

Université de Lille UFR3S-Pharmacie

Année Universitaire 2023/2024

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

**Soutenue publiquement le 17 juin 2024  
Par Madame Mélinda Dantec**

---

**Étude de la maladie résiduelle dans les Leucémies Aigües Myéloïdes avec  
transcrit de fusion par PCR digitale : validation de la méthode sur les LAM t(8;21)  
et utilisation clinique**

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie Poulain, PU-PH CHU/Faculté de Pharmacie de Lille

**Directeur de la thèse :** Madame le Docteur Élise Fournier, PH au CHU de Lille

**Assesseur(s) :**

Monsieur le Docteur Nicolas Duployez, MCU-PH/Faculté de Médecine de Lille

Madame le Docteur Céline Berthon, PH au CHU de Lille



**REDACTION**  
**Audrey Hennebelle**  
 Assistante de direction

**VERIFICATION**  
**Cyrille Porta**  
 Responsable des Services

**APPROBATION**  
**Delphine Allorge**  
 Doyen

**Université de Lille**

Président  
 Premier Vice-président  
 Vice-présidente Formation  
 Vice-président Recherche  
 Vice-président Ressources humaines  
 Directrice Générale des Services

Régis BORDET  
 Etienne PEYRAT  
 Corinne ROBACZEWSKI  
 Olivier COLOT  
 Bertrand DÉCAUDIN  
 Anne-Valérie CHIRIS-FABRE

**UFR3S**

Doyen  
 Premier Vice-Doyen, Vice-Doyen RH, SI et Qualité  
 Vice-Doyenne Recherche  
 Vice-Doyen Finances et Patrimoine  
 Vice-Doyen International  
 Vice-Doyen Coordination pluriprofessionnelle et Formations sanitaires  
 Vice-Doyenne Formation tout au long de la vie  
 Vice-Doyen Territoire-Partenariats  
 Vice-Doyen Santé numérique et Communication  
 Vice-Doyenne Vie de Campus  
 Vice-Doyen étudiant

Dominique LACROIX  
 Hervé HUBERT  
 Karine FAURE  
 Damien CUNY  
 Vincent DERAMECOURT  
 Sébastien D'HARANCY  
 Caroline LANIER  
 Thomas MORGENROTH  
 Vincent SOBANSKI  
 Anne-Laure BARBOTIN  
 Valentin ROUSSEL

**Faculté de Pharmacie**

Doyen  
 Premier Assesseur et  
 Assesseur à la Santé et à l'Accompagnement  
 Assesseur à la Vie de la Faculté et  
 Assesseur aux Ressources et Personnels  
 Responsable des Services  
 Représentant étudiant  
 Chargé de mission 1er cycle  
 Chargée de mission 2eme cycle  
 Chargé de mission Accompagnement et Formation à la Recherche  
 Chargé de mission Relations Internationales  
 Chargée de Mission Qualité  
 Chargé de mission dossier HCERES

Delphine ALLORGE  
 Anne GARAT  
 Emmanuelle LIPKA  
 Cyrille PORTA  
 Honoré GUISE  
 Philippe GERVOIS  
 Héloïse HENRY  
 Nicolas WILLAND  
 Christophe FURMAN  
 Marie-Françoise ODOU  
 Réjane LESTRELIN

**Professeurs des Universités - Praticiens Hospitaliers (PU-PH)**

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALLORGE	Delphine	Toxicologie et Santé publique	81
M.	BROUSSEAU	Thierry	Biochimie	82
M.	DÉCAUDIN	Bertrand	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	DINE	Thierry	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DUPONT-PRADO	Annabelle	Hématologie	82
Mme	GOFFARD	Anne	Bactériologie - Virologie	82

M.	GRESSIER	Bernard	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	ODOU	Pascal	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	POULAIN	Stéphanie	Hématologie	82
M.	SIMON	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
M.	STAELS	Bart	Biologie cellulaire	82

#### Professeurs des Universités (PU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	ALIOUAT	El Moukhtar	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	AZAROUAL	Nathalie	Biophysique - RMN	85
M.	BERLARBI	Karim	Physiologie	86
M.	BERTIN	Benjamin	Immunologie	87
M.	BLANCHEMAIN	Nicolas	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	CARNOY	Christophe	Immunologie	87
M.	CAZIN	Jean-Louis	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	CUNY	Damien	Sciences végétales et fongiques	87
Mme	DELBAERE	Stéphanie	Biophysique - RMN	85
Mme	DEPREZ	Rebecca	Chimie thérapeutique	86
M.	DEPREZ	Benoît	Chimie bioinorganique	85
M.	DURIEZ	Patrick	Physiologie	86
M.	ELATI	Mohamed	Biomathématiques	27
M.	FOLIGNÉ	Benoît	Bactériologie - Virologie	87
Mme	FOULON	Catherine	Chimie analytique	85
M.	GARÇON	Guillaume	Toxicologie et Santé publique	86
M.	GOOSSENS	Jean-François	Chimie analytique	85
M.	HENNEBELLE	Thierry	Pharmacognosie	86
M.	LEBEGUE	Nicolas	Chimie thérapeutique	86
M.	LEMDANI	Mohamed	Biomathématiques	26
Mme	LESTAVEL	Sophie	Biologie cellulaire	87

Mme	LESTRELIN	Réjane	Biologie cellulaire	87
Mme	LIPKA	Emmanuelle	Chimie analytique	85
Mme	MELNYK	Patricia	Chimie physique	85
M.	MILLET	Régis	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	MUHR-TAILLEUX	Anne	Biochimie	87
Mme	PERROY	Anne-Catherine	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	RIVIÈRE	Céline	Pharmacognosie	86
Mme	ROMOND	Marie-Bénédictte	Bactériologie - Virologie	87
Mme	SAHPAZ	Sevser	Pharmacognosie	86
M.	SERGHERAERT	Éric	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	SIEPMANN	Juergen	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	SIEPMANN	Florence	Pharmacotechnie industrielle	85
M.	WILLAND	Nicolas	Chimie organique	86

#### Maîtres de Conférences - Praticiens Hospitaliers (MCU-PH)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	CUVELIER	Élodie	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	81
Mme	DANEL	Cécile	Chimie analytique	85
Mme	DEMARET	Julie	Immunologie	82
Mme	GARAT	Anne	Toxicologie et Santé publique	81
Mme	GENAY	Stéphanie	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
M.	GRZYCH	Guillaume	Biochimie	82
Mme	HENRY	Héloïse	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
M.	LANNOY	Damien	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	80
Mme	MASSE	Morgane	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	81
Mme	ODOU	Marie-Françoise	Bactériologie - Virologie	82

#### Maîtres de Conférences des Universités (MCU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	ALIOUAT	Cécile-Marie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	ANTHÉRIEU	Sébastien	Toxicologie et Santé publique	86

Mme	AUMERCIER	Pierrette	Biochimie	87
M.	BANTUBUNGI-BLUM	Kadiombo	Biologie cellulaire	87
M.	BERTHET	Jérôme	Biophysique - RMN	85
M.	BOCHU	Christophe	Biophysique - RMN	85
M.	BORDAGE	Simon	Pharmacognosie	86
M.	BOSC	Damien	Chimie thérapeutique	86
Mme	BOU KARROUM	Nour	Chimie bioinorganique	
M.	BRIAND	Olivier	Biochimie	87
Mme	CARON-HOUDE	Sandrine	Biologie cellulaire	87
Mme	CARRIÉ	Hélène	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
Mme	CHABÉ	Magali	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	CHARTON	Julie	Chimie organique	86
M.	CHEVALIER	Dany	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	DEMANCHE	Christine	Parasitologie - Biologie animale	87
Mme	DEMARQUILLY	Catherine	Biomathématiques	85
M.	DHIFLI	Wajdi	Biomathématiques	27
Mme	DUMONT	Julie	Biologie cellulaire	87
M.	EL BAKALI	Jamal	Chimie thérapeutique	86
M.	FARCE	Amaury	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	FLIPO	Marion	Chimie organique	86
M.	FRULEUX	Alexandre	Sciences végétales et fongiques	
M.	FURMAN	Christophe	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	GERVOIS	Philippe	Biochimie	87
Mme	GOOSSENS	Laurence	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
Mme	GRAVE	Béatrice	Toxicologie et Santé publique	86
M.	HAMONIER	Julien	Biomathématiques	26
Mme	HAMOUDI-BEN YELLES	Chérifa-Mounira	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	HANNOTHIAUX	Marie-Hélène	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	HELLEBOID	Audrey	Physiologie	86

M.	HERMANN	Emmanuel	Immunologie	87
M.	KAMBIA KPAKPAGA	Nicolas	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	86
M.	KARROUT	Younes	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	LALLOYER	Fanny	Biochimie	87
Mme	LECOEUR	Marie	Chimie analytique	85
Mme	LEHMANN	Hélène	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	LELEU	Natascha	Institut de Chimie Pharmaceutique Albert Lespagnol	86
M.	LIBERELLE	Maxime	Biophysique - RMN	
Mme	LOINGEVILLE	Florence	Biomathématiques	26
Mme	MARTIN	Françoise	Physiologie	86
M.	MENETREY	Quentin	Bactériologie - Virologie	
M.	MOREAU	Pierre-Arthur	Sciences végétales et fongiques	87
M.	MORGENROTH	Thomas	Droit et Economie pharmaceutique	86
Mme	MUSCHERT	Susanne	Pharmacotechnie industrielle	85
Mme	NIKASINOVIC	Lydia	Toxicologie et Santé publique	86
Mme	PINÇON	Claire	Biomathématiques	85
M.	PIVA	Frank	Biochimie	85
Mme	PLATEL	Anne	Toxicologie et Santé publique	86
M.	POURCET	Benoît	Biochimie	87
M.	RAVAUX	Pierre	Biomathématiques / Innovations pédagogiques	85
Mme	RAVEZ	Séverine	Chimie thérapeutique	86
Mme	ROGEL	Anne	Immunologie	
M.	ROSA	Mickaël	Hématologie	
M.	ROUMY	Vincent	Pharmacognosie	86
Mme	SEBTI	Yasmine	Biochimie	87
Mme	SINGER	Elisabeth	Bactériologie - Virologie	87
Mme	STANDAERT	Annie	Parasitologie - Biologie animale	87
M.	TAGZIRT	Madjid	Hématologie	87
M.	VILLEMAGNE	Baptiste	Chimie organique	86

M.	WELTI	Stéphane	Sciences végétales et fongiques	87
M.	YOUS	Saïd	Chimie thérapeutique	86
M.	ZITOUNI	Djamel	Biomathématiques	85

#### Professeurs certifiés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
Mme	FAUQUANT	Soline	Anglais
M.	HUGES	Dominique	Anglais
Mme	KUBIK	Laurence	Anglais
M.	OSTYN	Gaël	Anglais

#### Professeurs Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DAO PHAN	Haï Pascal	Chimie thérapeutique	86
M.	DHANANI	Alban	Droit et Economie pharmaceutique	86

#### Maîtres de Conférences Associés

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	COUSEIN	Etienne	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
Mme	CUCCHI	Malgorzata	Biomathématiques	85
M.	DUFOSSEZ	François	Biomathématiques	85
M.	FRIMAT	Bruno	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	85
M.	GILLOT	François	Droit et Economie pharmaceutique	86
M.	MITOUMBA	Fabrice	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	86
M.	PELLETIER	Franck	Droit et Economie pharmaceutique	86

#### Assistants Hospitalo-Universitaire (AHU)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	BOUDRY	Augustin	Biomathématiques	
Mme	DERAMOUDT	Laure	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	

Mme	GILLIOT	Sixtine	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	
M.	GISH	Alexandr	Toxicologie et Santé publique	
Mme	NEGRIER	Laura	Chimie analytique	

#### Hospitalo-Universitaire (PHU)

	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
M.	DESVAGES	Maximilien	Hématologie	
Mme	LENSKI	Marie	Toxicologie et Santé publique	

#### Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche (ATER)

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement	Section CNU
Mme	BERNARD	Lucie	Physiologie	
Mme	BARBIER	Emeline	Toxicologie	
Mme	COMAPGNE	Nina	Chimie Organique	
Mme	COULON	Audrey	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique	
M.	DUFOSSEZ	Robin	Chimie physique	
Mme	KOUAGOU	Yolène	Sciences végétales et fongiques	
M.	MACKIN MOHAMOUR	Synthia	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière	

#### Enseignant contractuel

Civ.	Nom	Prénom	Service d'enseignement
M.	MARTIN MENA	Anthony	Biopharmacie, Pharmacie galénique et hospitalière
M.	MASCAUT	Daniel	Pharmacologie, Pharmacocinétique et Pharmacie clinique
Mme	NDIAYE-BOIDIN	Maguette	Anglais
M.	ZANETTI	Sébastien	Biomathématiques

#### CYCLE DE VIE DU DOCUMENT

Version	Modifié par	Date	Principales modifications
1.0		20/02/2020	Création
2.0		02/01/2022	Mise à jour
2.1		21/06/2022	Mise à jour
2.2		01/02/2024	Mise à jour

***UFR3S-Pharmacie***

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



## REMERCIEMENTS

### À mon président du jury,

**Madame le Professeur Stéphanie Poulain**

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

Je vous remercie sincèrement de me faire l'honneur de présider cette thèse. Vos enseignements à la faculté de Pharmacie ont attisé ma curiosité et sont à l'origine de mon attrait pour le vaste monde des hémopathies. Soyez assurée de ma reconnaissance et de mon profond respect.

### À mes assesseurs,

**Madame le Docteur Céline Berthon**

*Praticien hospitalier  
Service des Maladies du sang - Hôpital Claude Huriez  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Je vous remercie d'avoir accepté d'évaluer cette thèse et de l'intérêt porté à ce travail. Soyez assuré de mes sincères remerciements.

**Monsieur le Docteur Nicolas Duployez**

*Maitre de conférences - Praticien Hospitalier  
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Biologie moléculaire  
Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille*

Je te remercie chaleureusement d'avoir accepté d'être parmi les membres du jury de ma thèse mais également pour ton encadrement et le partage de tes connaissances au cours de mon passage au laboratoire. Je suis reconnaissante d'avoir l'opportunité de continuer à travailler à tes côtés.

### A ma directrice de thèse,

**Madame le Docteur Élise Fournier**

*Praticien hospitalier  
Laboratoire d'Hématologie – Secteur Cytologie et Biologie moléculaire  
Centre Hospitalier Universitaire de Lille*

Au-delà de ton encadrement pour la thèse, je te remercie pour tout ce temps que tu as pris pour me former. Je te remercie pour ton enthousiasme, ton énergie, tes conseils, ta disponibilité et surtout ta gentillesse. Je n'aurais pu trouver une meilleure directrice de thèse.

### Je remercie également,

**Monsieur le Professeur Claude Preudhomme**

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

Je vous suis reconnaissante pour votre confiance et votre bienveillance. Je vous remercie de m'avoir fait l'honneur de m'accueillir au sein de votre équipe et de me permettre de continuer à y travailler.

### À toutes les personnes qui ont participé à cette thèse,

Nathalie H, merci pour ton aide et ta patience sans faille malgré mes nombreux petits coacs. Une PCR avec les amorces ça fonctionne toujours mieux. Je remercie aussi l'ensemble

des techniciens dont Vanessa, Alexis, Amélie, Camille et Corentin pour votre aide et votre disponibilité qui m'ont permis de mener à bien toutes les expériences pour cette thèse.

#### A tous les biologistes,

Je remercie l'ensemble des biologistes qui ont croisé ma route au cours de cet internat et qui ont participé à ma formation et à me faire tant aimer ce que je fais aujourd'hui.

Je remercie Valérie S, Christine D, Gauthier D, Florent D, Olivier N pour votre accompagnement en cytologie et votre bonne humeur. Je suis impatiente de revenir.

Je remercie Alice M, Nathalie G et Augustin B pour votre disponibilité, votre sympathie et votre gentillesse. Laurène F, je te remercie bien sûr pour les mêmes raisons mais également pour ton encadrement sur le projet de mon mémoire et ma toute première présentation en congrès (et pour les post-it).

Je remercie également les biologistes du CH de Valenciennes, Justine O, Sophie D et Quentin L. Le stage aura été court mais si je n'avais pas croisé votre route, je serais peut-être aujourd'hui spécialisée en microbiologie.

Je remercie (ou peut-être pas) toutes les biologistes, qui se reconnaîtront, avec qui j'ai pu discuter de mes achats mode.

#### A tous mes co-internes,

Chloë et Pauline, sans vous l'internat n'aurait pas été le même. C'est une chance d'avoir croisé votre route. Merci pour les fous rires, les bons plans et les sorties.

Mathilde, Louise, Sophie, Anne-Claire, Charlotte, Manon D, je vous remercie d'avoir été des supers co-internes, toujours disponibles pour les stages qu'on a pu partager.

Je remercie bien sûr tous les co-internes avec qui j'ai eu le plaisir de partager un moment de cet internat.

#### A ma team pharma,

Caroline, Céline, Emma, Gaëlle, Romane, Sorène, Valentine. Merci d'être vous, de me faire autant rire, d'être toujours disponibles pour une sortie, un goûter, une session shopping, un voyage, un avis ou un conseil. Merci de m'avoir accueillie dans votre girls band et de me faire profiter autant de la vie. Je remercie encore plus Val pour notre duo de révision qui a donné naissance à ce truc inclassable.

Manon B, je crois que tu sais déjà tout ce pour quoi je te remercie. Le hasard ne nous a finalement pas mis à côté pour rien en master 1.

#### A ma sœur,

Ma meilleure amie, ma colocataire, ma psychologue, ma conseillère, ma partenaire de danse, mon avocate, mon alliée. Merci d'être cette grande sœur sans faille.

#### À mes parents,

Je vous remercie pour tout ce que vous avez fait pour moi, d'avoir toujours été disponibles et m'avoir toujours accompagnée et donnée les moyens de réussir tout ce que j'ai entrepris. Il n'y a pas de mots pour exprimer toute la reconnaissance que je vous exprime. Avoir des parents comme vous, c'est une chance incroyable.

#### A Corentin,

Je te remercie d'être un soutien tant dans ma vie. C'est une chance de t'avoir et d'être ta Mélou.

## ABREVIATIONS

ADN *Acide désoxyribonucléique*  
ADNc *Acide désoxyribonucléique complémentaire*  
AML1 *Acute myeloid leukemia 1 transcription factor*  
ANKRD26 *Ankyrin Repeat Domain Containing 26*  
ARN *Acide ribonucléique*  
ASXL1 *Additional sex combs-like 1*  
BCR *Breakpoint cluster regions*  
CBF *Core binding Factor*  
CBF $\beta$  *Core binding factor, beta subunit*  
CEBPA *CCAAT/enhancer binding protein alpha*  
CHIP *Hématopoïèse clonale à potentiel indéterminé*  
CHU *Centre hospito-universitaire*  
CMF *Cytométrie en flux*  
COFRAC *Certification, Accréditation, Organismse Accrédités*  
COG *Comparative Genomic Hybridization*  
CRP *C Réactive Protéine*  
CSH *Cellule souche hématopoïétique*  
CSL *Cellule souche leucémique*  
DDX41 *DEAD/H-box helicase gene*  
DFG *Débit de filtration glomérulaire*  
DFS *Disease Free Survival*  
dPCR *PCR digitale*  
ddPCR *droplet-digital PCR*  
DNMT3A *DNA cytosine methyltransferase 3 alpha*  
ECG *Electro-cardio-gramme*  
EEQ *Etalon externe de Qualité*  
ELN *European Leukemia Network*  
ETO *Eight-twenty-one*  
ETV6 *ETS Variant Transcription Factor 6*  
EV11 *Ecotropic virus integration site 1 protein homolog*  
EZH2 *Enhancer of zeste homolog 2*  
FAB *French-American-British*  
FISH *Fluorescence in situ hybridation*  
FLT3-ITD *FLT3 internal tandem duplication*

FLT3-TKD *FLT3 tyrosine kinase domain*  
FV *Facteur V*  
GATA2 *GATA binding protein 2*  
GM-CSF *Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*  
GBMHM *Groupe des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes*  
GO *Gemtuzumab ozogamycin*  
GVL *Graft versus leukemia*  
HC *Hématopoïèse clonale*  
HDAC *Histone desacetylase*  
HiDAC *Aracytine à hautes doses*  
HLA *Human leucocyte antigen*  
ICC *International Consensus Classification*  
IDH1/2 *Isocitrate deshydrogenase 1/2*  
IL3 *Interleukine 3*  
inv16 *Inversion du chromosome 16*  
JAK2 *Janus kinase 2*  
KIT *Kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*  
KMT2A *Lysine N-méthyltransférase 2A*  
LA *Leucémie aigüe*  
LAIP *Leukemia-associated aberrant immunophenotype*  
LAL *Leucémie aigüe lymphoblastique*  
LAM *Leucémie aigüe myéloïde*  
LAM-CBF *Leucémie aigüe myéloïde à core binding factor*  
LAP *Leucémie aigüe promyélocytaire*  
LCR *Liquide céphalo rachdien*  
LDH *Lactate deshydrogénase*  
LMC *Leucémie myéloïde chronique*  
MLL *Mixed-lineage leukemia*  
MO *Moelle osseuse*  
MPO *Myéloperoxidase*  
MRD *Maladie Résiduelle Détectable*  
MYH *Myosin heavy chain 11, smooth muscle*  
NF1 *Neurofibromin 1*  
NGS *Newt-generation sequencing*  
NOS *Not Other Specified*  
NPM1 *Nucleophosmin 1*

OMS *Organisation Mondiale de la Santé*  
OS *Survie globale*  
PBS *Phosphate-buffered saline*  
PCR *Polymerase chain reaction*  
PHF6 *PHD finger protein 6*  
PML *Promyelocytic leukemia protein*  
qPCR *PCR quantitative*  
QSP *Quantité suffisante pour*  
RARA *Retinoic acid receptor alpha*  
RAS *Rat sarcoma viral oncogene homolog*  
RC *Rémission complète*  
RPMI *Roswell Park Memorial Institute medium*  
RFU : *Relative Fluorescence Unit*  
RT-qPCR *PCR quantitative après transcription inverse*  
RT-MLPA *Reverse transcriptase multiplex ligation-dépendent probe amplification*  
RUNX1 *Runt-related transcription factor 1*  
RUNX1T1 *RUNX1 translocated to 1*  
SMD *Syndrome myélo-dysplasique*  
SMP *Syndrome myélo-prolifératif*  
SNP-CGH array *Single nucleotide polymorphism Array*  
STAT *Signal transducer and activator of transcription*  
SVF *Sérum foetale de veau*  
t(15;17) *Translocation (15;17)*  
t(8,21) *Translocation (8;21)*  
t-AML *LAM induite par un traitement*  
TCA *Temps de céphaline activée*  
TET2 *Ten eleven translocation 2*  
TP *Temps de prothrombine*  
TP53 *Tumor protein p53*  
TRIzol *Guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*  
WT1 *Wilms' Tumor 1*

## TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS.....	11
ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION.....	18
<b>1. Les Leucémies aigües myéloïdes.....</b>	<b>18</b>
1.1. Hématopoïèse .....	18
1.2. Leucémogénèse.....	20
1.2.1. Rôle de la cellule souche leucémique .....	20
1.2.2. Mécanisme de la leucémogénèse.....	20
1.3. Épidémiologie .....	22
1.4. Étiologie .....	23
1.5. Aspect clinique .....	24
1.6. Aspect biologique .....	25
1.6.1. Bilan cytologique .....	25
1.6.1.1. <i>Hémogramme</i> .....	25
1.6.1.2. <i>Myélogramme</i> .....	25
1.6.2. Bilan phénotypique.....	26
1.6.3. Bilan cytogénétique .....	27
1.6.4. Bilan moléculaire.....	27
1.6.4.1. <i>Mise en évidence des réarrangements</i> .....	28
1.6.4.2. <i>Mise en évidence des mutations d'intérêt</i> .....	28
1.7. Bilan d'extension.....	29
1.8. Classification .....	29
1.8.1. Classification historique French American British .....	29
1.8.2. Classification diagnostique de l'OMS.....	31
1.8.3. Classification diagnostique de l'ICC .....	34
1.8.4. Classification pronostique de l'ELN.....	34
1.9. Facteurs pronostiques.....	37
1.10. Prise en charge thérapeutique .....	37
<b>2. La Maladie Résiduelle Détectable .....</b>	<b>39</b>
2.1. Définition .....	39
2.2. Méthodes de mesure de la MRD.....	41
2.2.1. En cytologie et cytogénétique .....	41
2.2.2. En Cytométrie en Flux .....	41
2.2.3. Biologie moléculaire .....	42
2.2.3.1. <i>Généralités</i> .....	42
2.2.3.2. <i>Suivi par RT-qPCR</i> .....	43
2.2.3.3. <i>Suivi par NGS</i> .....	45
2.2.3.4. <i>Suivi par PCR digitale</i> .....	46
2.2.3.4.1. Généralités .....	46
2.2.3.4.2. Droplet Digital PCR .....	47
2.2.3.4.3. Utilisations dans le domaine des hémopathies .....	48
<b>3. LAM t(8;21)(q22;q22) .....</b>	<b>50</b>
3.1. Définition des LAM avec transcrits de fusion .....	50
3.2. Généralités sur les LAM t(8;21)(q22;q22).....	50
3.3. Physiopathologie .....	51
3.4. Aspect clinique .....	53
3.5. Aspect biologique .....	53
3.5.1. Diagnostic cytologique.....	53
3.5.2. Diagnostic immuno-phénotypique .....	54
3.5.3. Diagnostic cytogénétique.....	54
3.5.4. Diagnostic moléculaire .....	55
3.6. Prise en charge thérapeutique .....	56
3.7. Pronostic .....	57

3.8.	Suivi de la Maladie Résiduelle Détectable dans les LAM t(8;21)	57
3.8.1.	Suivi par RT-qPCR	58
3.8.2.	Suivi par ddPCR	58
MATERIELS ET METHODES		59
1.	Choix des échantillons	59
2.	Préparations des acides nucléiques	59
2.1.	Isolements cellulaires	59
2.1.1.	Réalisation d'un Ficoll®	59
2.1.2.	Réalisation d'une lyse	60
2.2.	Extraction et rétro-transcription de l'ARN	60
2.2.1.	Extraction manuelle par TRIZOL®	60
2.2.2.	Extraction semi-automatisée par le Maxwell®	61
2.3.	Dosage et normalisation des ARN	61
2.4.	Rétro-transcription	61
3.	Droplet-digital PCR	61
3.1.	Préparation de la plaque	62
3.2.	Générations des gouttelettes	62
3.3.	Amplification par PCR des cibles	62
3.4.	Mesure du signal	63
3.5.	Analyse des données	63
3.6.	Loi de Poisson	64
4.	Statistiques	65
RESULTATS		66
1.	Choix des amorces	66
2.	Choix des sondes	66
3.	Choix de la température d'hybridation	67
4.	Fixation du seuil	69
5.	Choix de la forme des mix réactionnels	69
6.	Réalisation d'une PCR en duplex	70
7.	Limite de blanc	70
8.	Limite de linéarité	71
9.	Limite de détection	72
10.	Détection des contaminations	72
11.	Répétabilité	72
12.	Fidélité intermédiaire	73
13.	Exactitude	73
14.	Comparaison de méthode	75
DISCUSSION		76
CONCLUSIONS		83
REFERENCES		84
ANNEXES		92

## INTRODUCTION

Les leucémies aigües myéloïdes (LAM) sont un groupe hétérogène d'hémopathies constituant à la fois une urgence diagnostique et thérapeutique. Elles se caractérisent par l'expansion maligne de cellules blastiques immatures dans la moelle osseuse, et parfois, le sang périphérique. Elles sont la conséquence d'une hématopoïèse perturbée. Les avancées moléculaires ont permis la détection d'anomalies d'intérêt diagnostique, thérapeutique et pronostique comme les transcrits de fusion. Au-delà de leur intervention au diagnostic, les outils moléculaires sont aussi intéressants pour la quantification de la Maladie Résiduelle Détectable (MRD) dont l'importance, dans le suivi des LAM, a été prouvée et est actuellement recommandé par les groupes de travail comme l'European Leukemia Network. Initialement, le suivi de la MRD était réalisé à l'aide de la PCR quantitative (qPCR) mais cette méthode de référence atteint ses limites en termes d'hétérogénéité des cibles moléculaires et de sensibilité notamment pour les transcrits de fusion rares. L'arrivée de la PCR digitale (dPCR) amène de nouveaux horizons pour le suivi de ces anomalies qui sont un très bon reflet du clone leucémique. Même si ces derniers représentent moins de 1% des anomalies moléculaires, des nouvelles méthodes comme la RT-MLPA et l'analyse du transcriptome, tendent à étendre leur nombre. Identifier des nouveaux transcrits est intéressant mais il l'est d'autant plus s'il existe des moyens de les quantifier. Dans un futur proche, le suivi des anomalies rares permettra la mise en place d'une médecine personnalisée pour les patients.

