. Platzbecker U, Middeke JM, Sockel K, Herbst R, Wolf D, Baldus CD, et al. Measurable residual disease-guided treatment with azacitidine to prevent haematological relapse in patients with myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukaemia (RELAZA2): an open-label, multicentre, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2018;19(12):1668-79.

Université de Lille
FACULTE DE PHARMACIE DE LILLE
DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE
Année Universitaire 2019/2020

Nom : Roynard
Prénom : Pauline

Titre de la thèse : Développement du suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes : exemple des fusions *NUP98-NSD1* et *NUP98-KDM5A* en PCR digitale

Mots-clés : leucémie aiguë myéloïde, maladie résiduelle minimale/mesurable, PCR digitale, *NUP98*

Résumé : Les leucémies aiguës myéloïdes sont des maladies graves dues à l'accumulation et à la prolifération clonale d'un blaste anormal au sein de la moelle osseuse. Des anomalies moléculaires sont décrites au diagnostic dans environ 50% des leucémies aiguës. Elles permettent, avec les autres caractéristiques des blastes, d'expliquer le phénotype de la maladie, d'établir un pronostic au patient et de guider les thérapeutiques. Le suivi de la maladie résiduelle par la quantification de certaines de ces anomalies constitue un marqueur pronostique spécifique de la maladie. Bien connu pour plusieurs anomalies moléculaires récurrentes, le suivi de la MRD n'est pas applicable pour des anomalies rares comme les fusions de *NUP98* en raison de l'absence de méthode de quantification existante. Les réarrangements de *NUP98* représentent un groupe de LAM au pronostic défavorable, dans ce travail nous montrons les résultats du suivi rétrospectif de deux patients *NUP98-KDM5A* et d'un patient *NUP98-NSD1* par la technique de PCR digitale. Sur ces trois patients, la quantification des transcrits montre une bonne corrélation avec les données des marqueurs cytométriques et de surexpression de *WT1* lorsqu'ils sont disponibles, avec semble-t-il un moindre effet de la dilution et une meilleure sensibilité. D'autres études seront nécessaires pour enrichir les connaissances sur les LAM-*NUP98* et leurs suivis et pour améliorer à terme le devenir des patients.

Membres du jury :

Président : Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille

Directeur de thèse : Monsieur le Docteur Nicolas Duployez, MCU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille

Assesseur : Monsieur le Professeur Claude Preudhomme, PU-PH, laboratoire d'hématologie, CHU de Lille