L'objectif de ce travail sera principalement de valider la méthode de quantification de RUNX1::RUNX1T1, anomalies retrouvées dans les LAM t(8;21)(q22;q22) par PCR digitale puis de montrer l'intérêt de l'utilisation de la dPCR dans le suivi des LAM avec transcrit de fusion.

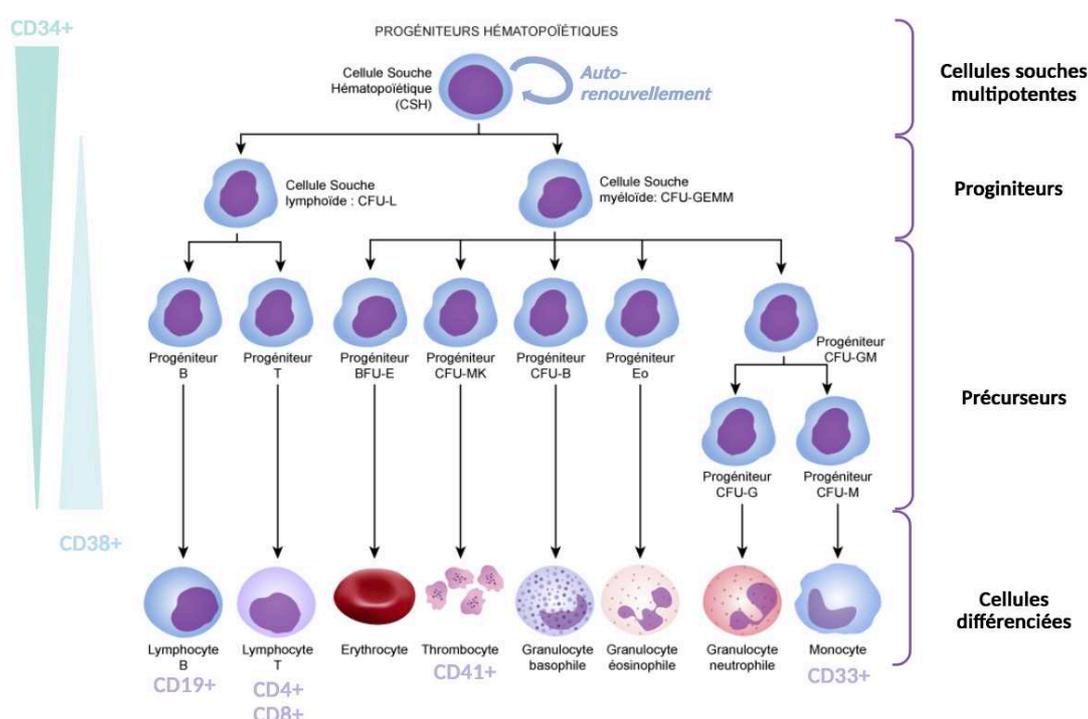
### 1. Les Leucémies aigües myéloïdes

#### 1.1. Hématopoïèse

Le système hématopoïétique est organisé de façon hiérarchique avec au sommet des cellules souches hématopoïétiques (CSH). Grâce à l'hématopoïèse, un processus physiologique hautement régulé et continu, les CSH peuvent se différencier en l'ensemble des progéniteurs à l'origine des éléments matures du sang : les hématies, les leucocytes et les plaquettes (Figure 1). Ces derniers ne sont pas capables de renouvellement et ont une durée de vie très courte avec une consommation moyenne de  $10^{12}$  cellules/jour. L'hématopoïèse doit permettre le maintien du pool de cellules matures s'adaptant aux évènements pathologiques comme des hémorragies ou des infections qui les consomment. Les CSH ont été mises en évidence pour la première fois en 1961 par Till et McCulloch qui ont prouvé l'existence d'une population de cellules

clonogéniques capables de générer des colonies myélo-érythroïdes dans la rate d'hôtes mortellement irradiés (1).

Elles possèdent trois propriétés, indispensables à l'homéostasie hématopoïétique, que sont l'auto-renouvellement, la différenciation et la multi-potence. Cet auto-renouvellement continu est possible grâce à un complexe de télomérases qui évite le raccourcissement mortel des télomères. En se divisant asymétriquement, les CSH engendrent deux cellules filles dont l'une est identique et l'autre est un progéniteur multi-potent, capable de se différencier mais plus de s'auto-renouveler. Ces progéniteurs évoluent ensuite en précurseurs myéloïdes ou lymphoïdes morphologiquement reconnaissables puis en cellules matures circulantes dans le sang (Figure 1).



**Figure 1** Différenciation des cellules souches hématopoïétiques en éléments matures sanguins

Dans la moelle osseuse (située dans la partie spongieuse des os plats et longs), des niches hématopoïétiques composées de différents types cellulaires (cellules stromales, ostéoblastes, macrophages, adipocytes) constituent un écosystème qui régule ce processus par sécrétion de molécules (cytokines, facteurs de croissance...) activatrices ou inhibitrices. Les CSH sont également souvent en quiescence (en G0 dans le cycle cellulaire) et résistantes aux agents toxiques cycles dépendants. Au niveau immuno-phénotypique, elles sont CD45+ et CD34+, HLADR+ et n'expriment pas de marqueurs de lignées (comme CD7+, CD3+ pour les lymphocytes ou CD33+, CD13+ pour les dérivés myéloïdes) (2,3).

L'acquisition d'anomalies génétiques peut transformer la CSH en cellule souche leucémique (CSL) à l'origine de l'apparition d'une leucémie aigüe (LA).

## 1.2. Leucémogénèse

### 1.2.1. Rôle de la cellule souche leucémique

Une cellule hématopoïétique peut acquérir plusieurs altérations génomiques lui conférant un phénotype leucémique avec la perte de sa capacité de différenciation, l'acquisition d'un potentiel d'auto-renouvellement infini et de résistance à l'apoptose. Cela conduit à une prolifération de cellules immatures nommées blastes et à l'apparition de la LA. L'ensemble des mécanismes responsables de la transformation d'une cellule de l'hématopoïèse normale en cellule leucémique est regroupé sous le terme de leucémogénèse.

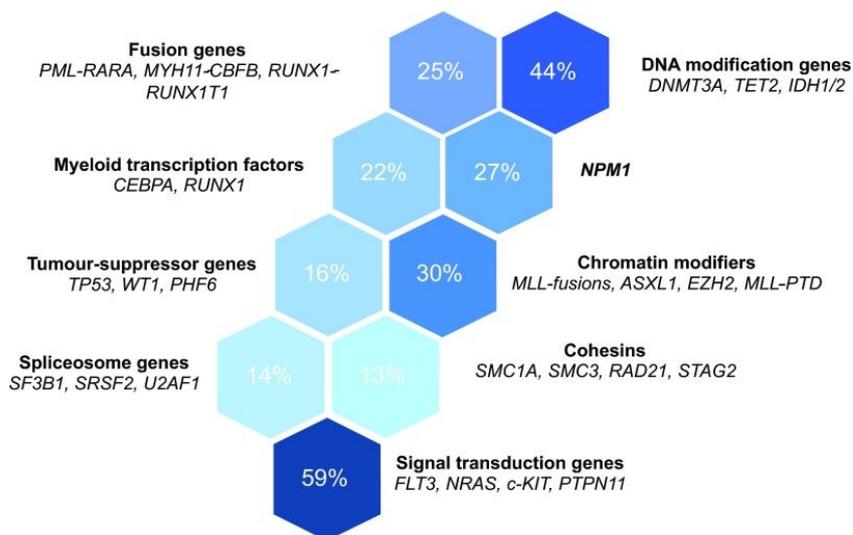
Depuis le début des années 1970, la notion de cellules souches leucémiques a émergé sur la base de plusieurs études montrant que seul un petit sous-ensemble était capable de se transformer grâce à des oncogènes (2). Puis en 1997, Bonnet et Dick ont démontré que la plupart des cellules leucémiques était incapable de proliférer de manière étendue mais que seule une proportion très faible issue d'un patient humain, les cellules initiatrices de la leucémie, induisait une LAM chez une souris (4). Toujours débattu, les CSL dériveraient des CSH ou des progéniteurs. Le phénomène de transformation tumorale est un processus multi-étape qui résulte de l'accumulation d'anomalies génétiques (acquises et/ou parfois constitutionnelles).

### 1.2.2. Mécanisme de la leucémogénèse

En 2002, Gilliland et Griffin ont initialement exposé le « two-hit model » comprenant des mutations de classe I qui confèrent un avantage de prolifération aux CSH (grâce à des mutations des récepteurs tyrosine kinase (*FLT3*, *cKIT*) ou mutations des voies de signalisation *N/KRAS*) et des mutations de classe II qui affectent la différenciation hématopoïétique par modification de l'activité de certains facteurs de transcription (aberrations chromosomiques telles les t(8;21), inv16, t(15;17) ou mutations de *RUNX1*, *CEBPa*, *MLL*)(6). Les progrès récents dans le domaine de l'analyse du génome ont montré qu'ils existaient bien plus que deux classes de mutations dont celles intervenant dans la régulation épigénétique (comme *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*, *ASXL1*, *EZH2*) pouvant former une troisième classe (6). Actuellement, les mutations peuvent être classées en huit catégories selon leur implication fonctionnelle (Figure 2).

La formation d'oncogènes peut être issue de plusieurs mécanismes moléculaires comme les mutations ponctuelles (environ 73%), les délétions/amplifications, les translocations entre deux gènes ou enfin la surexpression d'un gène. Environ 30% des LAM sont associées à un transcrit de fusion (7). Certaines mutations peuvent se retrouver fréquemment associées (comme *NPM1* et *FLT3-ITD*) quand d'autres sont mutuellement exclusives (comme *NPM1* et

*IDH2*<sup>R172</sup>). Au travers de la grande hétérogénéité moléculaire des LAM, ils semblent se dessiner des profils moléculaires que les futurs séquençages d'ADN sur de plus larges cohorte viendront conforter.

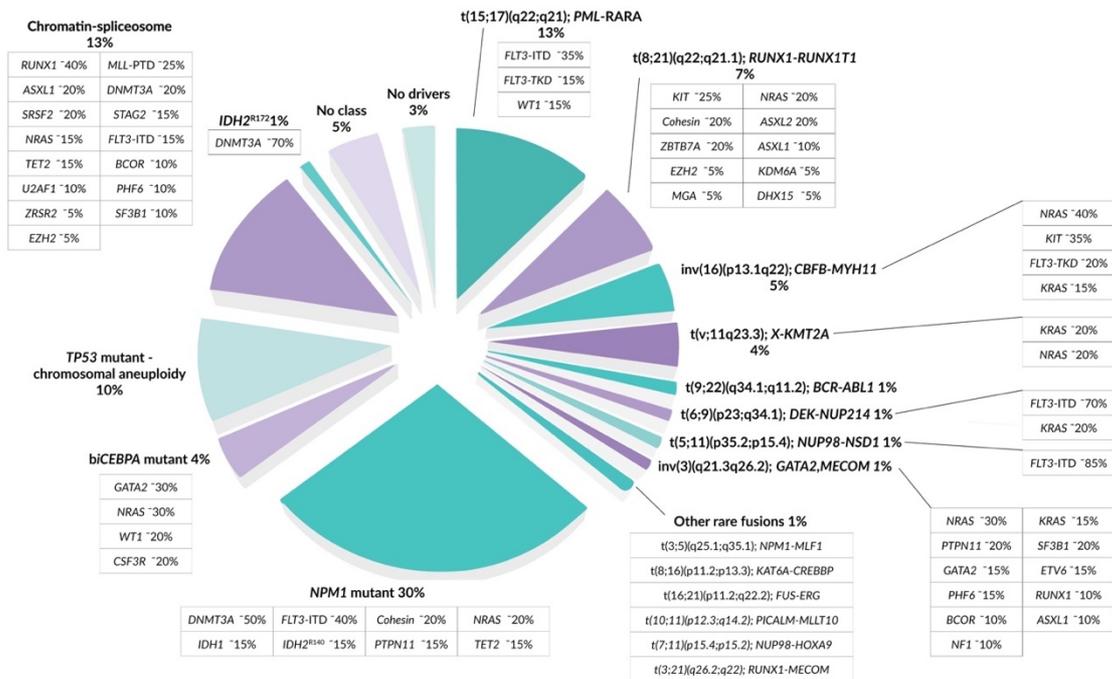


**Figure 2** Classification fonctionnelle des mutations associées aux LAM (7)

L'émergence d'un clone pathogène suggèrent que toutes les cellules leucémiques ne sont pas équivalentes mais qu'elles suivent une évolution clonale. Deux modèles ont été décrits (4) :

- Le modèle stochastique : toutes les cellules leucémiques sont équivalentes, leur devenir est uniquement fonction d'influences aléatoires extrinsèques ou intrinsèques. Chaque cellule souche leucémique a le potentiel de se comporter comme un CSL si les bonnes influences sont exercées.
- Le modèle hiérarchique : certaines cellules leucémiques sont différentes en termes de capacité d'auto-renouvellement et de différenciation et seul un sous-ensemble distinct est capable de devenir une cellule initiatrice de leucémie.

En effet, l'ordre d'apparition des mutations au sein de chaque groupe fonctionnel n'est pas aléatoire, car il apparaît que les mutations appartenant au groupe de méthylation de l'ADN, comme *DNMT3A* ou *TET2*, ou au groupe de modifications de la chromatine, comme *ASXL1*, apparaissent en premier dans l'évolution clonale (appartenant à l'hématopoïèse clonale à potentiel indéterminé). Ces mutations seraient associées à un âge plus avancé. À l'inverse, les mutations dans *NPM1* ou dans les voies de signalisation de la prolifération, telles que *FLT3*, *KIT*, *NRAS* ou *KRAS* surviennent généralement plus tard, voire comme dernier événement (Figure 3). Certaines de ces mutations sont considérées comme pré-clonales, insuffisantes seules pour induire la LA (comme *DNMT3A*, *IDH1/2*, *TET2*) tandis que d'autres sont des événements drivers (comme *NPM1*). Les mutations impliquant les voies de signalisation sont souvent sous-clonales et peuvent être multiples chez un même patient.

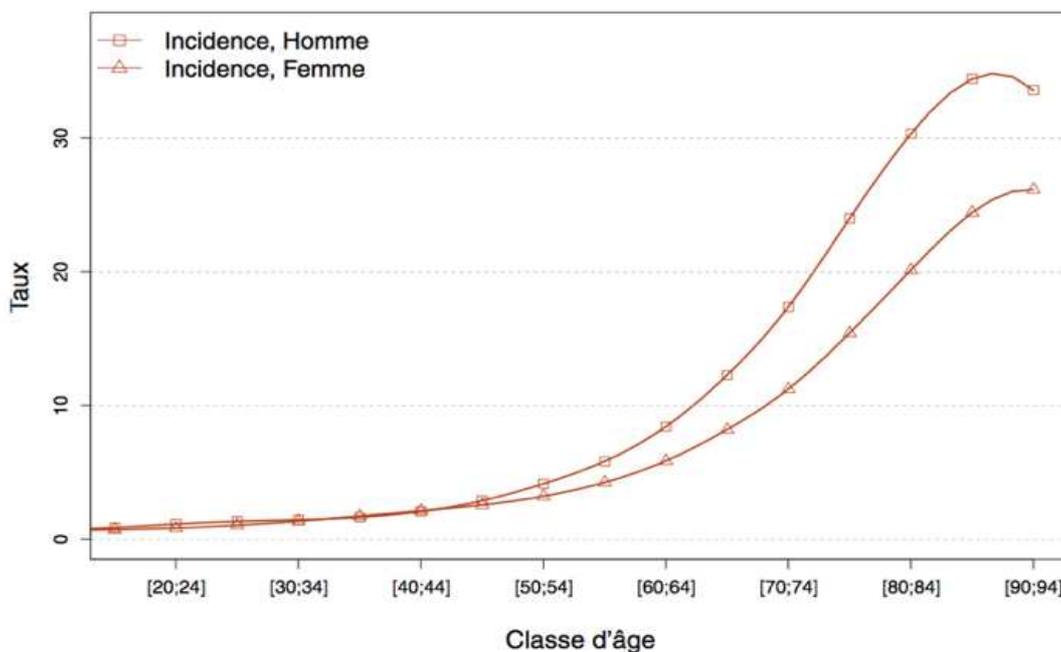


**Figure 3** Fréquence des mutations associées aux LAM ainsi que leur principale co-mutations (8)

### 1.3. Épidémiologie

Bien que l'incidence des LA représente moins de 3 % de tous les cancers, ces maladies constituent la principale cause de décès par cancer chez les enfants et les personnes âgées de moins de 39 ans (8). Les LAM sont les leucémies les plus fréquentes chez les adultes (80% des LA de l'adulte) avec un âge moyen au diagnostic à 65 ans. Elles sont très rares chez les enfants (20% des LA de l'enfant sont myéloïdes). Il existe un sex-ratio de 1,1 H/F (Figure 4). En 2019, Santé Publique France et Francim ont publié des études sur la survie des personnes atteintes de cancer dont les LAM (recueil de données de 1989 à 2018) (9). Le nombre de nouveaux cas estimés en 2018 était de 3 428 ce qui correspond à un taux d'incidence sur la population mondiale de 3,1 cas pour 100 000 personne-année chez l'homme et de 2,3 chez la femme. L'incidence augmente avec l'âge et est en augmentation depuis 1980 probablement liée au vieillissement de la population (Figure 4).

Les études retrouvent une forte disparité de la survie nette à 5 ans selon l'âge au diagnostic. La survie nette diminue fortement avec l'âge au diagnostic : à 1 an, elle passe de 84 % chez les personnes de 30 ans à 28 % chez celles de 80 ans et à 5 ans de suivi, elle passe de 69 % à 6 % respectivement pour les mêmes âges. Hormis de rares sous-types, les LAM prises dans leur ensemble, sont donc généralement des hémopathies de pronostic défavorable (9).



**Figure 4** Taux d'incidence des LAM selon les classes d'âge et le sexe en France en 2018 selon l'étude du réseau Francim (9)

#### 1.4. Étiologie

Les étiologies des LAM sont à l'heure actuelle encore inconnues mais certains facteurs de risques ont néanmoins été identifiés. Les LAM sont rarement diagnostiquées chez les patients de moins de 40 ans et l'incidence augmente rapidement avec l'âge montrant que ce dernier est un facteur de risque important (10). L'exposition à des agents toxiques comme les chimiothérapies (agents alkylants, inhibiteurs de la topo-isomérase II ou les anti-métabolites notamment) est associée à un risque plus élevé de développer une LAM (incidence 4,7 fois plus élevée). Les inhibiteurs de la topoisomérase II induisent des translocations équilibrées comme les translocations impliquant *KMT2A*, *RUNX1::RUNX1T1* ou *PML::RARA*. Ils empêchent la formation des doubles brins d'ADN clivés par l'enzyme pour faciliter le déroulement de l'ADN pendant la réplication et donc induisent des cassures de l'ADN double brin (11).

De nombreux patients auparavant traités pour une hémopathie tel qu'un lymphome, une LAL ou un myélome multiple avec traitement cytotoxique, développent des LAM quelques années plus tard (*t-AML*)(12). De même, l'exposition à des agents chimiques (benzène, pesticides, herbicides, tabac) ou à des agents physiques comme les radiations thérapeutiques, ou non, peut être considérée comme un facteur étiologique. Chez les survivants de la bombe atomique au Japon, un pic de l'incidence des LAM a été observée 5 à 7 ans après l'explosion (13). De même, l'incidence des LAM est augmentée chez les patients traités par *Strontium 89* dans le cadre d'un adénocarcinome de la prostate (14).

Certaines anomalies constitutionnelles augmentent le risque leucémogène. Il peut s'agir de prédispositions associées à un syndrome génétique comme le syndrome de Down (*risque multiplié par 10 à 20*), le syndrome de Shwachman-Diamond, l'ataxie télangiectasie, l'anémie de Fanconi ou encore le neuro-fibromatose (8). D'autres anomalies constitutionnelles peuvent également induire une prédisposition aux hémopathies en dehors d'un syndrome génétique. L'International Consensus Classification (ICC) cite notamment les mutations *CEBPA* ou *DDX41*. Les mutations *RUNX1*, *ANKRD26* ou *ETV6* sont également des prédispositions aux LAM mais associées à une atteinte constitutionnelle des plaquettes (15).

Enfin, avoir un antécédent de syndrome myélo-dysplasique ou de syndrome myélo-prolifératif augmente considérablement le risque de LAM. Plus de 90% des leucémies secondaires sont d'origine myéloïde et ont une évolution particulièrement médiocre avec une durée de survie plus courte que pour les patients atteints de LAM *de novo*.

### **1.5. Aspect clinique**

La clinique des LA, dont celle des LAM, résulte de l'envahissement de la moelle osseuse par les blastes entraînant une insuffisance médullaire. Ainsi, trois grands syndromes peuvent être observés retrouvant des signes cliniques assez peu spécifiques comme :

- Un syndrome anémique lié à un défaut de l'érythropoïèse : altération majeure de l'état général, pâleur, asthénie, acouphène, dyspnée et tachycardie
- Un syndrome hémorragique lié à un défaut de la mégacaryopoïèse : hémorragies cutanéomuqueuses, hématomes spontanés, ecchymoses
- Un syndrome infectieux lié à un défaut de la granulopoïèse : infections récurrentes, sepsis voire choc septique

Associé à cette insuffisance médullaire, un syndrome tumoral peut apparaître se manifestant par la tuméfaction des organes hématopoïétiques (adénopathies, splénomégalie, hépatomégalie). Les blastes qui passent dans la circulation sanguine peuvent également infiltrer divers tissus conduisant à des syndromes neuro-méningés, des atteintes cutanéomuqueuses (hypertrophies gingivales, testiculaires ou leucémides), des syndromes cave supérieur (liés à une masse médiastinale antérieure) ou des douleurs osseuses. Ces atteintes extra-médullaires sont à différencier du sarcome granulocytaire qui correspond à une tumeur extra-médullaire composée de cellules immatures myéloïdes sans atteinte médullaire.

Trois grandes urgences existent au moment du diagnostic des LAM :

- La coagulation intravasculaire disséminée qui est souvent associée aux LAM (majoritairement les LAM3) et aux LA hyper leucocytaires. Elle cause un trouble de la coagulation par hyperactivation (consommation des plaquettes, du fibrinogène et des facteurs de la coagulation) à l'origine de caillots pouvant altérer la circulation des micro-vaisseaux et augmenter le risque hémorragique.
- La leucostase qui est due à l'hyperleucocytose supérieure à 100 G/L. Une détresse respiratoire et des troubles neurologiques peuvent être observés liés à l'accumulation des blastes dans les capillaires. Ce risque est dépendant de la taille et de la capacité de déformabilité de ces derniers.
- Le syndrome de lyse tumorale qui est lié à la destruction massive de cellules tumorales, conduisant au relargage dans la circulation des composés intracellulaires. Cette urgence métabolique peut provoquer de graves désordres touchant essentiellement le rein et le cœur et pouvant mettre en jeu le pronostic vital des patients. Sur le plan biologique, ce syndrome repose sur une hyperuricémie, une hyperkaliémie, une hyperphosphatémie et une hypocalcémie. Son incidence est d'autant plus élevée que la masse tumorale est importante (16).

Néanmoins, parfois la LAM peut être asymptomatique et être simplement découverte de manière fortuite sur un bilan de ville.

## **1.6. Aspect biologique**

### **1.6.1. Bilan cytologique**

#### ***1.6.1.1. Hémogramme***

Les LAM doivent être suspectées chez toutes personnes présentant des cytopénies, ou une pancytopénie, inexplicables. Dans certains cas, la leucocytose est variable mais une hyperleucocytose peut être observée. En cas d'anémie, cette dernière sera à tendance normocytaire (ou macrocytaire), normochrome et arégénérative. Bien que les blastes puissent être présents dans le sang, le diagnostic de la LA doit être réalisé sur un prélèvement de moelle osseuse.

#### ***1.6.1.2. Myélogramme***

Le myélogramme permet de déterminer le pourcentage médullaire de blastes en décomptant un minimum de 500 cellules (colorées au May-Grunwald-Giemsa) et de réaliser la description morphologique des blastes (17). La moelle est souvent de richesse augmentée. L'examen cytologique ainsi que la coloration à la myéloperoxydase (positive si >3%)

permettent d'affirmer le caractère myéloïde ou lymphoïde de la leucémie. Anciennement, une coloration des estérases pouvait être réalisée ce qui n'est plus le cas en routine.

Le seuil de 20% de blastes dans la moelle osseuse reste essentiel pour poser le diagnostic de LAM et différencier les LAM des SMD(/SMP) mais il n'est pas plus nécessaire dans certaines LAM (décrites par la suite). Il est possible d'observer des signes de dysmyélopoïèse dans les cellules plus matures.

La prise en compte des différentes informations cytologiques permet parfois d'orienter le diagnostic en faveur de LAM avec cytologie spécifique comme les Leucémies Aigües Promyélocyaires (LAP) avec t(15;17), les LAM co-mutées *NPM1/ FLT3* ou les LAM à Core Binding factor (CBF).

En cas d'échec du prélèvement du myélogramme, une biopsie-ostéo-médullaire peut être réalisée mais sa lecture sera réalisée par les anatomo-pathologistes.

### 1.6.2. Bilan phénotypique

L'immuno-phénotypage par cytométrie en flux multiparamétrique est essentiel au diagnostic des LAM afin d'identifier les marqueurs de surface et intracellulaires présents sur les blastes. Les cellules en suspension sont incubées avec des anticorps spécifiques d'antigènes exprimés par les cellules hématologiques couplées à des fluorochromes. Une par une, les cellules sont analysées par un cytomètre.

	Marqueurs phénotypiques
<b>Précurseurs</b>	CD34, C117, HLA-DR
<b>Myéloïde</b>	MPO cytoplasmique, CD33, CD13
<b>Myéloïde mature</b>	CD11b, CD15, CD64, CD65
<b>Monocytaire</b>	CD14, CD36, CD64, CD4, CD38, CD11c
<b>Mégacaryocytaire</b>	CD41, CD61, CD36
<b>Erythroïde</b>	CD235a, CD71, CD36

**Table 1** Marqueurs dont la recherche est recommandée en CMF par l'ELN au diagnostic (17)

Ces éléments permettent de définir l'origine myéloïde ou lymphoïde (voir l'aspect bi-phénotypique) de la leucémie ainsi que le statut de différenciation des blastes qui est parfois difficile à établir en cytologie. L'immuno-phénotypage initial est également essentiel pour le suivi de la MRD afin d'identifier des marqueurs aberrants. La CMF est d'autant intéressante qu'elle permet un rendu du résultat en moins de 24 heures. Un panel d'anticorps à tester au diagnostic est recommandé par l'ELN 2022 (Table 1)(17).

### 1.6.3. Bilan cytogénétique

L'analyse cytogénétique est, d'après les recommandations de l'ELN, obligatoire au diagnostic et incontournable, non seulement pour le diagnostic et la classification initiale des LAM, mais également pour la stratégie thérapeutique qui est conditionnée par l'impact pronostique d'anomalies récurrentes détectées (17). Un caryotype anomal est observé chez près de 60% des patients atteints de LAM au diagnostic (18).

Dans un premier temps, un caryotype conventionnel doit être réalisé de préférence sur la moelle osseuse. Le temps de culture recommandé pour la technique de cytogénétique conventionnelle est d'au moins une nuit (jusqu'à 96 heures) avec la possibilité d'ajout de stimulants de la lignée myéloïde afin d'obtenir des chromosomes en métaphase. Au moins 20 mitoses doivent être analysées mais ce seuil est non obligatoire en présence d'anomalies récurrentes. Le caryotype au travers d'une analyse pan-génomique, révèle les anomalies de nombre ainsi que les cassures chromosomiques.

La FISH est réalisée si nécessaire en complément du caryotype en fonction de la corrélation avec l'aspect morphologique, l'existence de formes cryptiques ou la difficulté de détection de l'anomalie au caryotype. Elle ne permet que l'analyse ciblée de gène ou de région d'intérêt (18).

Récemment deux nouvelles technologies sont apparues : la Single nucleotide polymorphism Array (SNP-CGH array) qui permet la détection d'anomalies déséquilibrées et la Cartographie Optique du Génome (COG) qui par une analyse de haute résolution (sans culture) met en évidence des anomalies numériques et de structure équilibrée ou déséquilibrée. La COG est intéressante pour les hémopathies avec un faible potentiel de division et en complément du caryotype pour préciser les remaniements découverts (19). La cytogénétique est d'autant plus importante qu'en présence d'anomalies récurrentes décrites par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) et l'ICC, le diagnostic peut être posé quel que soit le pourcentage de blastes dans la moelle.

### 1.6.4. Bilan moléculaire

L'utilisation de la biologie moléculaire des LAM vise à mettre en évidence des anomalies moléculaires intéressantes pour poser le diagnostic, évaluer le pronostic et améliorer la prise en charge thérapeutique. Sa place devient de plus en plus importante. L'ELN fournit une liste de mutations et de réarrangement à rechercher de manière systématique au diagnostic pour leur intérêt pronostic et thérapeutique. Parmi ces anomalies, sont retrouvées :

- Les mutations de *FLT3*, *IDH1*, *IDH2*, *NPM1*, *CEBPA*, *DDX41*, *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2*

- Les réarrangements : *PML::RARA*, *CBFβ::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *BCR::ABL1*, les réarrangements de *KMT2A*, et les autres gènes de fusions plus rares.

D'autres mutations (*ANKRD26*, *BCORL1*, *BRAF*, *CBL*, *CSF3R*, *DNMT3A*, *ETV6*, *GATA2*, *JAK2*, *KIT*, *KRAS*, *NRAS*, *NF1*, *PHF6*, *PPM1D*, *PTPN11*, *RAD21*, *SETBP1*, *TET2*, *WT1*) non obligatoires peuvent être recherchées également.

#### **1.6.4.1. Mise en évidence des réarrangements**

30 à 40% des LA présentent une translocation équilibrée induisant la fusion de deux gènes avec production d'un ARN chimérique. Leur mise en évidence permet d'identifier les LAM avec anomalies récurrentes décrites par l'OMS et l'ICC en 2022 et a souvent un intérêt pronostique.

L'utilisation de la RT-MLPA permet de mettre en évidence de nouveaux transcrits de fusion parfois non vus en cytogénétique et d'identifier les points de cassures de ces réarrangements. Lorsque la cytogénétique met en évidence des réarrangements non retrouvés en RT-MLPA ou dans le cadre de LAM réfractaire ou en rechute, une analyse du transcriptome peut être réalisée. Il s'agit d'une méthode puissante pour l'analyse de l'expression des gènes à l'aide du séquençage de tous les transcrits dans les échantillons d'ARN totaux.

#### **1.6.4.2. Mise en évidence des mutations d'intérêt**

La mise en évidence de mutations présente un intérêt à la fois diagnostique, pronostique et thérapeutique. Le bilan moléculaire est d'autant plus important que parmi les 40% des LAM possédant un caryotype normal, des mutations sont retrouvées (20).

Certains marqueurs n'impactent pas le pronostic mais leur présence peut fournir une cible pour des thérapies ciblées comme *IDH1* ou *IDH2*. La recherche de mutations impliquées dans les SMP ou SMD permet de montrer le caractère secondaire de la LAM. La mise en évidence de mutations comme *NPM1* au diagnostic est utile pour le suivi de la maladie résiduelle. Enfin, ce bilan permet aussi de mettre en évidence les gènes de prédispositions comme *DDX41*. A l'heure actuelle, la majorité des mutations est recherchée, sur ADN, en NGS (Next-Generation Sequencing). La recherche de surexpression de *EVII* et de *WT1* est réalisée par qPCR. La recherche des mutations *FLT3-ITD* est réalisée par analyse de fragment.

## 1.7. Bilan d'extension

Le bilan d'extension permet à la fois de surveiller l'apparition de complications immédiates et urgentes mais également d'explorer l'état clinique du patient avant la mise en place des traitements.

L'examen clinique d'entrée permet d'établir le statut de performance (ECOG) afin de chiffrer l'état général du patient. En urgence, il convient de réaliser un bilan d'exploration de la CIVD avec un bilan d'hémostase (*TP, TCA, fibrinogène, FV, D-dimères, Monomères de fibrine*) et la recherche de schizocytes. En biochimie, la LDH, la calcémie, le phosphate et l'acide urique peuvent être dosés pour écarter le syndrome de lyse. La fonction rénale doit également être vérifiée au travers du dosage de la créatinine et de l'urée et du calcul de la DFG. La CRP peut être dosée pour écarter un risque infectieux car les patients atteints de LAM sont plus sensibles aux infections. En cas de signes neurologiques ou de LAM hyper-leucocytaires (>100 G/L), une ponction lombaire est réalisée afin de vérifier l'absence de blastes dans le LCR. Enfin, l'imagerie peut être réalisée afin d'exclure la présence de localisations extra-médullaires de la LAM.

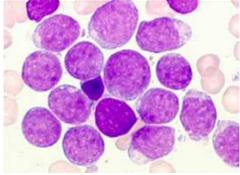
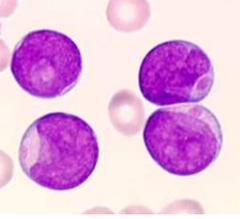
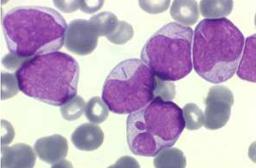
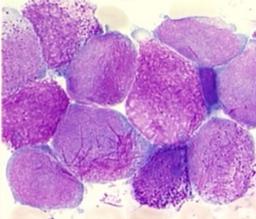
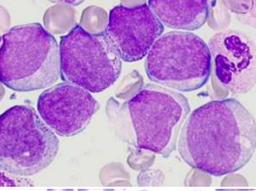
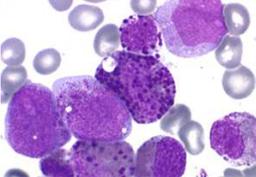
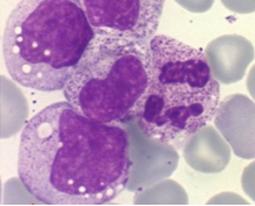
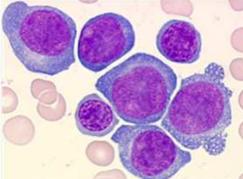
Parmi les analyses pré-thérapeutiques, la fonction cardiaque doit être évaluée avant le traitement par anthracyclines (*ECG, échographie cardiaque*). En prévention du risque d'aplasie liées aux chimiothérapies, le bilan pré-transfusionnel doit être prélevé ainsi que les sérologies virales afin de prévenir des réactivations. Chez les patients éligibles à l'allogreffe, un typage HLA peut être réalisé. Enfin, chez les adultes en âge de procréer, un test de grossesse doit être réalisé car les traitements peuvent être tératogènes et une préservation de la fertilité proposée au travers de la conservation des gamètes. Enfin, l'ELN 2022 recommande de réaliser un biobanking à partir des échantillons recueillis au diagnostic (17).

## 1.8. Classification

Depuis plus de 50 ans, différentes entités internationales tentent d'établir des classifications des LAM afin de définir des groupes pronostiques et améliorer la prise en charge thérapeutique. Les améliorations cytogénétiques puis moléculaires ont permis d'enrichir les différentes classifications.

### 1.8.1. Classification historique French American British

Publiée en 1976, la classification French American British permet une classification des LAM purement cytologique et cytochimique des blastes. La présence d'au moins 30% de blastes dans la moelle osseuse ou le sang fixe le seuil diagnostique de la LAM.

	Description	MPO	Estérase	Aspect morphologique	Caractéristiques
M0	Différenciation minimale	Négative	Négative		Myéloblastes indifférenciés. Parfois en miroir à main.
M1	Différenciation sans maturation (15-20%)	Positive	Négative		Myéloblastes avec quelques granulations et rares CA. Lignée neutrophile <10%
M2	Différenciation avec maturation (25-30%)	Positive	Négative		Myéloblastes avec granulations et quelques CA. Lignée neutrophile >10% et monocyttaire <20%
M3	Promyélocytaire	Positive	Négative		Blastes et promyélocytes atypiques. <ul style="list-style-type: none"> <li>• Hypergranulation avec CA en fagots dans la forme classique.</li> <li>• Hypogranulation avec noyau en aile de papillon dans la forme variante</li> </ul>
M4	Myélo-monocytaire	Positive	Positive		Myéloblastes avec granulations et quelques CA. Lignée neutrophile >10% et monocyttaire >20%
M4Eo	Myélo-monocytaire avec excès d'éosinophiles anormaux	Positive	Positive		Myéloblastes et promonocytes. Présence en nombre augmenté d'éosinophiles anormaux dans la MO
M5	Monocytaire	Négative	Positive		Monoblastes et promonocytes atypiques représentant plus de 80% des cellules leucémiques
M6	Erythroblastique	Négative	Négative		Myéloblastes et proérythroblastes atypiques. Précurseurs érythroïdes >80% avec au moins 30% de proérythroblastes malins

**Table 2** Classification cytologique FAB (21)

Neuf types de LAM sont définies en fonction de la morphologie des blastes, des stades de maturations des précurseurs et des colorations à la peroxydase ou à l'estérase (Table 2). Le but de cette classification n'est pas seulement de grouper des LAM avec les mêmes caractéristiques biologiques mais surtout d'essayer de définir des sous-groupes avec des pronostics et des approches thérapeutiques spécifiques. Cette classification a été révisée en 1985 (21).

Cette classification historique semble, au vu des dernières découvertes scientifiques, désuète mais elle a permis de structurer une partie de la classification OMS des LAM. Elle est limitée par l'absence de prise en compte des entités cytologiques particulières comme la t(8;21), de l'immuno-phénotypage ou de la cytogénétique.

### 1.8.2. Classification diagnostique de l'OMS

La prise en compte de tous ces paramètres a permis de décrire des sous-types de LAM avec des présentations clinico-biologiques, des évolutions et des pronostics récurrents.

En 2001, l'OMS a ainsi publié une première classification enrichie, qu'elle a par la suite révisée en 2008, 2016 et 2022. Contrairement à la FAB, le diagnostic ne requiert plus une blastose supérieure ou égale, à 30 % mais seulement 20% dans la moelle osseuse ou le sang. La détection d'une anomalie t(8;21)(q22;q22) – *RUNX1::RUNX1T1*, une inv(16)(p13.1q22) ou une t(16;16)(p13.1;q22) – *CBFβ::MYH11* et une t(15;17)(q22;q12) – *PML::RARA*, est suffisant à poser le diagnostic quel que soit le pourcentage de blastes. Quatre catégories se distinguent : les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, les LAM post-SMD ou post-SMD/SMP, les LAM induites par un traitement (agents alkylants, inhibiteurs de la topo isomérase II, radiothérapie) et les LAM n'appartenant pas aux autres catégories (Not Other Specified) et dont seule la cytologie est pertinente (équivalent au LAM0 à LAM7 selon FAB à l'exception des LAM3 et LAM4Eo) (Annexe1) (22).

Dans la classification de 2008, trois sous-groupes ont été rajoutés : les sarcomes granulocytaires, les prolifération myéloïdes associées au syndrome de Down et les néoplasies à cellules dendritiques plasmocytoïdes. Dans la catégorie des LAM à anomalies récurrentes, des nouvelles entités apparaissent : la LAM t(6;9)(q23;q34) – *DEK::NUP214*, la t(9;11)(q22;q23) – *MLLT3::MLL*, LAM avec inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2) – *RPNI::EVII* et la LAM t(1;22)(p12;q13) – *RBM15::MKL1*. De plus, pour la 1<sup>ère</sup> fois, deux mutations moléculaires sont prises en compte : *NPM1* et *CEBPA* (Annexe 1) (23).

En 2016, une troisième édition a été publiée notamment grâce à l'amélioration des techniques de biologie moléculaire (24). Des changements mineurs de nomenclature ont été réalisés comme pour *MLLT3::MLL* qui se nomme dorénavant *MLLT3::KMT2A*. Les LAM

t(9;22) – *BCR::ABL*, forment une nouvelle entité provisoire permettant aux personnes porteuses de cette translocation de bénéficier d’inhibiteurs de Tyrosine Kinase. Au niveau moléculaire, l’entité *CEBPA* fait maintenant référence à l’atteinte bi-allélique du gène et les LAM mutées *RUNX1* sont réunies dans une entité provisoire car elles semblent être associées à un pronostic plus défavorable. Enfin, un changement majeur de cette classification est l’ajout d’une section sur les prédispositions germinales aux SMD et LAM (Annexe1).

En 2022, OMS a publié sa 5<sup>ème</sup> version de la classification des LAM en prenant en compte les dernières avancées majeures (Figure 5). Les LAM ne se différencient plus qu’en deux groupes : les LAM définies par des anomalies génétiques et les LAM définies par la différenciation (25). Concernant les LAM avec anomalies génétiques, une grande nouveauté est la suppression du seuil de 20% de blastes dans le sang ou la moelle pour toutes les anomalies, exceptées les LAM *CEBPA* et les LAM *BCR::ABL*. Pour ce dernier, l’objectif étant de distinguer les LAM avec chromosome Philadelphia, des LMC qui acutisent. Un débat existe toujours à propos du seuil de blastes à fixer pour les SMD évoluant en LAM qui pour le moment restent fixer à 20% afin d’éviter un « sur-traitement » des SMD. Des nouvelles entités apparaissent comme les LAM avec réarrangement *MECOM*, *NUP98*, *KMT2A*. Leurs partenaires de fusions ne sont plus précisés du fait de leur grand nombre (plus de 80 partenaires décrits pour *KMT2A* (26)). Les LAM *CEBPA* prennent dorénavant en compte les mutations bi-alléliques et les mutations mono-alléliques du domaine « basic leucine zipper » (bZIP) sans décalage du cadre de lecture. Ces mutations de *CEBPA* sont associées, qu’elles soient mono ou bi-alléliques, à un pronostic favorable en terme de réponse et de survie, à la fois dans la population adulte et pédiatrique. Le sous-groupe des LAM *RUNX1* a été supprimé car cette mutation chevauche souvent d’autres catégories et a donc peu d’intérêt à exister seule. Un changement majeur est l’intégration des LAM avec dysplasie dans ce groupe (*de novo* ou secondaire à un SMD/(SMP)). Elles se définissent dorénavant par une blastose supérieure ou égale à 20%, un immuno-phénotypage myéloïde, et la présence d’anomalies cytogénétiques ou moléculaires spécifiques comme *SRSF2*, *SF3B1*, *U2AF1*, *ZRSR2*, *ASXL1*, *EZH2*, *BCOR*, ou *STAG2* (27). Enfin, une catégorie de LAM avec « d’autres altérations génétiques » est introduite, afin d’inclure de nouveaux ou rares sous-types, principalement des transcrits de fusion rares, dans les futures révisions de la classification.

La seconde catégorie de LAM correspond aux LAM définies par la différenciation pour lesquelles aucune anomalie, cytogénétique ou génétique, classante n’aura été identifiée. Cette catégorie vise à disparaître avec l’amélioration du diagnostic moléculaire.

Leucémie aigüe myéloïde avec anomalies génétiques définies
Leucémie aigüe promyélocytaire avec la fusion <i>PML::RARA</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec la fusion <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec la fusion <i>CBFB::MYH11</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec la fusion <i>DEK::NUP214</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec la fusion <i>RBM15::MRTFA</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec la fusion <i>BCR::ABL1</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec réarrangement de <i>KMT2A</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec réarrangement de <i>MECOM</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec réarrangement de <i>NUP98</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec mutation de <i>NPM1</i>
Leucémie aigüe myéloïde avec mutation de <i>CEBPA</i>
Leucémie aigüe myéloïde liée à la myélodysplasie
Leucémie aigüe myéloïde avec d'autres anomalies génétiques définies
Leucémie aigüe myéloïde définies par la différenciation
Leucémie aigüe myéloïde avec une différenciation minimale
Leucémie aigüe myéloïde sans maturation
Leucémie aigüe myéloïde avec maturation
Leucémie aigüe myéloïde
Leucémie aigüe myéloïde
Leucémie aigüe monocytaire
Leucémie aigüe érythroïde
Leucémie aigüe mégacaryoblastique

**Figure 5** Classification diagnostique des LAM adaptée de la classification OMS 2022 (24)

Les LAM secondaires aux traitements de la classification 2016 disparaissent de l'actualisation 2022. Une nouvelle catégorie de « néoplasie myéloïdes secondaires », non classée dans les LAM, apparaît et regroupe les néoplasies post-traitements cytotoxiques et les néoplasies associées à des facteurs génétiques de prédisposition. Les sarcomes granulocytaires forment dorénavant une catégorie à part entière de néoplasie myéloïde. Cette nouvelle édition de la classification introduit aussi deux nouvelles notions que sont l'hématopoïèse clonale et l'hématopoïèse clonale à potentiel indéterminé (CHIP). L'HC fait référence à la présence d'une population de cellules dérivées d'une CSH mutée présentant un avantage de croissance sélectif en l'absence de cytopénies ou de cancers hématologiques. Ce type d'anomalies augmente avec l'âge. La CHIP quant à elle fait référence à la présence dans l'HC de mutations somatiques dans des gènes associées à une malignité myéloïde avec une fraction allélique supérieure à 2% chez des individus sans trouble hématologique diagnostiqué ou cytopénie inexplicée.

Le processus de mise à jour de la classification OMS 2022 des tumeurs malignes myéloïdes a été supervisé par un comité éditorial composé de membres indépendants mais des divergences sont apparues entre eux conduisant à l'édition de l'ICC en parallèle.

### 1.8.3. Classification diagnostique de l'ICC

Ainsi, l'ICC a vu le jour en Septembre 2022. Comme pour l'OMS 2022, les experts ont basé cette nouvelle classification sur celle de l'OMS 2016 (Figure 6). Tandis que l'OMS 2022 classe les LAM en groupe égaux, l'ICC suggère la hiérarchisation des anomalies (15).

A la différence de l'OMS 2022, afin de reconnaître le continuum SMD et LAM, la catégorie des « SMD/LAM » apparaît, englobant les patients atteints d'un SMD avec 10 à 19% de blastes dans le sang ou la moelle osseuse (*excluant les SMD pédiatriques*). L'objectif final étant que l'ensemble des patients atteints de LAM puisse, grâce à leurs caractéristiques génétiques, être classé dans un groupe d'entités récurrentes quel que soit le pourcentage de blastes. La catégorie des LAM liées à la myélodysplasie disparaît car elle chevauchait celle des LAM liées aux traitements. Ainsi, la présence de mutations *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1* ou *ZRSR2* classe dorénavant en LAM avec dysplasie comme dans l'OMS 2022.

L'ICC élargit les sous-types de LAM pouvant être diagnostiqués au seuil de 10% de blastes pour englober d'autres anomalies génétiques récurrentes (quand l'OMS supprime ce seuil). Par exemple, les partenaires de fusions du gène *RARA* sont élargis et une liste de translocations récurrentes rares est donnée. Les LAM liées à la dysplasie présentant des anomalies cytogénétiques particulières comme la délétion 5q, la délétion 7q ou la trisomie 8, forment leur propre entité tout comme les LAM TP53 mais le seuil diagnostique reste fixé à 20% de blastes (comme les LAM *BCR::ABL*).

Les sous-types morphologiques ou cyto-chimiques de LAM précédemment utilisés, les NOS, ont une signification pronostique limitée d'après l'ICC mais ils laissent cette catégorie avec un seuil à 20%. Les catégories annexes incluant le sarcome myéloïde, les LAM post-traitement, les LAM avec prédispositions germinales et les proliférations myéloïdes en rapport avec un syndrome de Down sont identiques à l'OMS 2022 (15).

En France, aucun consensus n'a été établi, l'utilisation de l'une ou l'autre des classifications demeure centre-dépendant.

### 1.8.4. Classification pronostique de l'ELN

L'European Leukemia Network a établi une classification à visée pronostique des LAM basée sur les anomalies cytogénétiques et moléculaires (17). Trois groupes existent : les LAM de risque favorable, intermédiaire et défavorable (Figure 7).

Classification des LAM avec pourcentage d'explosions nécessaires au diagnostic		Seuil
Leucémie aigüe promyélocytaire avec t(15;17)(q24.1;q21.2)/PML::RARA		≥ 10%
Leucémie aigüe promyélocytaire avec les réarrangements RARA		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec t(8;21)(q22;q22.1)/RUNX1::RUNX1T1		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/CBFβ::MYH11		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec t(9;11)(p21.3;q23.23)/MLLT3::KMT2A		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec réarrangement de KMT2A		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec t(6;9)(p23.3;q34.1)/DEK::NUP214		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/GATA2, MECOM (EVII)		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec d'autres réarrangements de MECOM		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec d'autres translocations récurrentes rares	LAM avec t(1;3)(p36.3;q21.3)/PRDM16::RPN1	≥ 10%
	LAM avec t(3;5)(q25.3;q31.1)/NPM1::MLF1	
	LAM avec t(8;16)(p11.2;p13.3)/KAT6::CREBBP	
	LAM avec t(1;22)(p13.3;q13.1)/RBM15::MRTF1	
	LAM avec t(5;11)(q35.2;q15.4)/NUP98::NSD1	
	LAM avec t(16;21)(p11.2;q22.2)/FUS::ERG	
	LAM avec t(11;12)(q15.4;p13.3)/NUP98::KMD5A	
	LAM avec NUP98 et d'autres partenaires	
	LAM avec t(7;12)(q36.3;q13.3)/ETV6::MNX1	
	LAM avec t(10;11)(p12.3;q14.2)/PICALM::MLLT10	
LAM avec t(16;21)(q24.3;q22.1)/RUNX1::CBFA2T3		
LAM avec inv(16)(p13.3;q24.3)/CBFA2T3::GLIS2		
Leucémie aigüe myéloïde avec t(9;22)(q34.1;q11.2)/BCR::ABL1		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec mutation de NPM1		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde avec mutation bZIP in-frame de CEBPA		≥ 10%
Leucémie aigüe myéloïde et LAM/SMD avec une mutation TP53		10-19% (LAM/SMD) ≥ 20% (LAM)
Leucémie aigüe myéloïde et LAM/SMD avec mutations des gènes liés à la dysplasie	ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1 ou ZRSR2	10-19% (LAM/SMD) ≥ 20% (LAM)
Leucémie aigüe myéloïde avec les anomalies cytogénétiques liées à la myélodysplasie	Caryotype complexe (≥ 3 anomalies chromosomiques clonales non liées en l'absence des anomalies génétiques récurrentes définissant la classe), del(5q)/t(5q)/add(5q), -7/del(7q), +8, del(12p)/t(12p)/add(12p), i(17q), -17/add(17p) ou del(17p), del(20q) et/ou idic(X)(q13)	10-19% (LAM/SMD) ≥ 20% (LAM)
Leucémie aigüe myéloïde sans d'autres spécificités		10-19% (LAM/SMD) ≥ 20% (LAM)
Sarcome myéloïde		

**Figure 6 Classification diagnostique des LAM adapté de la classification ICC 2022 (15)**

En 2022, une nouvelle version a été publiée, basée sur celle de 2017. Elle prend en compte des nouvelles découvertes moléculaires et le résultat d'essai clinique récent ainsi que la MRD. Cette classification aide à la sélection de la meilleure stratégie thérapeutique à l'induction et en consolidation, avec particulièrement la question de l'indication de l'allogreffe de CSH.

Catégories de risque	Anomalies génétiques
<b>Favorable</b>	t(8;21)(q22;q22)/ <i>RUNX1::RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22)/ <i>CBFβ::MYH11</i> <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> <i>CEBPA</i> bZIP <i>in-frame</i>
<b>Intermédiaire</b>	<i>NPM1</i> muté avec <i>FLT3-ITD</i> <i>NPM1</i> non muté avec <i>FLT3-ITD</i> t(9;11)(p21.3;q23.23)/ <i>MLLT3::KMT2A</i> Anomalies cytogénétiques et/ou moléculaires non classées favorable ou défavorable
<b>Défavorable</b>	t(6;9)(p23.3;q34.1)/ <i>DEK::NUP214</i> t(v;11q23.3)/Réarrangements de <i>KMT2A</i> t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> t(8;16)(p11.2;p13.3)/ <i>KAT6A::CREBBP</i> inv(3)(q21.3q.26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2)/ <i>GATA2, MECOM (EVII)</i> -5 or del(5q) ; -7 ; -17/abn(17p) Caryotypes complexes, caryotypes monosomales Mutations de <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1</i> <i>and/or ZRSR2</i> Mutations <i>TP53</i>

**Figure 7 Classification pronostique selon l'ELN 2022 (17)**

En comparaison à 2017, plusieurs changements sont apparus. Un patient muté *FLT3-ITD* est considéré de risque intermédiaire quel que soit le ratio allélique ou la présence de mutation de *NPM1*. Ce changement est lié à la difficulté technique de standardiser le dosage du ratio allélique de *FLT3-ITD* et l'utilisation de la Midostaurine dans la prise en charge des LAM mutés *FLT3*. Les patients présentant des mutations *secondary-like* (*ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, ZRSR2*) sont de risque défavorable même s'il s'agit d'une LAM *de novo*. Ensuite, les mutations *NPM1* associées à des mutations de risque défavorable sont dorénavant de risque défavorable. La mutation *CEBPA* est de risque favorable uniquement s'il s'agit d'une mutation *in frame* dans le domaine bZIP (mono ou bi-allélique). Le transcrit de fusion t(3q26.2;v) impliquant *MECOM* et le transcrit t(8;16)(p11;p13) lié à *KAT6A::CREBBP* sont de risque défavorable. L'hyperploïdie avec de multiples trisomies n'est plus considérée comme une anomalie de risque défavorable. Le risque pronostique lié à certaines mutations est encore à l'étude notamment pour *IDH1/IDH2* et *DMT3A*. De plus, le développement récent d'inhibiteurs spécifiques de mutations comme *IDH1/IDH2* pourraient impacter ces pronostics.

Enfin, le suivi de la MRD doit dorénavant être pris en compte dans la stratification du risque surtout pour les patient muté *NPM1*. En effet, un patient de risque favorable peut être reclassé en risque intermédiaire si la MRD reste positive. Inversement, un patient de risque intermédiaire peut être classé de risque favorable si sa MRD se négative.

## 1.9. Facteurs pronostiques

Le pronostic des LAM est très hétérogène mais il est influencé à la fois par des facteurs spécifiques des patients et d'autres spécifiques de la maladie.

Concernant les facteurs liés aux patients adultes, l'âge avancé est le facteur le plus important : les patients de plus de 65 ans ont un pronostic plus défavorable que les patients plus jeunes (*indépendamment d'autres facteurs de risque comme la cytogénétique, la génétique moléculaire, le type de LAM*). Un mauvais état général évalué par le score de performance (comme un ECOG>2) est également de mauvais pronostic tout comme la présence de comorbidités (28).

Parmi les facteurs liés à la maladie, les facteurs pronostiques identifiés sont la présence d'une hyperleucocytose au diagnostic et le caractère secondaire de la LAM (secondaire à un SMD/SMP ou secondaire à une chimio ou radiothérapie) qui constitue des facteurs de mauvais pronostic. Ces LAM secondaires sont particulièrement associées à des anomalies des chromosomes 5 et 7 pour celles traitées par un agent alkylant ou à des réarrangements de MLL pour les inhibiteurs de la topoisomérase II. Ces anomalies cytogénétiques sont défavorables (29). Les modifications cytogénétiques et moléculaires des cellules leucémiques sont les facteurs les plus puissants de la réponse au traitement d'induction. Leur intérêt est prouvé dans l'adaptation des stratégies thérapeutiques au risque, notamment concernant l'indication de l'allogreffe en première rémission. Avec la classification de l'ELN, les patients sont classés en trois groupes (favorable, intermédiaire, défavorable) selon les anomalies cytogénétiques et moléculaires récurrentes. La quantification de la MRD à la fin de l'induction permet d'évaluer la réponse au traitement et d'identifier les LAM de mauvais pronostic (17).

Les facteurs liés aux patients sont plutôt prédictifs de la mort précoce liée aux traitements tandis que les facteurs liés à la maladie sont plutôt prédictifs de la résistance de la maladie aux traitements. Grâce à l'amélioration des soins de soutien chez les patients âgés, le risque de décès lié aux traitements diminue et est nettement inférieur aux risques de résistance de la maladie. Il devient donc de plus en plus important d'identifier les facteurs pronostiques cytogénétiques et moléculaires afin d'adapter et optimiser la prise en charge des patients. De même, le suivi de la MRD devient un élément pronostique clé.

### 1.10. Prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des LAM a peu évolué depuis plus de 30 ans et elle dépend de l'âge du patient et l'absence de comorbidités.

Classiquement, les patients jeunes (de moins de 60 ans et pédiatriques) et les patients âgés (de plus de 60 ans) évalués comme « fit » reçoivent un traitement en deux phases : une

chimiothérapie intensive suivie de plusieurs cures de consolidation. La chimiothérapie intensive, qui permet de réduire le nombre de cellules leucémiques, repose sur un modèle du « 3+7 » : sept jours de cytarabine dont les trois premiers sont en association avec l'anthracycline. 60 à 85% des patients jeunes obtiennent une rémission complète à la fin de l'induction contre 40 à 60% des patients âgés (30). Les patients qui sont en rémission complète à la fin de cette induction peuvent soit recevoir des cures de consolidation soit être allo greffés. La consolidation est réalisée chez les patients avec un score ELN favorable (et MRD indétectable à la fin de la RC) et avec un score intermédiaire ou défavorable non éligible à l'allogreffe. Elle repose sur l'injection en 2 ou 5 cycles de cytarabine de dose haute ou intermédiaire.

Concernant l'allogreffe, elle est systématiquement proposée (à condition de trouver un donneur compatible) chez les patients de moins de 60-65 ans (dont les LAM pédiatriques) dans les cas suivants :

- En cas de score ELN intermédiaire et défavorable
- En cas de LAM secondaire à un traitement ou secondaire aux SMP et SMD
- En cas de MRD détectable à la fin de la phase d'induction
- En cas d'échec de l'induction
- En cas de rechute pour les patients de risque favorable

Pour les patients entre 60 et 75 ans et « fit », l'allogreffe dépendra de la balance bénéfique/risque. Au-delà de 75 ans, les patients ne sont plus éligibles à l'allogreffe car la balance bénéfique/risque est trop défavorable. L'avantage de l'allogreffe est double car elle permet de lutter contre les clones leucémiques grâce à l'effet cyto-réducteur du conditionnement puis grâce à l'effet Greffe Vs Leucémie. Néanmoins, elles exposent à de nombreuses complications que sont les infections, la réaction du greffon contre l'hôte ou la rechute (30).

Les patients âgés de plus de 60 ans ou « un-fit », qui sont contre-indiqués à la chimiothérapie intensive, reçoivent uniquement des soins de support avec parfois de faible dose de cytarabine. De nouvelles thérapeutiques émergent pour la prise en charge de ces patients avec des anticorps spécifiques, des agents hypométhylants en association avec le Venetoclax et des thérapies ciblées comme les inhibiteurs de *IDH1* (Ivosidenib par exemple). Ils n'existent pas de recommandations précises car la prise en charge doit prendre en compte le type de LAM et l'état clinique du patient (31).

Enfin, quelques particularités existent. Pour les patients mutés *FLT3*, la Midostaurine peut être associée à la chimiothérapie intensive. Dans les LAM hyper-leucocytaires, l'hydroxyurée, un agent cytostatique, peut être administrée pour diminuer la charge leucémique. Enfin, la prise en charge de LAP est différente puisqu'elle repose sur l'injection d'ATRA et d'arsenic afin de permettre la différenciation des blastes. Pour les LAM réfractaires ou récidivantes, un cycle de

rattrapage (équivalent à une induction) peut être réalisé chez les patients. Une prophylaxie du système nerveux doit parfois être réalisée (systématique en pédiatrie) avec des injections intrathécales de cytarabine, méthotrexate et parfois corticoïdes en cas d'atteintes neuro-méningées.

Une des avancées récentes dans la prise en charge des hémopathies de types LAL ou lymphomes est l'utilisation des CART-T cells. Leur utilisation a été évoquée dans les LAM mais à l'heure actuelle la principale problématique rencontrée est la myélotoxicité liée au ciblage d'antigènes co-exprimés par le tissu sain adjacent (31).

La suite de la prise en charge des patients à l'issue des différentes lignes thérapeutiques inclut la surveillance. Au-delà du suivi clinique, des nouveaux outils de plus en plus sensibles ont été développés depuis plus de 50 ans afin de suivre la maladie résiduelle détectable.

## **2. La Maladie Résiduelle Détectable**

Le suivi de la MRD est un concept récent qui est apparu grâce aux progrès technologiques. La MRD est devenue un biomarqueur pronostique et prédictif indispensable pour le suivi et la prise en charge des patients. Elle permet une prise en charge personnalisée des patients.

### **2.1. Définition**

Le premier lien entre la quantité de cellules leucémiques et le pronostic de la maladie a été décrit au début des années 1960. En effet, Freireich et al. ont montré que le pourcentage de blastes sur le myélogramme après chimiothérapie était indicatif du pronostic à long terme pour les patients atteints de LAM (31). Dans cet objectif de quantification des cellules leucémiques persistantes après traitement et afin d'améliorer la sensibilité des techniques, de nombreuses méthodes ont été développées. A partir des années 1990, le terme de Maladie Résiduelle Détectable apparaît (32). Il fait référence à la quantification du faible contingent de cellules leucémiques restant à un moment donné chez un patient grâce aux méthodes sensibles ( $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ ) et se distinguant ainsi de l'évaluation cytologique de sensibilité moindre ( $10^{-2}$ ).

A l'heure actuelle, la MRD influe peu la prise en charge diagnostique, qui repose principalement sur l'évaluation du risque pré-thérapeutique selon la classification cytogénétique et moléculaire de l'ELN mais elle trouve un avantage dans le suivi des patients. Pour la première fois en 2022, la quantification de la MRD a été prise en compte dans la classification pronostique de l'ELN (17).

A l'issue du traitement d'induction, plusieurs résultats sont attendus : l'absence de rémission (*LAM dite réfractaire*), la rechute rapide ou très tardive et la guérison clinique. Seul le caractère

réfractaire peut être vu en cytologie, le reste des situations nécessite l'utilisation d'outils moléculaires sensibles pour évaluer la persistance de la lésion initiatrice et détecter sa réapparition ou non (Figure 8-a).

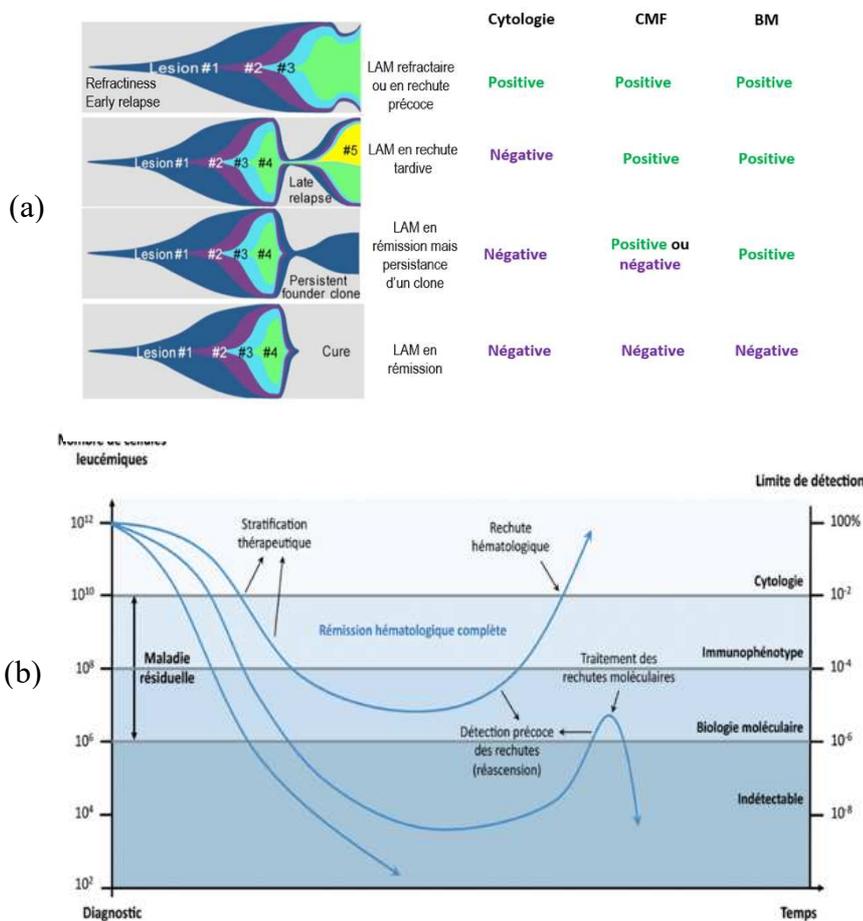
De manière plus précise, le suivi de la MRD permet (Figure 8-b) :

- D'évaluer de manière précoce la réponse au traitement : les traitements cyto-réducteurs visent à éradiquer le clone leucémique ; la mesure de la MRD est donc le reflet de l'efficacité du traitement (stratification thérapeutique)
- D'évaluer si un patient est en rémission complète (hématologique, cytogénétique, cytométrique, moléculaire)
- D'identifier précocement une rechute et d'adapter la prise en charge : en cas de détection d'une rechute moléculaire, une rechute clinique du patient peut être rapidement observée (34)
- De quantifier la MRD en pré et post-greffe : plusieurs études rapportent l'effet indésirable d'une positivité de la MRD avant de recevoir la greffe (35)

La rémission complète correspond d'après l'ELN 2017 à la présence de moins de 5% de blastes dans le MO, l'absence de blastes circulants ou de blastes avec un corps d'auer, un taux de PNN supérieur à 1G/L et de plaquettes supérieures à 100G/L. Si ces dernières restent inférieures à 100 G/L, le patient est considéré en RCp (36). Néanmoins, les patients en RC peuvent avoir une MRD positive. Depuis 2017, il existe la catégorie de patients en RC MRD<sup>-</sup> qui correspond à un résultat négatif pour un marqueur génétique par RT-qPCR (pour 2 sur 3 répétitions) ou une CMF négative (<0,1% des cellules exprimant le CD45+). Les patients en RC MRD<sup>+</sup> sont plus à même de rechuter (36). Avant de classer les patients dans cette catégorie, il convient de confirmer la positivité quatre semaines plus tard.

La rechute moléculaire se définit par la conversion d'une MRD négative à positive ou à l'augmentation de plus d'un logarithme du nombre de copies pour les patients en MRD<sup>LL</sup> (37). Depuis 2022, pour les LAM mutées *NPM1* ou les LAM CBF, il existe également la catégorie de RC MRD<sup>LL</sup> si un faible taux de MRD est mesuré à la fin du traitement de consolidation. Il n'existe pas de signification pronostic liée à ce faible taux et peut être considérée comme négatif sur le plan opérationnel (17)

L'objectif final de la MRD est donc de proposer aux patients un suivi personnalisé « en temps réel » du clone leucémique afin d'adapter la stratégie thérapeutique.



**Figure 8** (a) Positivité des méthodes attendues selon le statut de la maladie adapté de Delhommeau.al (40)  
 (b) Évolution de la MRD selon le statut de la maladie (20)

## 2.2. Méthodes de mesure de la MRD

### 2.2.1. En cytologie et cytogénétique

La détection de la MRD en cytologie est restreinte. Elle doit se faire grâce à un décompte de 500 cellules de moelle osseuse par reconnaissance morphologique des blastes leucémiques. Le seuil de sensibilité n'est que de  $10^{-2}$  et la reconnaissance morphologique des blastes peut parfois être compliquée et non distinguable d'un blaste de régénération.

Même si la sensibilité est meilleure qu'en cytologie, le suivi de la MRD en cytogénétique n'a pas de réel intérêt et peut-être très difficile car chez les patients en cours de traitements, la culture cellulaire est difficile (cellules peu proliférantes).

### 2.2.2. En Cytométrie en Flux

En CMF, il est possible de réaliser le suivi de la MRD en utilisant deux méthodes différentes applicable à plus de 90% des patients.

Premièrement, il est possible d'établir un immuno-phénotypage diagnostique associé à la leucémie (LAIP) en étudiant l'expression asynchrone d'antigènes (marqueurs d'immaturité et de maturité), l'expression de marqueurs aberrants pour la lignée, la surexpression ou au contraire le défaut d'expression d'antigènes. Cette méthode permet d'atteindre une sensibilité de  $10^{-3}$  à  $10^{-4}$ . Néanmoins, ce protocole nécessite de connaître l'immuno-phénotypage de diagnostic et d'avoir à disposition un large panel d'anticorps. De plus, il ne permet pas de détecter l'apparition d'un autre clone leucémique phénotypiquement différent.

La seconde méthode consiste à réaliser une approche d'immuno-phénotypage aberrant différente de la normale (DfN) pour permettre le suivi des clones leucémiques. Avec cette méthode de sensibilité de  $10^{-3}$  à  $10^{-5}$ , il est possible de réaliser l'analyse même sans diagnostic initial et de détecter l'apparition de nouveaux clones leucémiques. Un opérateur expérimenté est néanmoins nécessaire pour interpréter l'analyse (38).

### **2.2.3. Biologie moléculaire**

#### **2.2.3.1. Généralités**

Bien que soient mises en évidence plusieurs anomalies moléculaires au diagnostic des LAM, toutes ne peuvent être utilisées pour suivre la MRD en raison de l'absence de méthode de détection et/ou de l'absence d'études montrant leur valeur pronostique.

La valeur pronostique de la MRD est maintenant bien établie. Dans une méta-analyse de 11 151 patients, l'OS à 5 ans était de 68% pour les patients avec une MRD négative contre 34% pour les autres (39).

Un bon marqueur moléculaire de MRD doit être caractéristique et spécifique de l'ensemble du clone leucémique, stable (identique à la rechute), détectable de façon sensible (au minimum  $10^{-3}$ ) et mesurable grâce à une technique de routine compatible avec une utilisation clinique (standardisée, de faible coût et rapide).

Les marqueurs moléculaires de suivi validés par l'ELN 2022 sont les transcrits de fusions récurrents (*CBFβ::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL*, *KMT2A::MLLT3*) et les mutations récurrentes impliquant au moins 2 nucléotides comme *NPM1* (de forme A, B ou D). La validation est robuste pour les mutations de *NPM1* et les transcrits de fusion *CBFβ::MYH11* et *RUNX1::RUNX1T1* (37). Bien que moins spécifique du fait de son expression par les blastes physiologiques de la moelle, la surexpression de WT1 peut également être utilisée pour suivre la MRD sur le sang (40).

L'ELN 2022 donne quelques indications afin de standardiser le suivi de la MRD. Concernant le prélèvement, le suivi moléculaire sur la MO est dans la plupart des cas préférable

à celui sur sang (5 à 10 fois moins sensible) à l'exception du suivi de la surexpression de *WT1* qui est plus sensible sur le sang. Il ne doit pas être prélevé plus de 5 mL de MO afin de limiter la dilution par le sang. Au contraire, au moins 10 mL de sang sont requis pour le suivi de la MRD. D'un point de vue technique, l'ELN recommande actuellement uniquement l'utilisation de la PCR quantitative de type TaqMan® (17).

Enfin, afin d'aider à l'interprétation des résultats de la MRD, l'ELN 2022 définit la rechute moléculaire comme la conversion de la négativité en positivité d'une qPCR (confirmée dans les 4 semaines de préférence sur MO) ou l'augmentation d'un logarithme entre 2 prélèvements positifs (mesurés dans le même tissu) (17).

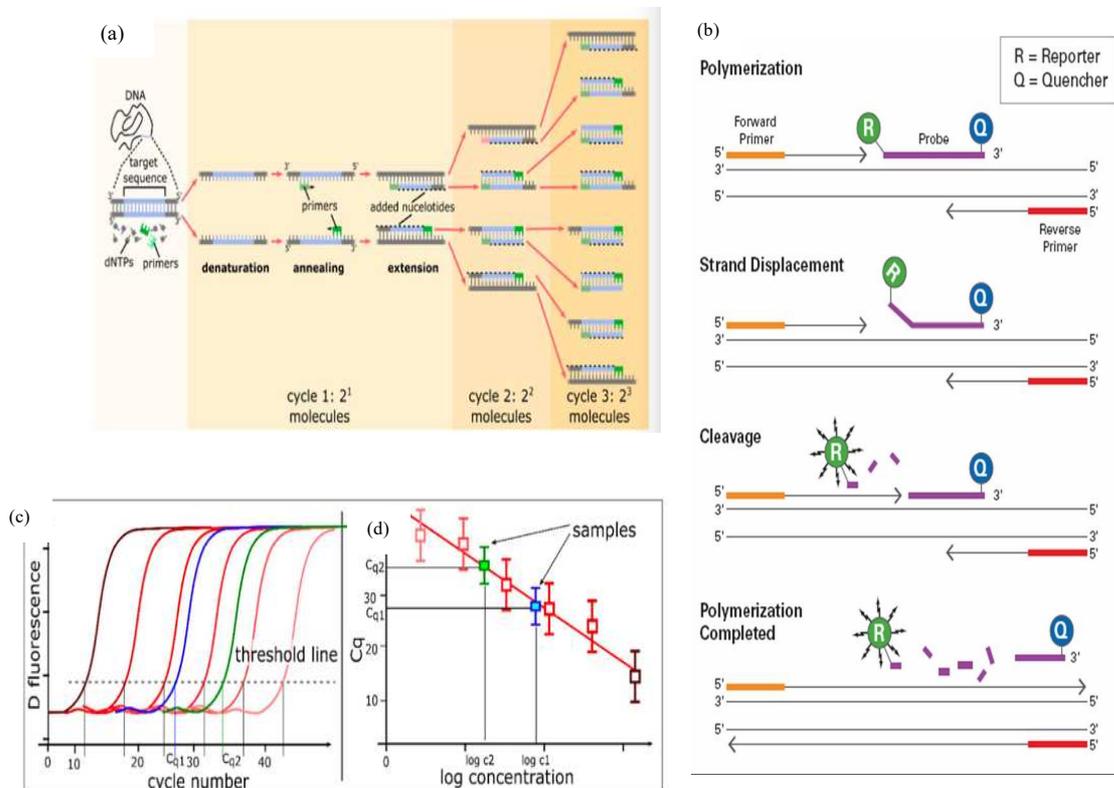
Il est important de noter que l'absence de détection de cellules leucémiques ne signent pas l'éradication de la pathologie mais "l'absence de détection au seuil de sensibilité de la technique". Dès lors, il devient un réel défi d'améliorer la sensibilité des techniques de détection moléculaires afin de détecter les événements les plus rares.

#### **2.2.3.2. Suivi par RT-qPCR**

La PCR (pour Polymerase Chain Reaction) est une technique d'amplification spécifique de l'ADN permettant à partir d'une séquence cible de générer des millions de copies de cette dernière. Elle repose sur la répétition entre 20 et 40 fois de trois étapes clés : la dénaturation de l'ADN, l'hybridation avec des amorces sens et antisens puis l'élongation par l'ADN polymérase. A chaque cycle, les copies d'ADN sont doublées permettant une amplification exponentielle des cibles. Après un certain nombre de cycles et en raison de la consommation des réactifs dans le milieu, l'amplification finit par atteindre une phase de plateau (Figure 9-a).

Afin de quantifier les différentes anomalies moléculaires, une PCR quantitative peut être réalisée avec suivi en temps réel de la phase d'amplification sur l'ADN ou sur l'ADN complémentaire issu de la rétro-transcription de l'ARN. A chaque cycle, la fluorescence émise qui est directement proportionnelle à la quantité d'amplicon, est mesurée. Pour cela, deux méthodes existent. Premièrement, il est possible d'utiliser un agent intercalant peu fluorescent à l'état « libre » mais dont la fluorescence s'accroît lors de la liaison à l'ADN double brin (comme le SYBR® Green). Du fait notamment de la toxicité de ce colorant, il est peu utilisé dans le suivi des hémopathies et c'est plutôt la seconde méthode qui prédomine. Elle consiste au suivi de l'amplification grâce à la technologie des sondes fluorescentes TaqMan®.

Mise au point en 1991, la technologie TaqMan<sup>®</sup> (contraction de Taq polymérase et PacMan) permet de quantifier facilement des cibles moléculaires par détection en temps réel de la fluorescence. Des sondes oligo-nucléotidiques spécifiques d'une séquence à amplifier sont marquées par deux fluorophores dont le premier est un quencher (en 3') capable d'éteindre le signal du second, le reporter (en 5')(41). Lors de l'élongation des amorces et de la synthèse d'un brin complémentaire de 5'-3' par la Taq polymérase (qui possède une activité 5'-exonucléasique), le reporter est libéré et il ne peut plus être inhibé par le quencher (Figure 9-b). La fluorescence détectée est alors directement proportionnelle au relargage du fluorochrome et donc à la quantité d'ADN(c) amplifié. À l'aide de plasmides étalons dont la quantité de l'anomalie est connue, il est possible d'établir une courbe standard et de déterminer la quantité précise de cible présente dans l'échantillon analysé (Figure 9-c). Une seule anomalie moléculaire est recherchée par puit réactionnel.



Dans le suivi des LAM, le résultat est rendu sous forme d'un ratio entre le nombre de copies d'un gène cible et le nombre de copies d'un gène de référence, garant de la qualité du prélèvement, de la réussite de l'extraction et de la rétro-transcription.

$$\text{Ratio} = \frac{\text{Nombre de copies}_{\text{gène cible}}}{\text{Nombre de copies}_{\text{gène référence}}} \times 100$$

Depuis 2003 et suite aux travaux de 26 laboratoires universitaires européens répartis dans 10 pays, il a été établi un protocole standardisé pour le suivi de la MRD des transcrits de fusion récurrents dans les LMC, LAL et LAM par RT-qPCR TaqMan® (42). Plusieurs séquences d'amorces et de sondes ont été étudiées et sont maintenant recommandées dont celles du gène de référence ABL. Elles sont commercialement disponibles.

Également, afin d'homogénéiser le rendu des résultats de RT-qPCR entre les laboratoires, plusieurs seuils d'interprétation ont été fixés par l'ELN 2022 (17): en cas de Ct <40 dans  $\geq 2$  répétitions sur 3 alors la MRD est positive et en cas de Ct  $\geq 40$  dans au moins 2 répétitions sur 3 pour plus de 10 000 copies de gènes de référence alors la MRD est négative. Un Ct (Threshold cycle) correspondant à l'intersection entre une courbe d'amplification et une ligne de seuil et permet d'obtenir une mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR (42).

Bien que cette technique soit très sensible (seuil à  $10^{-5}$ ) avec un coût raisonnable, elle possède une application limitée aux cibles dont des étalons commerciaux sont disponibles (les transcrits comme *RUNX1::RUNX1T1*, *CBF $\beta$ ::MYH1*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214*, *BCR::ABL1* et les mutations *NPM1* de type A, B et D et la surexpression de *WT1*). Cela restreint donc le suivi moléculaire à 40 à 50% des LAM chez les patients de moins de 60 ans et moins de 30% des LAM chez les patients de plus de 60 ans (43).

De plus, la quantification du gène cible et du gène de référence n'est pas réalisée dans le même puit mais au cours de deux analyses différentes pouvant introduire un biais d'analyse. Ces dernières sont réalisées en triplicate en utilisant un volume de 5  $\mu$ L de ADNc par puit soit 30  $\mu$ L minimum. Afin d'obtenir un volume aussi important, les échantillons sont dilués à la fin de la rétro-transcription au 2/5<sup>ème</sup>.

Enfin, la lecture de la fluorescence en temps réel ne permet pas de détecter des potentiels fixations aspécifiques des sondes.

### **2.2.3.3. Suivi par NGS**

Le suivi de la MRD par NGS, bien que coûteux, est prometteur. A ce jour, les données sont insuffisantes pour recommander le NGS comme technique de référence. A la différence de la qPCR où des mutations précises à rechercher sont précisées par l'ELN, il est conseillé de considérer toutes les mutations détectées au NGS du diagnostic comme des potentiels marqueurs de MRD. Cela permet alors d'augmenter le nombre de marqueurs de la MRD pour le suivi des patients qui ne présentent pas de mutations quantifiables en qPCR.

L'intérêt du suivi par NGS commence à être démontré. La positivité du NGS (VAF > 2%), à l'exception des mutations *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*, réalisé après 2 cures de chimiothérapies serait associée à un taux plus élevé de rechute (55,4% contre 31,9%) (31).

Quelques vigilances existent cependant. Il est recommandé d'exclure : les mutations germinales (*ANKRD26*, *DDX41*, *ETV6*, *GATA2*, *RUNX1*, *TP53*), les mutations liées à l'épigénétique comme *DNMT3A*, *TET2*, *ASXL1* qui peuvent apparaître du fait de l'hématopoïèse clonale liée à l'âge et les mutations de la voie de signalisation (*FLT3-TKD*, *KIT* et *N/K-RAS*) qui sont souvent sous-clonales et ont une faible valeur prédictive négative (37). Le seuil de sensibilité atteint à l'heure actuelle est de  $10^{-3}$  mais les progrès bio-informatiques pourraient permettre d'améliorer ce seuil.

Le NGS est également intéressant car il permet un suivi simultané de plusieurs cibles et le suivi de l'apparition de nouvelles mutations (ou d'un nouveau clone leucémique). Par exemple, dans les cas de LAM *NPM1* muté où il a été montré que la détection d'au moins une mutation additionnelle, en rémission moléculaire complète, été associée à une baisse de la survie globale (44). De même, chez les patients traités par une thérapie ciblée (inhibiteur de *FLT3*, *IDH1/2*), il est recommandé de combiner le suivi du marqueur cible (qui peut disparaître par effet de sélection) et d'autres marqueurs moléculaires.

#### **2.2.3.4. Suivi par PCR digitale**

##### *2.2.3.4.1. Généralités*

La PCR digitale (dPCR) est une méthode récente de quantification des acides nucléiques présents dans un échantillon, basée sur le partitionnement de ce dernier (Figure 10-a).

C'est en 1999 que Vogtlestein et Kinzler introduisent pour la 1<sup>ère</sup> fois la technique de la PCR digitale alors qu'ils tentent de détecter des petites populations de cellules mutantes exprimant l'oncogène *ras* dans les selles de patients atteints de cancer colorectal. Ils souhaitent transformer la nature exponentielle et analogique de la qPCR en un signal numérique linéaire adapté à la quantification de faible proportion d'acides nucléiques. Pour cela, ils ont dilué et divisé leur échantillon dans une plaque de 96 puits afin que chaque puit contienne 1 à 2 copies d'ADN avant de réaliser une PCR classique. Dans une dernière étape, à l'aide de sondes fluorescentes, les puits ont été analysés individuellement afin de détecter la présence ou l'absence de produits de PCR. Cette binarité du résultat a inspiré le terme de PCR digitale. Même si leur méthode est limitée à l'époque par le nombre de puits dans la plaque de PCR et le coût important, Vogtlestein et Kinzler citent de nombreuses applications potentielles de dPCR et parmi elles, la détection des translocations chromosomiques résiduelles dans les cellules leucémiques (45). L'idée de coupler la dilution et la PCR est en réalité décrite pour la 1<sup>ère</sup> fois

en 1988 par Saiki et al, sous le terme de « limiting dilution PCR », afin de détecter le gène de la B-globine (46).

Récemment, plusieurs méthodes de compartimentation ont été développées permettant alors de surmonter les limitations techniques rencontrées et permettant l'essor de cette technique de PCR reproduisant les mêmes étapes de partitionnement, amplification et détection comme décrites précédemment (47).

Parmi les méthodes de compartimentation, il existe notamment l'utilisation de micro-tubes et de micro-plaques 384 puits mais grâce à la micro-fluidique, des systèmes avec un partitionnement bien plus important ont été créés basés sur la micro-compartimentation ou l'émulsification (*droplet-based digital PCR*). Pour la suite de ce travail, seule la *droplet digital PCR* sera détaillée car elle est la méthode utilisée au CHU de Lille.

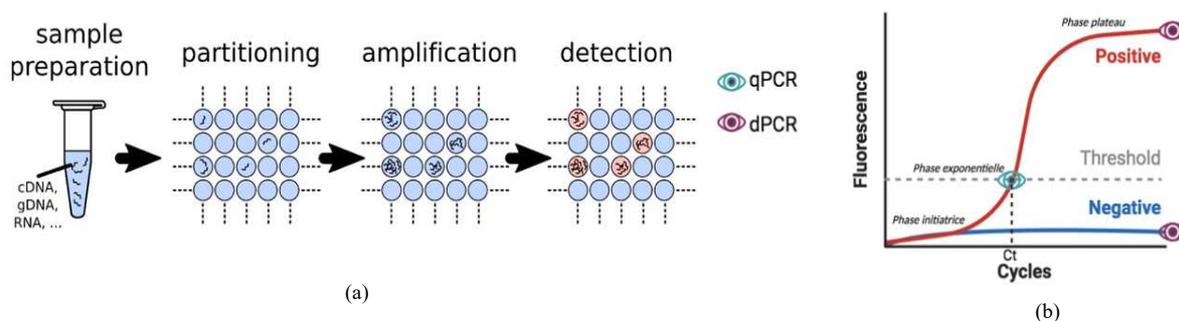
#### 2.2.3.4.2. *Droplet Digital PCR*

Grâce à l'essor de la micro-fluidique, la *droplet digital PCR* est apparue, permettant un partitionnement massif des échantillons passant de quelques centaines à des milliers de gouttelettes considérées, chacune, comme une chambre réactionnelle. Le défi a été de créer des gouttelettes résistantes dans le temps, aux variations de températures et à la lecture par un cytomètre. L'augmentation du nombre de gouttelettes contribue à l'amélioration de la sensibilité de la technique.

Après réalisation des PCR dans chaque compartiment, les gouttelettes sont analysées une à une afin de détecter la présence ou l'absence de produits d'amplification en point final. Comme pour la qPCR, deux méthodes de détection existent : l'utilisation d'agent intercalant ou la technique TaqMan®. Cette dernière est la plus utilisée dans le domaine des hémopathies.

Comparée à la qPCR, la ddPCR présente plusieurs avantages. Elle semble plus sensible et elle permet une quantification absolue des acides nucléaires indépendamment d'une gamme d'étalonnage puisque la détection est réalisée en point final et non en phase exponentielle (Figure 10-b). Cela permet de multiplier les cibles recherchées et de ne plus être restreint par la disponibilité de plasmides étalons commercialement disponibles. La ddPCR peut également être utilisée en multiplex car au sein d'un compartiment, il est possible de mettre à la fois les amorces et sondes pour le gène cible et le gène de référence en utilisant des sondes marquées par des fluorochromes différents. Ensuite, la ddPCR, du fait de la compartimentation, permet d'améliorer la tolérance de la PCR aux différents inhibiteurs.

D'un point de vue technique, la ddPCR est réalisée en duplicate en utilisant un volume de 1  $\mu\text{L}$  au diagnostic (et à la rechute) et 5,8  $\mu\text{L}$  en suivi de la MRD. Le volume total de l'analyse est donc, respectivement, de 2  $\mu\text{L}$  et 11,6  $\mu\text{L}$  au maximum. Les échantillons nécessitent, à la sortie de la rétro-transcription, d'être beaucoup moins dilués (au 4/5<sup>ème</sup>) ce qui participe à améliorer la sensibilité.



**Figure 10** (a) Principe simplifié de la PCR digitale (b) Différence de la lecture : la qPCR mesure la fluorescence à un cycle (Ct) donné quand la dPCR mesure la fluorescence à la fin de la réaction (49)

#### 2.2.3.4.3. Utilisations dans le domaine des hémopathies

Depuis son développement, plusieurs utilisations de la ddPCR ont été décrites dans le domaine des hémopathies au diagnostic ou dans le suivi en travaillant à la fois sur ADN et ADNc et cela de manière croissante (48,49).

La ddPCR est surtout un outil puissant pour la quantification absolue de gènes cibles. Son utilisation se développe dans de nombreuses branches de l'hématologie comme dans les SMP, les LAM, les LAL ou les lymphomes (Table 3). Le tableau 2 recense quelques-unes des applications possibles de la technique. Son utilisation sert à la fois pour la détection rapide et précise des anomalies moléculaires indispensables au diagnostic ou à l'origine de résistances aux traitements. Elle permet également la quantification de ces cibles pour le suivi de la MRD.

A l'heure actuelle, bien que citée par l'ELN 2022, cette méthode n'est pas encore recommandée puisque le gold-standard reste la qPCR. Son intérêt dans le suivi des transcrits de fusion devient grandissant. Une validation de la méthode avec comparaison à la qPCR permettrait de conforter son utilisation dans le suivi des LAM avec transcrit de fusion.

A ces fins, l'objectif de ce travail est donc de montrer l'intérêt de l'utilisation de la ddPCR et de valider cette méthode dans les LAM CBF t(8;21). Ce transcrit a été utilisé car il ne possède qu'un seul variant (avec un unique point de cassure décrit) et est assez fréquent pour pouvoir être utilisé lors des diverses étapes d'optimisation de la méthode. Par la suite, la technique pourra être étendue aux transcrits rares dont les échantillons sont précieux et ne peuvent être utilisés pour de l'expérimentation.

Domaine	Mutations	Intérêt	Références
<b>SMP non LMC</b>	<i>JAK2 V617F</i>	Détection de la mutation	<i>Fontanelli et al., 2015 (50)</i> <i>Waterhouse M., et al., 2016 (51)</i>
	<i>CALR</i>	Détection de la mutation	<i>Mansier O. et al. 2016 (52)</i>
	<i>JAK2 V617F</i>	Quantification post-traitement par l'interféron alpha, les inhibiteurs de JAK1/2 et l'allogreffe)	<i>Guglielmelli et al., 2017 (53)</i>
	<i>CALR</i>		
	<i>MPL</i>		
<b>SMP type LMC</b>	<i>BCR::ABL</i>	Quantification du transcrit	<i>Wang et al. 2018 (54)</i> <i>Goh et al. 2011 (55)22/09/2024 20:49:00</i>
	Mutation du site tyrosine kinase	Détection des résistances aux inhibiteurs de tyrosine kinase	<i>Akahoshi Y et al. 2020 (56)</i>
<b>LAM</b>	<i>c-KIT</i>	Détection de la mutation	<i>Tan Y et al. 2018 (57)</i>
		Également utilisable dans la mastocytose systémique	
	<i>PML::RARA</i>	Quantification du transcrit	<i>Yuan D. et al., 2019 (58)</i>
	<i>PML-A216V</i>	Détection de résistance au trioxyde d'arsenic	<i>Alfonso V et al. 2019 (59)</i>
	<i>IDH1/2</i>	Quantification de la mutation	<i>Ferret et al. 2018 (60)</i> <i>Brambati C et al. 2016 (61)</i>
	<i>WT1</i>	Quantification de la surexpression	<i>Koizumi Y et al. 2018 (62)</i>
	<i>DMT3A</i>	Quantification de la mutation	<i>Brambati C et al., 2016 (61)</i>
	<i>NPM1</i>	Quantification de la mutation	<i>Fournier E et al., 2022 (63)</i>
	<i>KMT2A</i> réarrangements	Détection et quantification des réarrangements	<i>Young et al., 2023 (26)</i>
	Transcrits rares	Quantification des transcrits rares	<i>Ip BBK et al., 2024 (64)</i>
<b>LAL</b>	<i>BCR::ABL</i>	Quantification du transcrit	<i>Ansuinelli M et al. 2021(65)</i>
	IgTCR	Quantification par multiplexage	<i>Shirai R et al., 2023 (66)</i>
<b>Lymphome</b>	<i>MYD88 L265P</i>	Recherche de la mutation dans les lymphomes Sur ADN tumoral circulant Dans les gammopathies monoclonales	<i>Drandi D et al., 2021 (67)</i> <i>Ferrante M. et al. 2021 (68)</i>
	<i>BRAF V600E</i>	Détection de la mutation dans les leucémies à tricholeucocytes	<i>Dong L. et al. 2020(69)</i>
	<i>NOTCH1</i>	Détection de la mutation dans les LLC	<i>Hoofd C. et al. 2020 (70)</i>
	<i>BCL1-IGH</i>	Suivi de la MRD dans les lymphomes du manteau	<i>Drandi et al., 2020 (71)</i>
<b>Greffe de CSH</b>		Analyse du chimérisme	<i>Valero-Garcia J et al., 2019 (72)</i>

**Table 3** Utilisations décrites de la PCR digitale dans le domaine des hémopathies

### 3. LAM t(8;21)(q22;q22)

#### 3.1. Définition des LAM avec transcrits de fusion

Les transcrits de fusion sont l'association chimérique de deux gènes issus d'une translocation chromosomique et pouvant avoir deux conséquences :

- La dérégulation de l'expression d'un proto-oncogène structurellement intact par mise sous la dépendance des régions régulatrices d'un autre gène
- La création d'un gène chimérique issu de la combinaison de deux fragments de gènes et codant pour une protéine hybride à activité oncogénique (73)

L'existence d'anomalies chromosomiques dans les hémopathies a été découverte par Nowell et Hungerford en 1960, lors de l'identification d'un petit chromosome inhabituel chez les patients atteints de LMC (74). Il faudra attendre 1973 et les améliorations des techniques cytogénétiques pour mettre en évidence la translocation réciproque entre les bras longs des chromosomes 9 et 22 à l'origine de la protéine de fusion BCR-ABL (75).

Ces anomalies génétiques représentent environ 35 à 40% des LAM (76). Leur mise en évidence est cruciale, non seulement pour le diagnostic et la classification mais aussi pour le choix d'un traitement approprié.

Les LAM CBF, sous-entités des LAM avec cytogénétique récurrente selon l'OMS, regroupent les LAM de translocation équilibrée t(8;21)(q22;q22) et les LAM inv(16)(p13q22)/t(16;16)(p13;q22). Elles sont les sous-types cytogénétiques le plus fréquents atteignant majoritairement des sujets jeunes (15% des LAM) (10,77). Elles sont considérées comme de bon pronostic car elles sont associées à un taux de rémission complète de 90% après chimiothérapie intensive et à une probabilité de survie de 50 à 70% à 5 ans (77,78). Néanmoins, le risque de rechute est élevé avec une incidence cumulée de 30 à 40% à 3 ans (79).

#### 3.2. Généralités sur les LAM t(8;21)(q22;q22)

Première translocation mise en évidence dans les LAM par le Dr Janet Rowley en 1973 (80), elles représentent 4 à 8% LAM de l'adulte et 13% des LAM pédiatriques. Ce type de LAM atteint particulièrement les sujets jeunes (moins de 60 ans) (81,82). Anciennement connu sous le nom de *AML1::ETO*, le transcrit se nomme dorénavant *RUNX1::RUNX1T1*.

Également, il semblerait que 10% des LAM t(8;21) soient secondaires car détectées après le traitement chimiothérapique d'une autre hémopathie ou d'un cancer solide. Cette forme secondaire est retrouvée chez des patients plus âgés (âge médian de 59 ans) et associée à un taux de blastes circulants plus importants (83). Malgré le profil cytogénétique favorable, la

survie générale est inférieure dans ce contexte en comparaison au pendant *de novo* (survie estimée à 1-2 ans) (84).

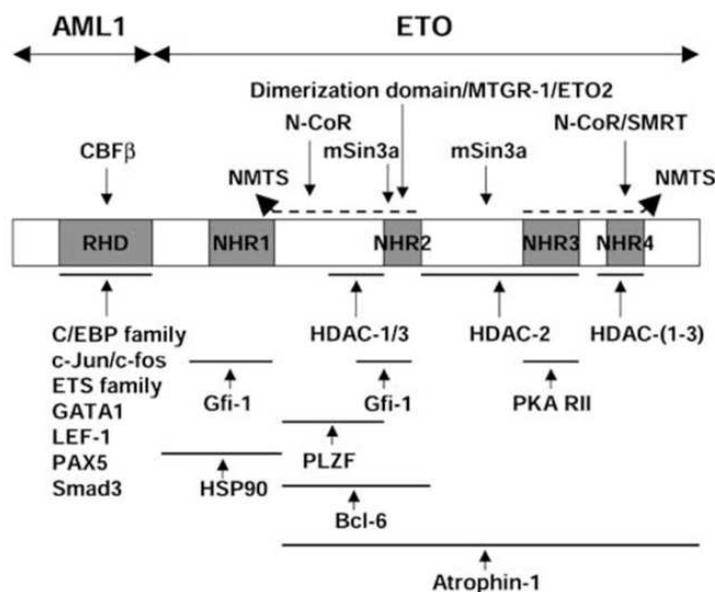
Le réarrangement chromosomique t(8;21)(q22;q22) est souvent associé à des aspects cytologiques et immunologiques particuliers. La mise en évidence de la translocation RUNX1::RUNX1T1 en biologie moléculaire pose le diagnostic de LAM quel que soit le pourcentage de blastes selon la classification OMS 2022 (25).

### 3.3. Physiopathologie

En absence de mutation, le complexe CBF se compose de deux sous unités : la sous-unité  $\alpha$  formée de *Runt-related transcription factor 1 (RUNX1)* situé sur le chromosome 21 et contenant le domaine *RUNT* (domaine hautement conservé présent chez la drosophile et essentiel à l'embryogénèse) et une sous-unité  $\beta$  issu d'un seul gène du chromosome 16 (*CBF $\beta$* ) (85). *RUNX1* est un facteur de transcription qui possède une partie N-terminale qui lie le *CBF $\beta$*  et l'ADN sur des régions promotrices de gènes essentiels à l'hématopoïèse normale (comme par exemple IL3 ou GM-CSF). La partie C-terminale, quant à elle, recrute le complexe activateur p300 et transactive les gènes cibles via l'acétylation des histones. *RUNX1* est donc un facteur transcriptionnel clé et essentiel à la différenciation hématopoïétique mais aussi au développement myéloïde. L'étude sur modèle murin montre que la perturbation homozygote de *Runx1* entraîne des défauts de développement notamment l'incapacité de développer une hématopoïèse définitive et la mort embryonnaire (85).

Concernant *RUNX1 translocated to 1 (RUNX1T1)* qui est localisé sur le chromosome 8, il s'agit d'un répresseur transcriptionnel exprimé dans de nombreux tissus et impliqué dans l'angiogenèse. Il ne lie pas directement l'ADN mais peut recruter de nombreux corépresseurs pour faciliter la répression transcriptionnelle (82).

La protéine chimérique *RUNX1::RUNX1T1*, formée de 752 AA et de 5 domaines, est donc issue de la fusion *in-frame* des gènes *RUNX1* du chromosome 21 et *RUNX1T1* du chromosome 8 (Figure 11). Au niveau moléculaire, les points de cassures géniques se situent entre l'exon 5 et 6 de *RUNX1* et avant l'exon 2 de *RUNX1T1*. La partie 5' terminale de *RUNX1* se retrouve alors juxtaposée à la partie 3' de *RUNX1T1*. Structuellement, la protéine se compose de 5 domaines : RHD issu de *RUNX1* et NHR1 à 4 issus de *RUNX1T1* (82).



**Figure 11** Transcrit de fusion RUNX1 (AML1)::RUNX1T1 (ETO) et principales interactions (86)

Dans cette nouvelle configuration, *RUNX1T1* recrute des corépresseurs qui inhibe l'action promotrice de *RUNX1* et donc la différenciation cellulaire. En parallèle, la protéine chimérique, au travers de plusieurs sites de liaisons (82) :

- Active les voies de signalisation cellulaire permettant la prolifération : *Ras*, *STAT5*, *AKT*, *Erk*
- Active des oncogènes comme la protéine anti-apoptotique *Bcl2*.
- Inactive la transcription par des mécanismes épigénétiques avec HDACs et *DNMT1*
- Inactive les gènes suppresseurs de tumeurs : *RUNX3*, *NFI*
- Inactive les enzymes de réparation de l'ADN comme la 8-oxoguanine ADN glycosylase

La protéine chimérique se localise également avec le CBF dans le noyau et modifie la dégradation de *RUNX1* qui se réalise un rythme plus élevé que dans l'hématopoïèse normale (84). Ainsi, *RUNX1::RUNX1T1* agit comme un répresseur sur les gènes hématopoïétiques normalement activés par *RUNX1* afin de perturber la différenciation hématopoïétique normale et de favoriser un état pré-leucémique.

Néanmoins, l'expérience sur modèle murin a montré que l'expression isolée du gène de fusion *RUNX1::RUNX1T1* induit certes un renouvellement aberrant mais est insuffisant pour induire une LAM (85). Les LAM t(8;21) semblent donc suivre le "two-hit model" de Gilliland avec d'une part un événement de classe I bloquant la différenciation (ici le gène de fusion) et d'autre part un événement de classe II induisant un excès de prolifération (5). L'expression du transcrit de fusion peut être détectée dans les cellules blastiques leucémiques mais également dans les cellules normales de la moelle osseuse. Ces cellules souches exprimant

*RUNX1::RUNX1T1* isolées et leur progéniture ne sont pas leucémiques et pourraient se différencier en cellules myélo-érythroïdes normales *in vitro* (87). Cette observation suggère que la translocation s'est produite à l'origine dans des CSH normales et qu'une mutation supplémentaire dans un sous-ensemble de ces CSH ou dans leur descendance a ensuite conduit à la leucémie. De même, la détection des transcrits t(8;21) dans les cartes Guthrie prélevées à la naissance suggère que cet événement initiateur peut se produire *in utero* (83).

L'analyse des profils mutationnels des LAM CBF réalisée sur 106 patients par Duployez N et al., montre qu'ils existent dans 96% des cas des anomalies cytogénétiques ou moléculaires associées au transcrit t(8;21)(88). Une grande partie des anomalies associées est liée à des mutations des voies de signalisations : *c-KIT*, *FLT3-ITD/TKD* et *RAS* dans respectivement 40%, 14% et 26% des cas. Dans 42% des LAM t(8;21), des mutations sur des régulateurs épigénétiques qui contrôlent la conformation de la chromatine, ont été retrouvées (32% *ASLX1/2*, mais aussi 7% de *EZH2* et 4% de *BCOR/BCORL1*). Dans 18% des cas, des mutations impliquées dans le complexe de cohésine (*RAD21*, *SMC1A*, *SMC3*, *STAG2*) ont été également observées (88,89).

Ces résultats suggèrent des liens entre les altérations de la structure de la chromatine, médiées par des mutations de la cohésine ou des modificateurs de la chromatine, et la coopérativité avec l'onco-protéine de fusion *RUNX1::RUNX1T1*.

### **3.4. Aspect clinique**

Les LAM t(8;21) ne présentent pas d'aspects cliniques caractéristiques puisque que leur présentation est identique à celles des autres LAM. Néanmoins, dans 15% des cas, des manifestations extra-médullaires sont associées. Seulement 2 à 3% des sarcomes médullaires présentent cette translocation (83).

### **3.5. Aspect biologique**

#### **3.5.1. Diagnostic cytologique**

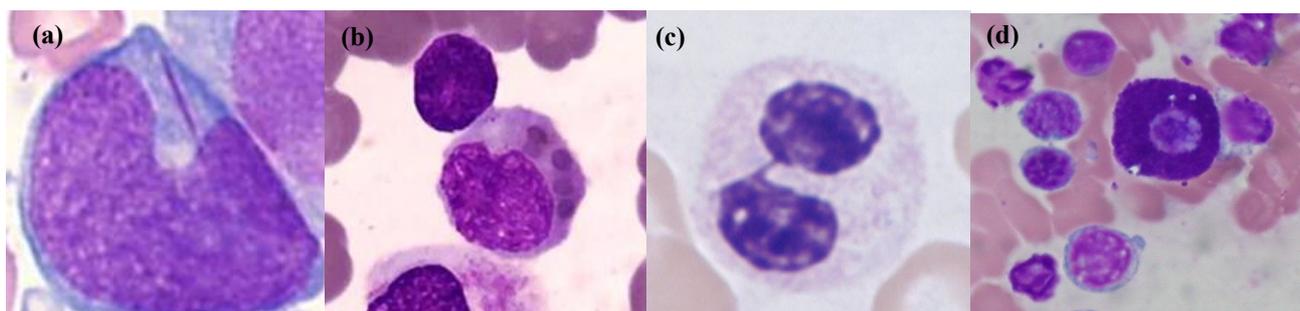
Au niveau de la numération sanguine, la leucocytose est le plus souvent modérée (environ 10 G/L). D'un point de vue cytologique, la moelle est envahie par un pourcentage variable de blastes (parfois <20%). Néanmoins, la simple présence de la translocation pose le diagnostic quel que soit le pourcentage de blastes dans la moelle. Selon la classification de FAB, les LAM t(8;21) se classe majoritairement (91%) dans les LAM2 (LAM avec maturation). Les blastes sont souvent morphologiquement caractéristiques : de grandes tailles avec un cytoplasme basophile abondant (N/C 0.6-0.7), des granulations azurophiles et souvent un corps d'auer unique planté dans le noyau ayant un aspect de boussole (Figure 12-a). Des corps d'auer

sont aussi rarement visibles dans les précurseurs myéloïdes. Une zone périnucléaire plus claire peut apparaître au niveau de l'appareil de Golgi. Il n'y a pas de blocage de maturation puisque des promyélocytes et des myélocytes peuvent être retrouvés. La coloration par MPO est fortement positive (83).

Associés aux blastes, des signes de myélodysplasies peuvent être visibles :

- Des anomalies de granulations notamment des pseudo-chediak (Figure 12-b)(90)
- Des anomalies nucléaires comme des hypo-segmentations et des anomalies de condensation de la chromatine pouvant faire évoquer parfois des pseudo-Pelger-Huet (Figure 12-c)
- Des anomalies cytoplasmiques avec parfois une coloration rose chez les neutrophiles matures

Dans la moelle osseuse, les précurseurs éosinophiles sont parfois augmentés tout comme le pourcentage de mastocytes morphologiquement normaux (Figure 12-d). Ces derniers semblent être proéminents après le traitement intensif de la LAM mais cela pourrait simplement être expliqué par une chimiorésistance de ces cellules qui persistent (91).



**Figure 12** (a) Corps d'Auer piqué dans le noyau d'un blaste (b) Polynucléaire neutrophile avec granulations de pseudo-chediak (c) Polynucléaires neutrophiles avec anomalie de pseudo-pelger (d) Mastocyte médullaire

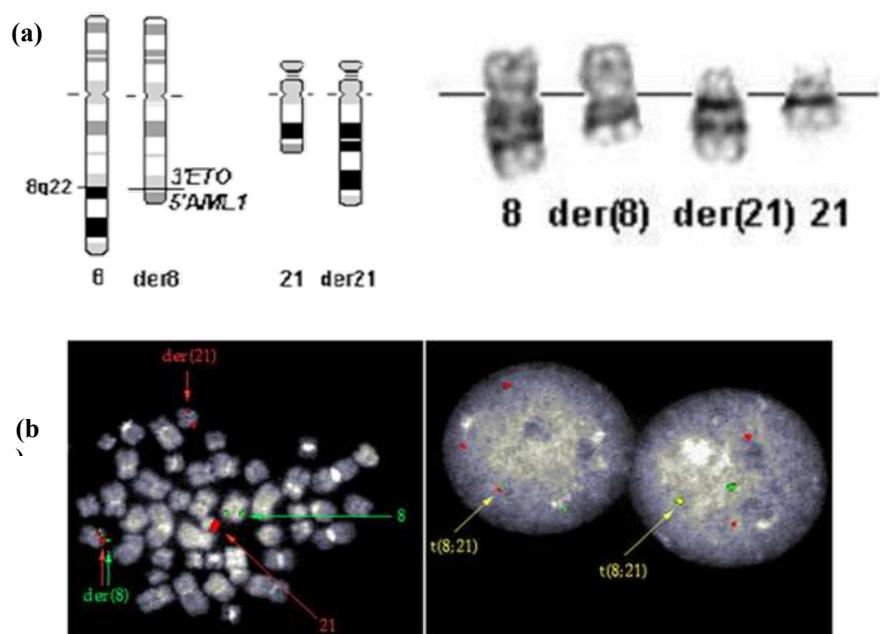
### 3.5.2. Diagnostic immuno-phénotypique

En cytométrie en flux, les blastes expriment les marqueurs d'immaturité comme le CD34+ fort, le HLA-DR+ et le CD117+. Les marqueurs myéloïdes MPO+, CD13+, CD33+ faible, CD17+ sont retrouvés. La plupart des blastes de LAM t(8;21) expriment de manière aberrante le CD19+ (marqueur lymphocytaire B), TdT+ (marqueur de la lignée lymphoïde) et le CD56+ (marqueurs lymphocytaire NK) qui est associé à un mauvais pronostic (92).

### 3.5.3. Diagnostic cytogénétique

Cytogénétiquement, la présence de la t(8;21)(q22;q22) peut être vue, premièrement, au niveau du caryotype conventionnel. Cette translocation équilibrée (sans perte de matériel)

conduit à un échange entre les bouts de chromosomes 8q et 21q. Le chromosome 8 se retrouve ainsi raccourci tandis que le chromosome 21 est allongé comme le montre la coloration des bandes R ou G (Figure 13-a).



**Figure 13** (a) Aspect de la translocations  $t(8;21)(q22;22)$  au caryotype (b) Aspect de la translocations  $t(8;21)(q22;22)$  par analyse FISH (Images fournies par le laboratoire de cytogénétique du CHU de Lille)

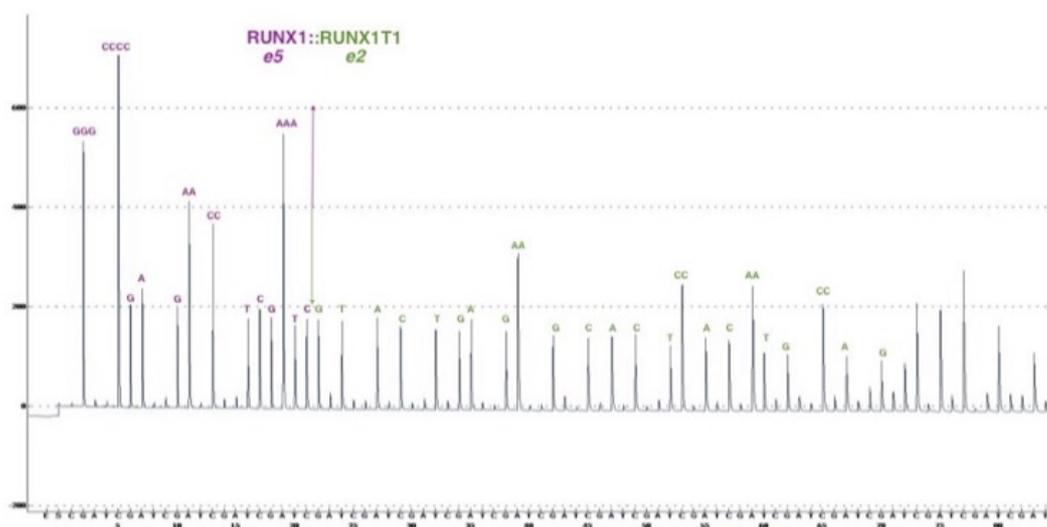
Dans un second temps, la technique de *Fluorescent In Situ Hybridization* (FISH) peut être réalisée si le caryotype n'est pas contributif. Elle permet de révéler par fluorescence grâce à des sondes d'ADN des séquences complémentaires sur les chromosomes étudiés. Dans la  $t(8;21)(q22;q22)$  le gène *RUNXI* (en rouge) forme un transcrite de fusion avec le gène *RUNXIT1* sur le chromosome 8 (en vert) : la superposition des signaux rouge et vert montre l'apparition du transcrite de fusion (Figure 13-b). Toutes les sondes locus-spécifiques commercialement disponibles détectent bien ce remaniement hormis certaines insertions moléculaires de très petites tailles. Les  $t(8;21)$  cryptiques sont très rares.

En parallèle de la mise en évidence de la  $t(8;21)$ , la cytogénétique est également utile pour mettre en évidence d'autres anomalies ayant un impact pronostique puisque dans 60% des cas, une aberration chromosomique est associée au  $t(8;21)$ . Parmi elle, il est retrouvé la perte du chromosome X, la trisomie 8 et la délétion du chromosome 9 (77).

### 3.5.4. Diagnostic moléculaire

Au laboratoire de biologie moléculaire, la présence de la  $t(8;21)$  est mise en évidence par RT-MPLA après extraction et rétro-transcription de l'ARN. Des sondes reconnaissent les points de cassures e5 de *RUNXI* et e2 de *RUNXIT1*. Dans un second temps, en cas de positivité de la RT-MLPA pour le transcrite, une RT-qPCR TaqMan® est réalisée afin de quantifier le transcrite

au diagnostic (Figure 14). En parallèle de la RT-MLPA, la présence d'anomalies moléculaires supplémentaires pouvant impacter le pronostic est recherchée par NGS (comme *c-KIT* ou les mutations *secondary-like*). Cela permet d'affiner le profil moléculaire du patient et de personnaliser sa prise en charge avec les thérapeutiques adaptées (66).



**Figure 14** Analyse par RT-MLPA de RUNX1::RUNX1T1

### 3.6. Prise en charge thérapeutique

Il n'existe pas de traitements ciblés dans les LAM t(8;21). Leur prise en charge suit le schéma classique de chimiothérapie intensive « 3+7 » associant l'anthracycline et la cytarabine. Concernant la phase de consolidation, des hautes doses de cytarabine (HDAC) améliorent la survie des patients atteints de LAM CBF. Dans une étude de 1998, après 5 ans, le taux de rémission complète était de 78%, 57% et 16% pour les patients ayant reçu respectivement 3 g/m<sup>2</sup>, 400 mg/m<sup>2</sup> et 100 mg/m<sup>2</sup> (93). L'allogreffe de CSH n'est pas indiquée en 1<sup>ère</sup> intention car elle n'a pas montré de supériorité dans la prise en charge (94).

Plus récemment, l'adjonction de Gentuzumab Ozogamicin (anti-CD33) à la première ligne de traitement a montré un effet bénéfique. Son utilisation est dorénavant recommandée dans les dernières recommandations (94,95). En France, le médicament a obtenu l'AMM chez les patients de 15 ans et plus atteints de LAM CD33+ de novo, naïfs de traitement, en bon état général à l'exception de la LAM avec mutation du gène FLT3 éligible à un traitement par Midostaurine et de la LAP. En cas de rechute, après une nouvelle chimiothérapie, la greffe de CSH est indiquée chez ces patients (85). Concernant l'utilisation de thérapies ciblées, des inhibiteurs du domaine *Runt* bloquant l'interaction avec CBFβ ont été pensés. Ils bloqueraient la réplication et conduiraient à l'apoptose mais sont toujours en cours de développement (96).

Les LAM t(8;21) étant fortement associées à la mutation *c-KIT*, l'utilisation d'un inhibiteur de multikinase pourrait être utilisé comme dasatinib. Une étude de phase Ib/IIa a été menée par le Groupe d'étude germano-autrichiens des LAM ajoutant du dasatinib à l'induction, à la consolidation associée à des hautes doses de cytarabine puis seul en maintenance. Sur les 89 patients inclus dans l'étude, l'incidence de la rechute était de 33% et l'OS à 4 ans de 75% (98).

### 3.7. Pronostic

Les LAM CBF sont considérées comme ayant un bon pronostic par rapport aux autres sous-types de LAM mais des rechutes surviennent jusqu'à 40 % chez ces patients, ce qui indique une hétérogénéité clinique parmi les patients atteints (79,97). Certaines anomalies moléculaires et cytogénétiques supplémentaires ont un impact sur le pronostic des LAM t(8;21). Au niveau chromosomique, la perte du chromosome Y est corrélée à une amélioration de la survie (97). La délétion du chromosome 9 est liée à un pronostic plus défavorable (77). Au niveau moléculaire, la co-mutation *c-KIT* pourrait être associée à un diagnostic plus péjoratif avec une rémission complète, une survie générale et une survie sans événement diminuées comme le montre Park et al. pour la mutation *c-KIT* exon 17 chez les adultes (98). L'étude des profils moléculaires des LAM CBF réalisée par N. Duployez et al., retrouvait cet aspect défavorable de *c-KIT* tandis que les patients co-mutés avec *N/KRAS* présentait une issue favorable. De plus, les mutations des gènes de modifications épigénétiques ou de cohésine sont associées à un mauvais pronostic chez les patients présentant des mutations de la voie des tyrosines kinases (88).

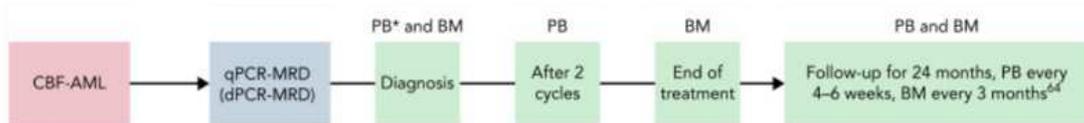
Enfin, comme démontré dans les LAM en général, un élément pronostique défavorable majeur est la présence d'une MRD positive à l'issue de la chimiothérapie intensive d'induction et du traitement de consolidation (79). Une réduction de 3 logarithmes du nombre de copies dans la moelle osseuse serait la variable la plus pronostique sur l'analyse multivariée (34).

### 3.8. Suivi de la Maladie Résiduelle Détectable dans les LAM t(8;21)

Selon les recommandations de l'ELN 2022, la MRD doit être évaluée au niveau de la MO après 2 cycles de chimiothérapies et en fin de traitement de consolidation. L'obtention d'une MRD négative après deux cycles est significativement associées à un risque réduit de rechute (17).

Dans l'étude de Rücker, Frank G et al., il est montré que les rechutes de ces LAM survenaient dans l'année suivant la fin du traitement avec un temps de latence très court entre la rechute moléculaire et la rechute morphologique (99).

De fait, il a été établi que la quantification de la MRD serait réalisée à un court intervalle de 4 à 6 semaines pendant 24 mois afin d’anticiper au mieux ces rechutes (Figure 15). En cas d’augmentation de la MRD d’un log et/ou une conversion de la MRD négative à positive, un nouvel échantillon de moelle doit être analysé dans un court délai.



**Figure 15** Intervalles recommandés entre les suivis de la MRD selon par l'ELN 2022 (17)

### 3.8.1. Suivi par RT-qPCR

Actuellement, le gold-standard pour la quantification du transcrit est la RT-qPCR TaqMan®. Cette méthode suit le protocole standardisé de quantification par PCR en temps réel de MRD établit par Gabert et al. (100). L’analyse est calibrée à l’aide d’un plasmide *RUNX1::RUNX1T1* de 10 à 10<sup>6</sup> copies et un plasmide ABL de 10<sup>3</sup> à 10<sup>6</sup> copies. La quantification des deux cibles est réalisée en simplex au cours de deux analyses distinctes. Chaque échantillon est analysé en triplicate. Puis, le ratio (en %) est calculé :

$$Ratio = \frac{Nombre\ de\ copies_{RUNX1::RUNX1T1}}{Nombre\ de\ copies_{ABL}} \times 100$$

### 3.8.2. Suivi par ddPCR

La ddPCR est une méthode récente mentionnée dans l’ELN sans donner de cibles particulières de suivi. Concernant, le suivi du transcrit t(8;21), son utilisation n’est à l’heure actuelle pas recommandée en ddPCR.

Récemment, dans un défi d’amélioration de la détection des rechutes, l’utilisation de la ddPCR sur ADN dans les LAM t(8;21) pédiatriques a été décrite. Les points de rupture spécifiques des gènes de fusion ont d’abord été identifiés par séquençage des gènes *RUNX1* et *RUNX1T1* puis des amorces ont été désignées pour chaque patient avant de réaliser la ddPCR. La comparaison de méthode a montré que la ddPCR était plus précise et sensible car elle était capable de rendre des résultats détectables sur ADN alors qu’ils étaient négatifs en CMF et en RT-PCR TaqMan® (101). L’utilisation sur ARN rétr-transcrit n’a jamais été décrit.

## MATERIELS ET METHODES

### 1. Choix des échantillons

Les échantillons testés ont été sélectionnés parmi les prélèvements reçus entre 2020 et 2024 au CHU de Lille pour lesquels une recherche de *RUNX1::RUNX1T1* en qPCR avait été demandée. Un total de 44 prélèvements a été analysé issus de 28 patients présentant le transcrit de fusion. Les témoins négatifs ont été sélectionnés parmi les patients *BCR::ABL* négatif ou *Bcl1* négatif. Les Etalons Externes de Qualité (EEQ) utilisés sont ceux fournis par le Groupe le Groupe des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes (GBMHM).

### 2. Préparations des acides nucléiques

#### 2.1. Isolements cellulaires

À partir de sang ou de moelle, prélevé sur EDTA, les leucocytes sont isolés afin de préparer des culots cellulaires adaptés à la conservation et à l'extraction des différents acides nucléiques. Deux types de préparation sont réalisés.

##### 2.1.1. Réalisation d'un Ficoll®

*Réalisée dans le cadre des diagnostics de LAM :*

Il s'agit d'un milieu de séparation des lymphocytes basé sur un mélange de polysaccharides et de métronidazole permettant après centrifugation de séparer les cellules mononuclées légères des denses.

L'échantillon de sang ou de moelle osseuse est dilué au ½ dans une solution RPMI + 10% SVF puis agité. Dans un nouveau tube Falcon®, un volume de MSL égal au mélange précédemment réalisé est introduit. Le mélange précédent est délicatement déposé à la surface du MSL. L'ensemble est centrifugé à 430g pendant 20 minutes à 4°C. Après centrifugation, l'anneau opalescent doit être récupéré rapidement dans un tube à hémolyse de 5 mL. Ce résidu est lavé avec du RPMI + 10% SVF et remis en suspension. De nouveau, il est centrifugé à 430g pendant 5 min à 4°C et le surnageant est éliminé. Cette étape de lavage est répétée une seconde fois. Une fois le surnageant éliminé, le culot est ré-homogénéisé dans 1 mL de RPMI + 10% SVF. A partir de 100mL de cette solution, une numération sur l'automate SYSMEX est réalisée. Selon la numération, du RPMI + 10% SVF. Les cellules sont ensuite aliquotées en culots secs, Trizol® ou Maxwell® selon les analyses à réaliser.

### **2.1.2. Réalisation d'une lyse**

*Réalisée dans les cas de suivi des LAM :*

Afin de procéder à la lyse érythrocytaire, une solution de tampon de lyse (contenant du chlorure d'ammonium) est ajoutée qsp 40 mL à l'échantillon. Après 10 minutes d'incubation et une centrifugation à 450g pendant 5 minutes à température ambiante, le surnageant est éliminé avant de réaliser une seconde lyse. De nouveau, il est ajouté le même tampon qsp 10 mL, laissé incuber 10 minutes, centrifugé et le surnageant est éliminé. Le culot est ensuite lavé une première fois avec un tampon de PBS qsp 10 mL. Après centrifugation à 430g pendant 5 min à température ambiante et élimination du surnageant, les cellules sont reprises qsp 10 mL de PBS. Un aliquot de 200 µL est réalisé afin de numérer les cellules sur l'automate SYSMEX. Le reste du prélèvement est de nouveau centrifugé à 430g pendant 5 minutes à température ambiante. Le culot restant est ensuite remis en suspension dans un volume de tampon PBS afin d'atteindre une concentration de 10M cellules par mL. Les cellules sont ensuite aliquotées en culots secs, TRIzol® ou Maxwell® selon les analyses à réaliser.

## **2.2. Extraction et rétro-transcription de l'ARN**

### **2.2.1. Extraction manuelle par TRIzol®**

A partir des cellules stockées dans du TRIzol®, solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine, sont extraits les ARN totaux (et/ou les ADN).

Pour cela, les culots cellulaires sont décongelés lentement afin de permettre la dissociation des complexes nucléoprotéiques. 200 µL de chloroforme par mL de TRIzol® utilisé sont ajoutés. Après avoir vortexé et attendu 5 min, le prélèvement est centrifugé à 12 000G pendant 15 minutes à 4°C. Trois phases vont apparaître : une phase aqueuse supérieure contenant l'ARN, une interphase protéique et une phase organique rouge contenant l'ADN. La phase aqueuse est récupérée dans un Eppendorf® de 1.5 mL. 500 µL d'isopropanol froid sont ajoutés à cette phase pour faire précipiter l'ARN. La solution est laissée 2 à 3 minutes à température ambiante puis à -20°C pendant 1 heure. Enfin, le tube est centrifugé à 12 000G pendant 30 minutes à 4°C et le surnageant est éliminé. Le culot est lavé avec 1mL d'éthanol à 75% froid puis la solution centrifugée pendant 5 minutes à 20°C. De nouveau le surnageant est éliminé et le culot est séché 30 minutes à l'air libre. Le culot est repris dans 20 µL d'eau DNase/RNase free et RNase OUT. Après centrifugation pendant 15 secondes, l'échantillon est laissé à 4°C si le dosage est effectué dans la foulée ou -80°C sinon.

### 2.2.2. Extraction semi-automatisée par le Maxwell®

L'extraction est semi-automatisée sur l'automate Maxwell® 16 afin d'extraire à l'aide de billes magnétiques les acides nucléiques de seize patients par série en un temps réduit. La procédure repose sur une lyse des cellules suivie d'une purification de l'ADN dans différentes solutions. L'ARN est ensuite élué dans un faible volume d'eau DNase free. A l'issue de l'extraction, l'échantillon est laissé à 4°C si le dosage est effectué dans la foulée ou -80°C sinon.

### 2.3. Dosage et normalisation des ARN

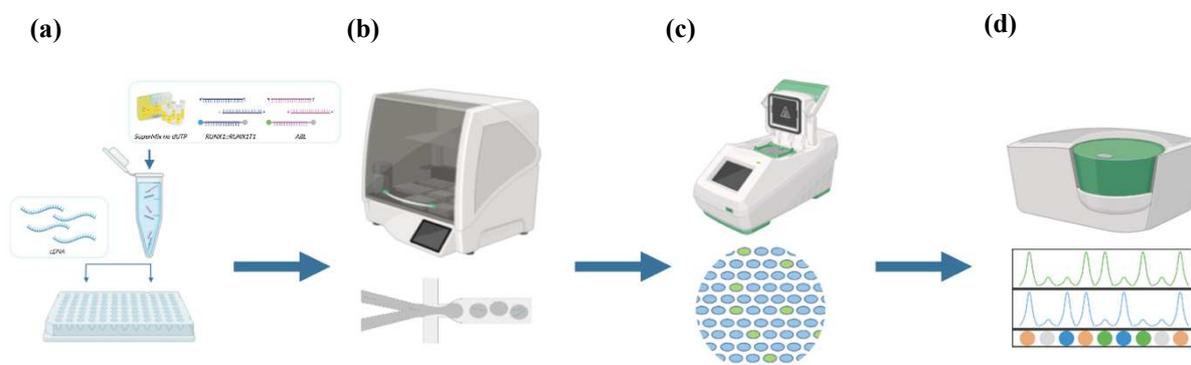
Afin de standardiser les concentrations, un dosage de l'ARN extrait est réalisé à l'aide d'un spectrophotomètre DropSens™. En cas d'ARN supérieur à 100 ng/μL, une dilution est effectuée.

### 2.4. Rétro-transcription

L'ARN normalisé est rétro-transcrit en ADNc par une rétro-transcriptase (ADN polymérase ARN dépendante). Un mélange d'héxa-nucléotides de séquences aléatoires est ajouté au mix réactionnel afin de servir d'amorces.

## 3. Droplet-digital PCR

La ddPCR se réalise en quatre étapes : la préparation de la plaque (Figure 16-a), la génération des gouttelettes (Figure 16-b), l'amplification des cibles (Figure 16-c) et la détection avec analyse des résultats (Figure 16-d).



**Figure 16** (a) Préparation de la plaque de PCR digitale (b) Génération des gouttelettes par l'AutoDG (c) Amplification par thermocycleur (d) Lecture par le QX200

### 3.1. Préparation de la plaque

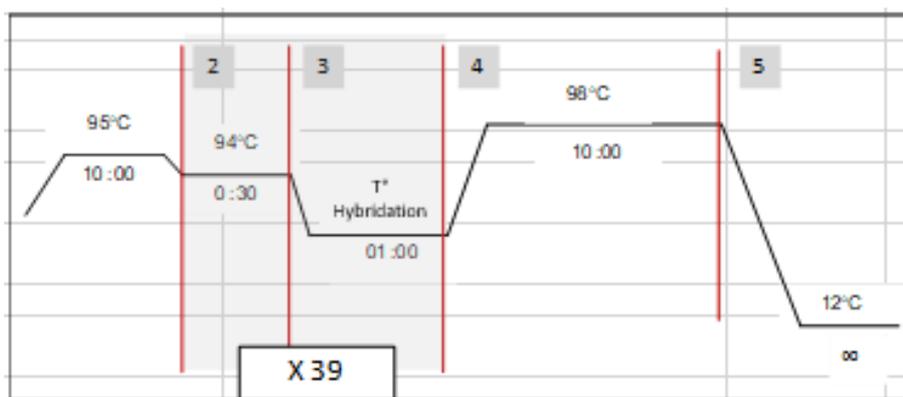
Un mix réactionnel est réalisé en utilisant, par puit, 10 $\mu$ L de PCR supermix (No dUTP) à 2X, 0.2  $\mu$ L d'amorce sens et anti-sens pour le gène cible (à 100 pM/ $\mu$ L) pour le gène cible, 0.1  $\mu$ L de sonde (à 100 pM/ $\mu$ L) pour le gène cible, 0.2  $\mu$ L d'amorces sens et antisens pour le gène de référence (à 100 pM/ $\mu$ L) et 0.1  $\mu$ L de sonde pour le gène de référence (à 100 pM/ $\mu$ L) et 4.2  $\mu$ L H<sub>2</sub>O. Ce mix est réparti à un volume de 17,3  $\mu$ L dans une plaque Biorad® ddPCR de 96 puits. En cas de suivi, 5,8  $\mu$ L d'échantillon sont ajoutés dans le puit. En cas de diagnostic et de rechute, 1  $\mu$ L d'échantillon et 4,8  $\mu$ L d'eau sont ajoutés dans le puit au pur et au 1/10<sup>ème</sup>. Dans le cadre de nos analyses de validation de méthode, ce volume d'échantillon a pu être adapté. A l'aide d'une thermo-scelleuse, un film aluminium est apposé à la surface de la plaque (temps = 6s, 180°C). Cette dernière est ensuite centrifugée 1 min.

### 3.2. Générations des gouttelettes

Les gouttelettes sont générées de manière automatisée grâce l'Automated-Droplet Generator de Biorad®. Les échantillons et l'huile sont chargés sur une cartouche micro-fluidique composée de micro-canaux positionnés perpendiculairement afin de permettre la rencontre des deux liquides. Grâce à cette optimisation des canaux, environ 20 000 gouttelettes sont générées (de l'ordre du nanolitre). L'émulsion est ensuite transférée dans une nouvelle plaque de 96 puits conservés sur bloc froid afin de maintenir d'intégrité de l'émulsion. Cette plaque est également scellée à l'aide d'un film aluminium et d'une thermo-scelleuse (temps = 6s, T°=180°C).

### 3.3. Amplification par PCR des cibles

Les séquences cibles contenues dans les gouttelettes sont amplifiées par PCR en point final grâce au thermocycleur. La plaque est d'abord chauffée à 95°C pendant 10 minutes. 40 cycles sont réalisés en répétant une première phase à 94°C pendant 30 secondes puis 1 minute à la température d'hybridation choisie. Le prélèvement est ensuite chauffé de nouveau à 94°C pendant 10 minutes avant d'être refroidie à 12°C à l'infini (Figure 17).



**Figure 17** Cycle de température permettant l'amplification des cibles

### 3.4. Mesure du signal

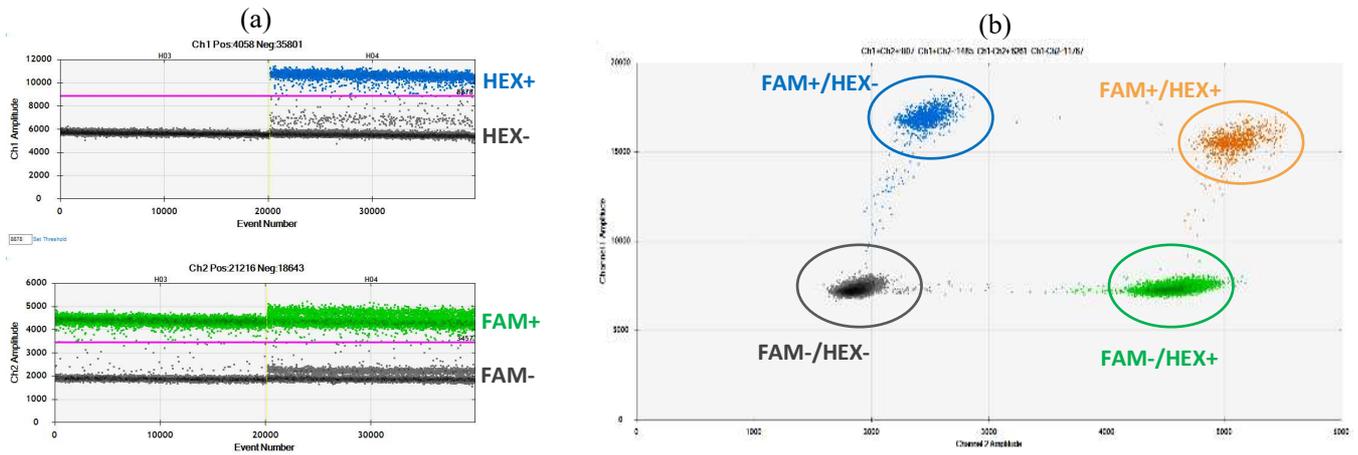
La plaque contenant les acides nucléiques amplifiés est chargée dans le lecteur QX200 Droplet Reader de Biorad®. Puit par puit, les échantillons sont prélevés et à la manière d'un cytomètre en flux, chaque gouttelette passe devant un détecteur. Les hautes températures de l'amplification rigidifient la structure de la paroi des gouttelettes afin de résister aux forces de cisaillement imposées à cette étape. Un certain nombre de gouttelettes peut néanmoins avoir été perdu au cours les étapes précédentes. La fluorescence est mesurée sur les canaux d'émissions FAM (*excitation à 494 nm, émission à 518 nm*) et HEX (*excitation à 535 nm, émission à 553 nm*). Entre chaque lecture, un cycle de lavage est réalisé par l'automate afin d'éviter les contaminations inter-échantillons. Un puit est lu en environ 90 secondes.

### 3.5. Analyse des données

L'analyse des résultats est réalisée à l'aide du logiciel QuantaSoft™. Une bille est considérée comme positive si un signal de fluorescence est détecté. Quatre types de signaux peuvent être détecté dans les billes :

- FAM-/HEX- (billes doubles négatives)
- FAM+/HEX- (billes positives pour le gène cible)
- FAM-/HEX+ (billes positives pour le gène de référence)
- FAM+/HEX + (billes doubles positives).

La représentation 1D montre alors un nuage de billes positives versus un nuage de billes négatives (Figure 18-a). La représentation 2D montre les quatre nuages : billes doubles négatives en gris, billes positives pour le gène cible en bleu, billes positives pour le gène de référence en vert et billes doubles positives en orange (Figure 18-b).



**Figure 18** (a) Représentation 2D des billes (b) Représentation 3D des billes

### 3.6. Loi de Poisson

Bien que théoriquement chaque compartiment contienne 1 copie, la répartition aléatoire des molécules de ADNc amplifiées dans les gouttelettes peut conduire à la présence d'aucune ou plusieurs copies dans chaque bille. La lecture du signal étant en point final, il n'est pas possible de différencier si un signal positif correspond à une, deux ou plusieurs copies de gènes cibles entraînant une possible sous-estimation du nombre total de copies détectées. Afin de corriger cela, il est possible d'utiliser la loi de Poisson puisque la répartition des molécules dans les billes suit la loi binomiale résultant d'évènements aléatoires et indépendants.

Selon la loi de Poisson, la probabilité  $Pr(n)$  qu'une gouttelette contienne  $n$  copies de la cible de concentration moyenne  $c$  est donnée par la formule suivante :  $Pr(n) = \frac{c^n e^{-c}}{n!}$ . La probabilité qu'une gouttelette ne contienne aucune copie est donc :  $Pr(0) = e^{-c}$ .

Or,  $Pr(0)$  peut être estimé de manière fiable en calculant  $E$ , la fraction observée de gouttelette vide :  $E = \frac{N_{\text{ég}}}{N_{\text{tot}}}$  et  $E = e^{-c}$ .

La concentration  $C$  est donc égale à (en copies/uL) :

$$C = -\ln\left(\frac{N_{\text{ég}}}{N_{\text{tot}}}\right) \times \frac{1}{V_{\text{droplet}}}$$

L'estimation du nombre de gouttelettes par la Loi de Poisson est d'autant fiable que le nombre de cible est faible. Le logiciel QuantaSoft™ fournit un intervalle de confiance de 95% de la valeur des billes détectées. Deux erreurs peuvent néanmoins exister : l'erreur de sous-échantillonnage et l'erreur de partitionnement.

- L'erreur de sous-échantillonnage possède un impact sur la détection des faibles concentrations et est indépendante de la méthode. Cette erreur existe dans tous les essais

biologiques n'analysant par l'intégrité d'un échantillon mais uniquement un sous-échantillon.

- L'erreur de partitionnement interfère avec les concentrations élevées et va dépendre de l'échantillonnage et de l'instrument de partitions. La loi de poisson repose sur la détection des partitions vides et plus les concentrations sont élevées, moins ces dernières sont présentes et donc plus l'erreur est significative.

Plus l'échantillon est grand et plus il existe de compartiments, moins les erreurs auront un impact sur l'analyse.

#### **4. Statistiques**

La comparaison de proportions a été réalisée à l'aide d'un test du Chi-deux. La comparaison des méthodes de qPCR et la ddPCR a été réalisée à l'aide d'un test de corrélation de Pearson et de la méthode de Bland Altman calculées à l'aide du logiciel IBM SPSS Statistic.

## RESULTATS

### 1. Choix des amorces

Le transcrit *RUNX1::RUNX1T1* ne se présente que sous une seule forme avec des points de cassures situés en e5 de *RUNX1* et en e2 de *RUNX1T1*.

Les amorces capables de reconnaître ces séquences (sens et antisens) actuellement utilisées en RT-qPCR TaqMan® sont issues des travaux de standardisation de Gabert et al. (100). La majorité des séquences choisies dans ce large travail pluridisciplinaire résulte du travail précédent des BIOMED-1 (42). Néanmoins, pour les amorces de *RUNX1::RUNX1T1*, en raison de la présence d'un bruit de fond important, de nouvelles séquences ont été désignées. Ces séquences sont aujourd'hui commercialement disponibles (ENF701 et ENR761) et ont été utilisées dans notre analyse.

De même pour les amorces du gène de référence *ABL*, les amorces de routine commercialement disponibles (EN1063 et EN1003) ont été utilisées (Figure 19-a et b).

De 5' à 3'	Séquences des amorces	
	Sens	Antisens
(a) <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	CACCTACCACAGAGCCATCAAA	ATCCACAGGTGAGTCTGGATT
<i>ABL</i>	TGGAGATAACACTCTAAGCATAACTAAAGGT	GATGTAGTTGCTTGGGACCCA



**Figure 19 (a) Séquences des amorces sens et anti-sens pour *RUNX1::RUNX1T1* et *ABL* (b) Séquence du gène *RUNX1::RUNX1T1* avec le positionnement des amorces et de la sonde**

### 2. Choix des sondes

La séquence des sondes a également été reprise à partir de celle actuellement utilisée en qPCR et issue des travaux de Gabert et al. (Figure 20).

Comme décrit précédemment, la technologie TaqMan® nécessite la présence d'un quencher et d'un reporter sur la sonde. A la différence de la qPCR où la détection des deux cibles est réalisée en deux analyses différentes, la ddPCR permet la double détection en une unique analyse à condition que chaque sonde soit marquée d'un reporter en 5'.

De 5' à 3'	Séquences des sondes
<i>RUNXI::RUNXITI</i>	(6-FAM) – CACCTACCACAGAGCCATCAAA – (BHQ1)
<i>ABL</i>	(6-HEX) – CCATTTTGGTTTGGGCTTCACACCATT- (TAMRA)

**Figure 20** Séquence des sondes pour *RUNXI::RUNXITI* et *ABL*

Pour le gène *RUNXI::RUNXITI*, il s'agit d'un marquage au FAM comme en qPCR tandis que pour le gène *ABL*, c'est le marquage HEX qui a été choisi. Afin de s'assurer d'obtenir le signal le plus spécifique possible pour la détection de *RUNXI::RUNXITI*, la sonde de ce dernier a été testée avec TAMRA et BHQ1, deux types de quencher différents. La réalisation de l'analyse à plusieurs températures et la comparaison plus spécifique à 62°C montre deux avantages à l'utilisation du BHQ1. D'une part, le nombre de billes non spécifiques (ni positives, ni négatives) semble moins important et d'autre part, l'écart d'intensité entre les billes positives et négatives ( $\Delta_{TAMRA} = 2\,500$  RFU vs  $\Delta_{BHQ1} = 11\,500$  RFU) favorise la distinction entre les deux populations de billes. L'utilisation du quencher BHQ1 dilué au quart (afin d'augmenter le nombre d'analyses réalisables avec un réactif et diminuer l'éventuel bruit de fond) semble finalement moins pertinente que l'utilisation pure qui a été retenue.

### 3. Choix de la température d'hybridation

Le choix de la température d'hybridation est une étape clé à la mise au point d'une PCR. Si la température d'hybridation choisie est trop basse, il peut se produire une amplification non spécifique tandis que si elle est trop élevée, le rendement pourra être réduit. Elle doit être choisie en fonction de la séquence des amorces et de la nature des acides nucléiques cibles. Elle peut être estimée en utilisant la formule de Wallace et al. :  $T_m = 4(G+C) + 2(A+T)$  °C. Cette formule donne un ordre d'idée mais nécessite souvent un ajustement (102).

Actuellement, la qPCR de routine est réalisée à 60°C pour *RUNXI::RUNXITI* et *ABL*. Les températures calculées sont aux alentours majoritairement de 64°C. Deux gradients de températures ont été réalisés : un premier de 52 à 62°C et un second de 62 à 70°C.

Un nuage non spécifique apparaît pour les températures les plus basses. Deux températures semblent permettre une belle distinction des billes positives/négatives : 62°C et 65°C. La comparaison plus spécifique de ces deux températures montre que 62°C est la température la plus appropriée (Figure 20).

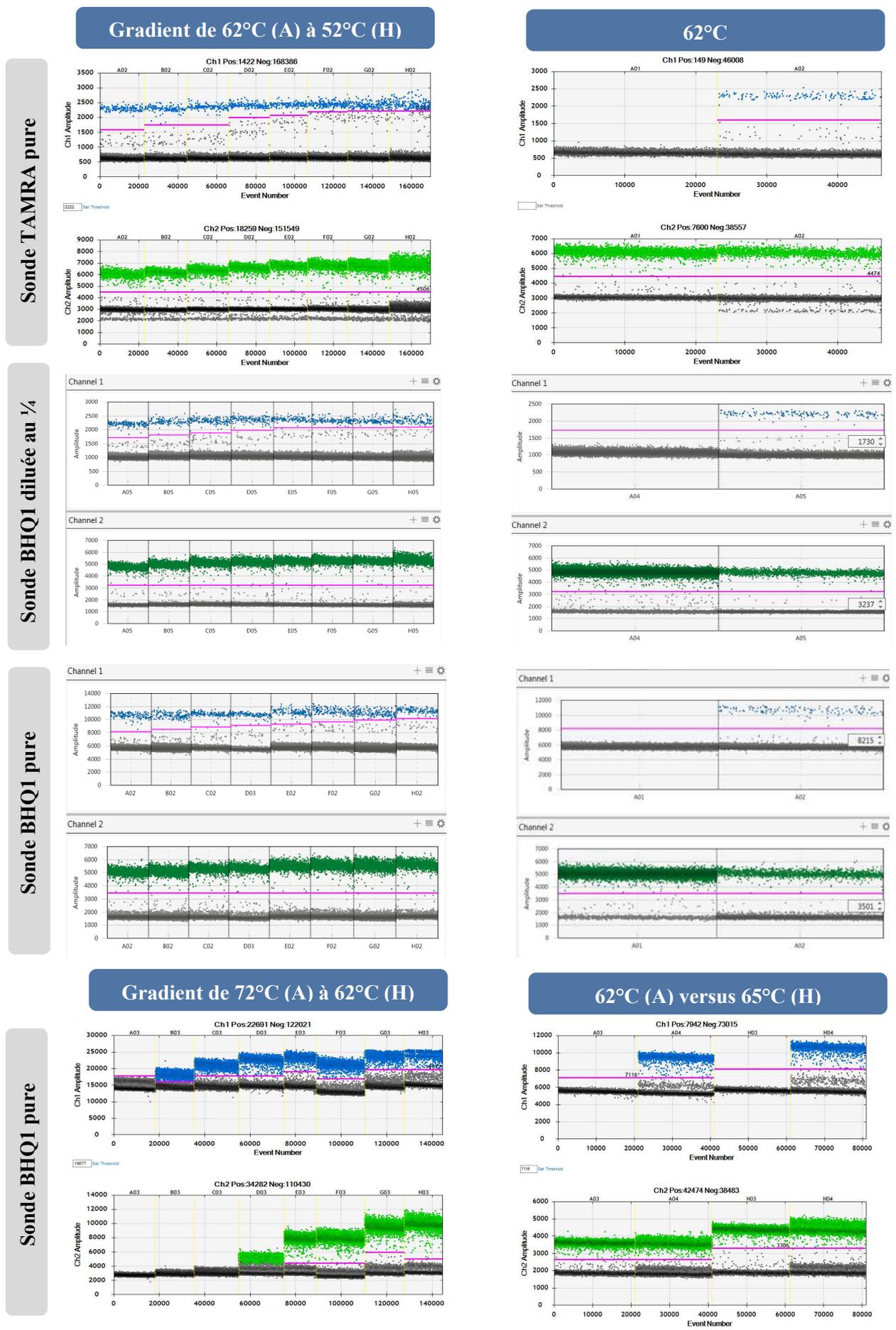
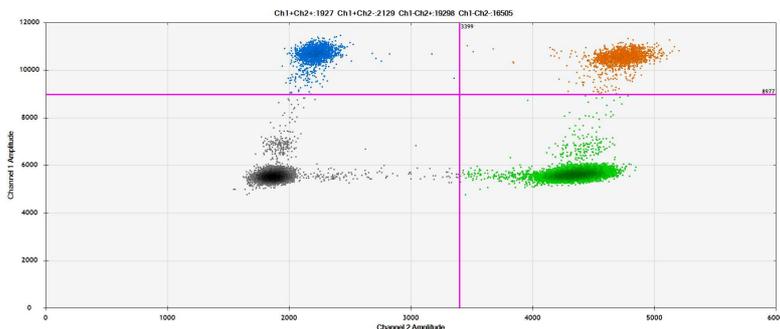


Figure 21 Impact du choix des sondes et des températures d'hybridation sur l'analyse de ddPCR

## 4. Fixation du seuil

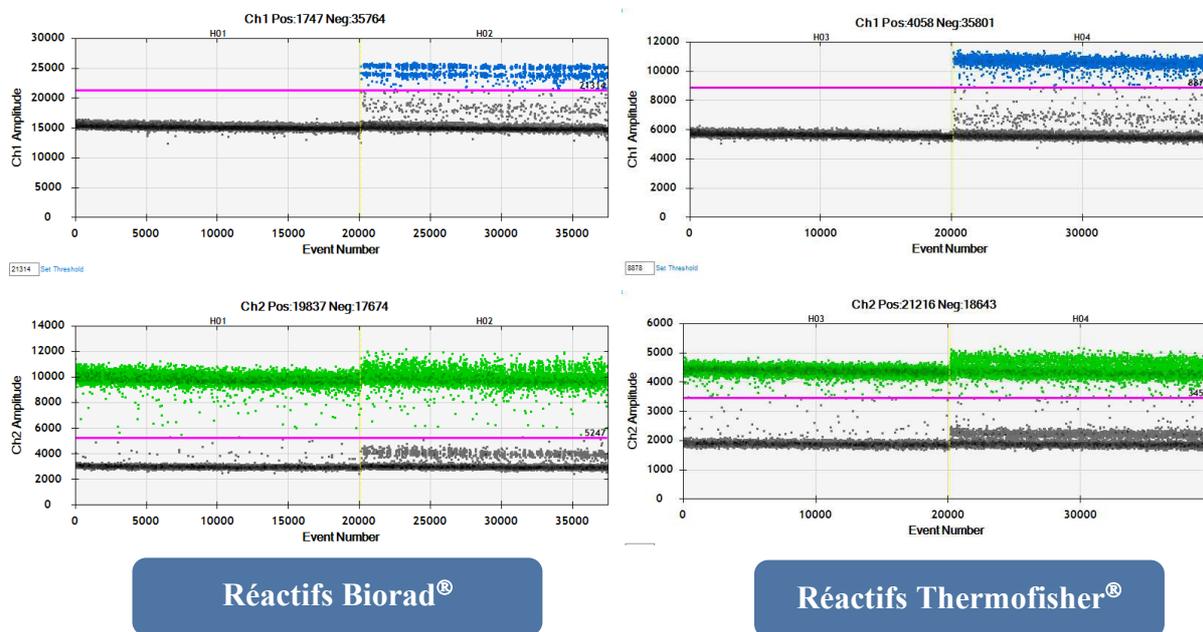
Le seuil de positivité de *RUNXI::RUNXIT1* est fixé à environ 9000 RFU et celui d'*ABL* à environ 3500 RFU.



**Figure 22** Fixation des seuils de positivité

## 5. Choix de la forme des mix réactionnels

Comme décrit précédemment, chaque puits contient un Super Mix réactionnel (contenant tous les réactifs nécessaires à la ddPCR), les amorces, les sondes et l'échantillon. Les sondes et les amorces peuvent être amenées individuellement (réactifs Thermo Fisher®) ou directement sous forme d'un mix (réactifs Biorad®). Afin d'évaluer s'il est possible de diminuer le bruit de fond et limiter les interférences analytiques avec un mix « prêt à l'emploi », les deux systèmes ont été comparés.

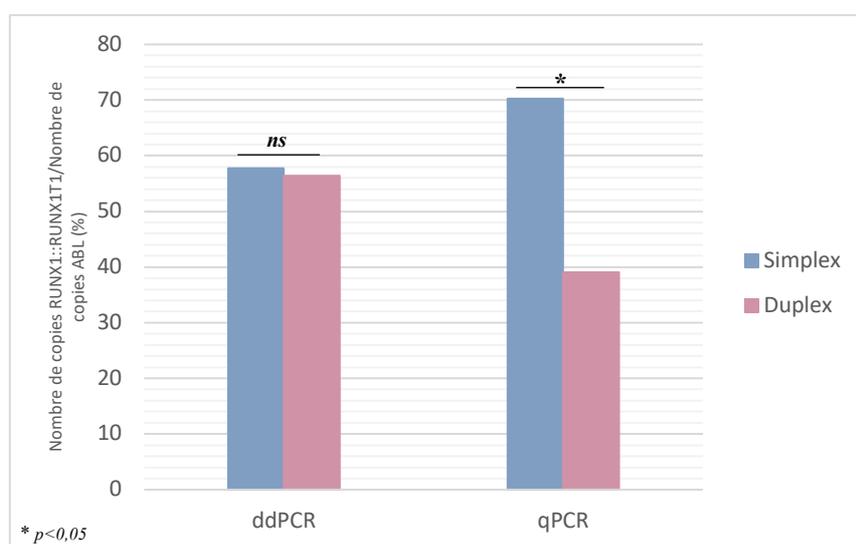


**Figure 23** Comparaison des réactifs à 62°C

A 62°C, le nuage de billes positives pour *RUNXI::RUNXIT1* se dédouble lors de l'utilisation des mix BioRad® et il n'y a pas d'amélioration du bruit de fond. L'utilisation des sondes Thermo Fisher® a donc été retenue.

## 6. Réalisation d'une PCR en duplex

En qPCR, la quantification du nombre de copies de *RUNXI::RUNXIT1* et d'*ABL* est réalisée en deux analyses distinctes car les sondes sont marquées des mêmes reporters et quenchers (FAM - TAMRA) en routine. Dans la ddPCR et grâce à l'utilisation de reporters et quenchers différents, la détection des produits de la PCR peut être quantifiée dans le même puit et la question d'une possible compétition peut se poser. Afin d'exclure cela, une ddPCR a été réalisée sur un même prélèvement avec des sondes/amorces *RUNXI::RUNXIT1* seules, *ABL* seules et ensembles dans le même puit réactionnel. La même analyse a été réalisée en qPCR avec ces mêmes nouvelles sondes (Annexe 2). En comparaison avec la qPCR, aucune compétition n'a été observée en ddPCR duplex ( $p < 0,05$ ) (Figure 24).

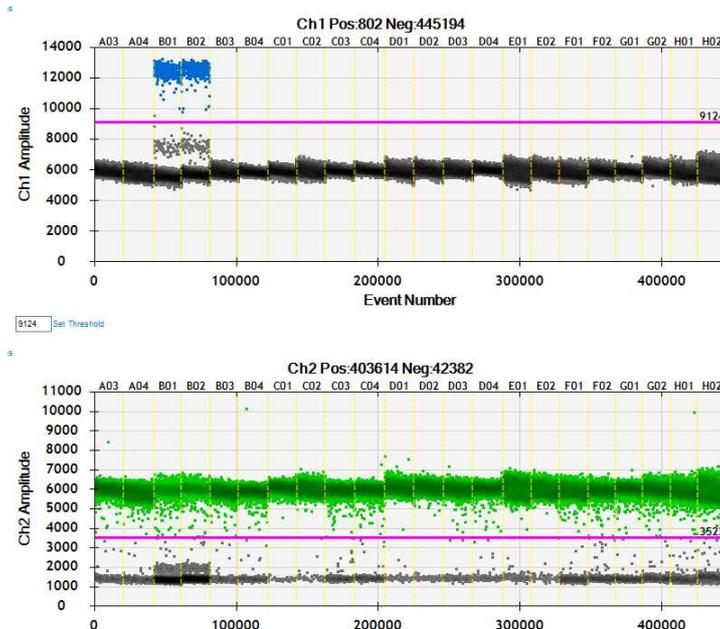


**Figure 24** Comparaison de l'analyse simplex versus duplex en ddPCR et qPCR

## 7. Limite de blanc

La limite de blanc se définit comme la valeur la plus élevée qui peut être détectée dans un échantillon de blanc ne contenant aucun analyte à tester. Elle est essentielle pour déterminer la limite de détection et la limite de quantification.

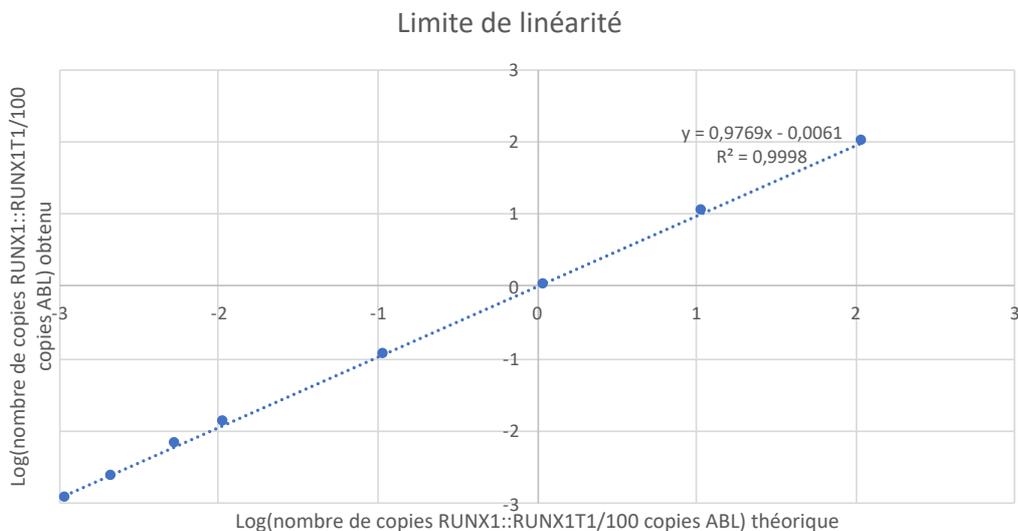
Pour cela, dix prélèvements de témoin négatif, issus de patient dont la recherche de *BCR::ABL* était négative et riche en gène de référence (*ABL* > 100 000 copies), ont été analysés à 62°C en duplicate. Aucune copie de *RUNXI::RUNXIT1* n'a été détectée montrant ainsi qu'il n'existe pas de bruits de fond pour notre analyse (Figure 25). Théoriquement, la limite de détection et de quantification peut être calculée car elles sont égales respectivement à 3,3 et 10 fois la LOB. Ici, la LOB étant nulle, une limite de linéarité doit être effectuée (Annexe 3).



**Figure 25** Limite de blanc

## 8. Limite de linéarité

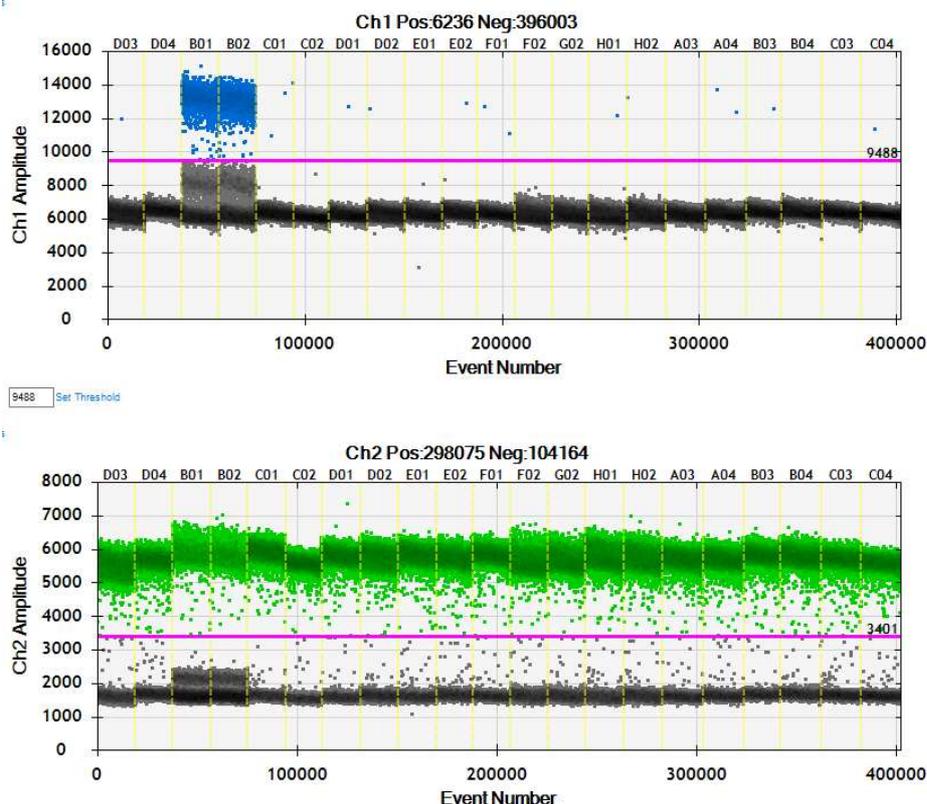
La limite de linéarité est essentielle pour déterminer la plus petite valeur détectable. Un prélèvement d'un patient riche en *RUNX1::RUNX1T1* a été dilué de manière successive. Pour chaque dilution, environ 100 000 copies d'ABL, issues de patients exempts de transcrits de fusion, ont été apportées afin d'obtenir des ratios de 100%, 10%, 1%, 0,1%, 0,005%, 0,002% et 0,001%. Respectivement, pour 100 000 copies d'ABL, il a été détecté 100 000, 10 000, 1 000, 100, 10 et 1 copies de *RUNX1::RUNX1T1* en duplicate (Annexe 4). La linéarité a été conservée lors des dilutions successives (Figure 26). Il est possible de détecter une 1 copie de *RUNX1::RUNX1T1* pour 100 000 copies d'ABL avec cette méthode.



**Figure 26** Limite de linéarité

## 9. Limite de détection

La limite de détection se définit comme la plus petite quantité d'analytes qui peut être détectée et différenciée du bruit de fond. La limite de blanc étant nulle et la linéarité prouvée, la limite de détection peut être fixée théoriquement à  $10^{-5}$ . Afin de vérifier cela, un prélèvement de patient a été dilué de manière à contenir environ une copie puis enrichi avec environ 38 000 copies d'ABL. Ce patient a été passé en 10 essais en duplicate afin de détecter pour au moins 1 copie de *RUNX1::RUNX1T1* pour 75 000 copies d'ABL. (Annexe 5). La limite de détection est donc fixée à 0,001% ainsi que la limite de quantification (Figure 27).



**Figure 27** Limite de détection

## 10. Détection des contaminations

Afin de contrôler l'absence de contamination des réactifs, du matériel et de l'environnement, un mélange réactionnel exempt d'ADNc (remplacé par de l'eau) a été passé sur chaque plaque analysée. Aucune contamination n'a été détectée.

## 11. Répétabilité

La répétabilité exprime la fidélité (étroitesse de l'accord entre une série de mesures d'un même échantillon) évaluée dans des conditions opératoires identiques (Table 4). Trois niveaux

ont été testés (100%, 10%, 1%) à l'aide d'échantillons de patients analysés dix fois sur une même plaque de ddPCR (Annexe 6).

	Moyenne (%)	Écart-type (%)	IC 95%		CV (%)
			Min	Max	
Niveau 1	1,33	0,11	1,26	1,39	<b>8,34</b>
Niveau 2	9,27	0,25	9,11	9,42	<b>2,74</b>
Niveau 2	123,54	2,23	122,16	124,92	<b>1,81</b>

**Table 4** Essais de répétabilité

## 12. Fidélité intermédiaire

La fidélité intermédiaire exprime la variabilité de la méthode. Trois niveaux ont été testés avec des modifications mineures de la technique (opérateur, jour, température et hygrométries) de l'environnement (Table 5). Comme pour la répétabilité, trois niveaux ont été testés. Neuf passages ont été réalisés pour les niveaux 1% et 100% et dix passages pour 10%, tous en duplicate (Annexe 7).

	Moyenne (%)	Écart-type (%)	IC 95%		CV (%)
			Min	Max	
Niveau 1	1,08	0,064	1,03	1,12	<b>5,9</b>
Niveau 2	11,97	0,25	11,81	12,13	<b>2,1</b>
Niveau 2	136,01	1,63	134,95	137,08	<b>1,2</b>

**Table 5** Essais de fidélité intermédiaire

## 13. Justesse et exactitude

La justesse correspond à l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur acceptée comme référence. Elle se base sur les étalons externes de qualité (EEQ) fournis par le GBMHM. Elle a été évaluée grâce à 2 séries de quatre contrôles de qualité (fournis en 2023 et 2024) par analyse en duplicate (Table 6 et Annexe 8).

D'après le SH-GTA-14 édité par le COFRAC, il est possible de calculer l'erreur de justesse ( $U_{EEQ}$ ) à partir de l'écart entre la valeur de référence et la valeur obtenue ( $E_{EEQ}$ ). Comme plusieurs valeurs d'EEQ ont été analysé, la moyenne des écarts est calculée (103).

$$\bar{E} = \frac{\sum_i (X_{lab} - X_{réf})}{n} \text{ et } \hat{\sigma}_E = \sqrt{\frac{\sum_i (E_i - \bar{E})^2}{n-1}} \text{ avec } E_i = (X_{lab} - X_{réf})$$

$X_{lab}$  : résultat du laboratoire,  $X_{réf}$  : valeur assignée de la comparaison,  $E$  : écart,  $n$  = le nombre de mesures, et  $\hat{\sigma}_E$  : l'écart-type des écarts

L'incertitude peut ensuite être évaluée par  $U_{EEQ}$  :

$$U_{EEQ} = \sqrt{\left(\frac{|\bar{E}|}{\sqrt{3}}\right)^2 + \hat{\sigma}_E^2}$$

L'exactitude est l'expression de la combinaison de la justesse et de la fidélité (incertitude combinée  $U_c$ ). Son évaluation se base sur le contrôle de qualité interne et l'EEQ. L'incertitude sur la concentration d'analyse ( $U_C$ ) correspond à la racine carrée de la somme quadratique des composantes de l'incertitude issues du CIQ ( $U_{CIQ}$ ) obtenu avec la fidélité intermédiaire et de l'EEQ ( $U_{EEQ}$ ).

$$U_c = \sqrt{U_{CIQ}^2 + U_{EEQ}^2} \text{ avec } U_{CIQ}^2 = \frac{CV \times m}{100}$$

Les incertitudes combinées sont données dans la Table 7 et sont à des seuils très acceptables.

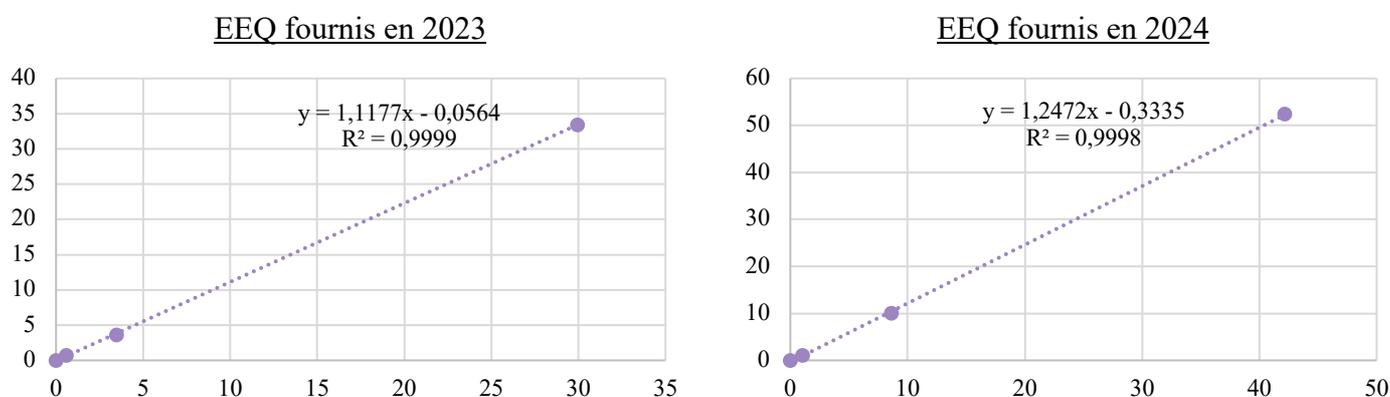
		Valeur de référence	Valeur ddPCR	IC 95%	
				Min	Max
2024	Niveau 1	1,282	1,04	0,95	1,12
	Niveau 2	8,95	8,64	8,62	8,65
	Niveau 3	41,299	42,2	41,83	42,51
2023	Niveau 1	0,949	0,585	0,56	0,61
	Niveau 2	4,735	3,47	2,95	3,97
	Niveau 3	52,41	29,95	29,02	30,87

**Table 6** Essai de justesse

Niveau	Incertitude $U_c$
1%	0,81660141
10%	0,25072174
100%	6,4837848

**Table 7** Incertitudes combinées

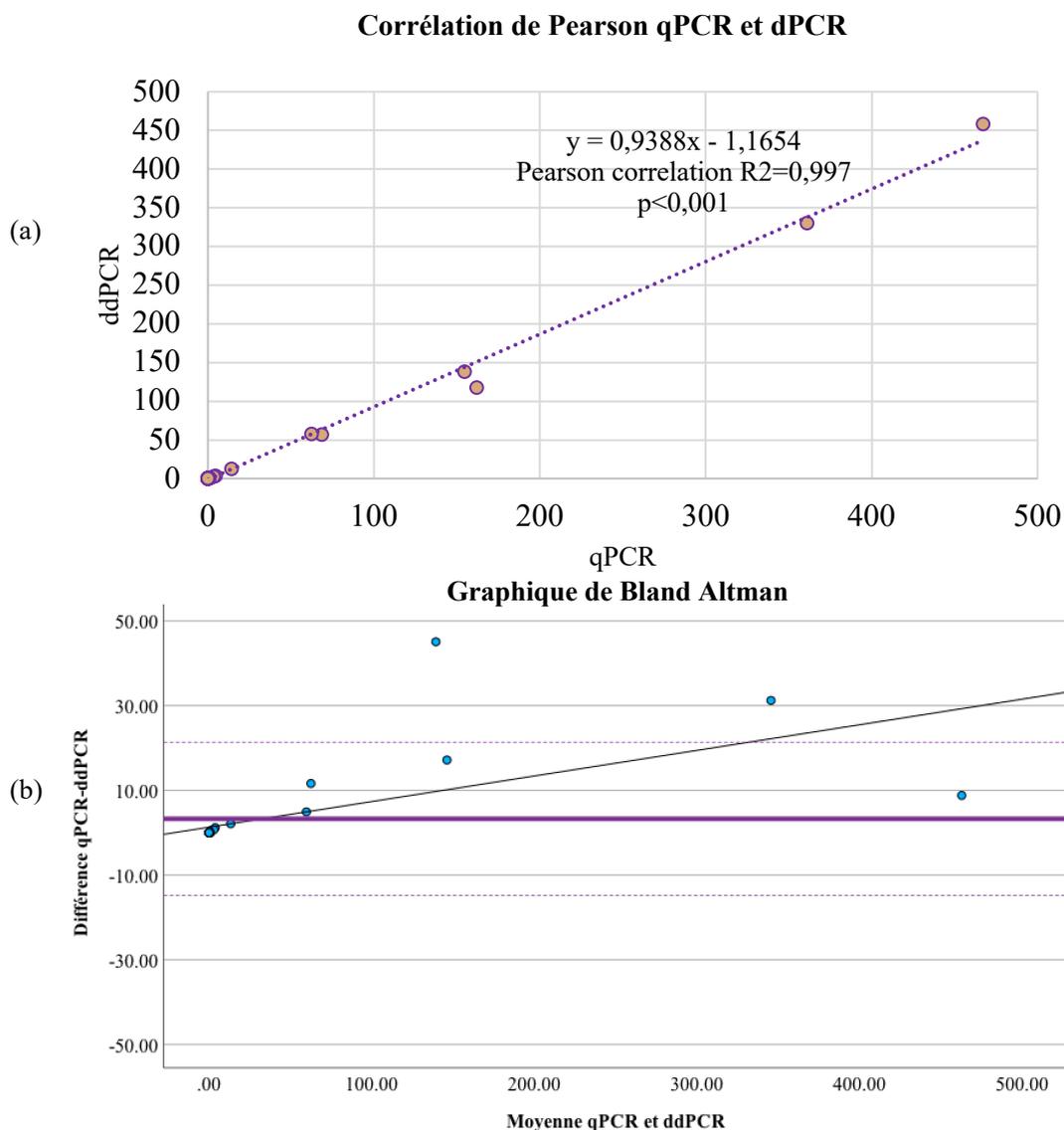
La corrélation entre les valeurs obtenues au sein du laboratoire en qPCR et ddPCR a également été réalisée et s'est montrée très satisfaisante ( $R^2 = 0,99$ ).



**Figure 28** Corrélation entre la qPCR et la ddPCR basée sur les EEQ 2023 et 2024 à l'aide des valeurs obtenues au laboratoire

## 14. Comparaison de méthode

Afin de comparer la ddPCR à la qPCR, 38 prélèvements de patients issus de la même extraction et de la même rétrotranscription ont été analysés. Chaque prélèvement a été passé en duplicate dans les deux méthodes (Annexe 9). L'analyse de corrélation de Pearson montre une très bonne corrélation ( $r^2 > 0.99$  et  $p$ -value  $< 0.001$ ). Quatre patients possèdent une ddPCR positive alors que la qPCR est négative. Aucun patient n'a de ddPCR négative avec une qPCR positive. La courbe de tendance révèle une sous-estimation des valeurs en ddPCR en comparaison aux valeurs de la qPCR (Figure 29-a). L'analyse de Bland Altman montre que plus les valeurs sont élevées et plus une divergence est observée entre les deux méthodes (Figure 29-b).



**Figure 29 (a) Corrélation de Pearson entre les valeurs obtenues en qPCR et celles obtenues en ddPCR (b) Graphique de Bland Altman**

## DISCUSSION

La ddPCR est une méthode très sensible qui permet de quantifier les transcrits de fusion comme *RUNXI::RUNXITI*. L'optimisation de cette méthode a été un processus multi-étape et semble très prometteuse pour améliorer le suivi de la MRD des LAM avec transcrits de fusion.

Afin de suivre la MRD en ddPCR, deux matrices peuvent être utilisées : l'ARN ou l'ADN tumoral. En cas de transcrits de fusion, les points de cassures de l'ADN sont souvent différents d'un patient à l'autre et peuvent se produire à la fois sur des sites introniques et exoniques. Il est donc nécessaire de connaître pour chaque patient le point de cassure précis et de désigner des amorces spécifiques et personnalisées. Les points de cassures peuvent également être parfois éloignés de plus de 10 kb, distance difficile à couvrir avec une analyse de routine. L'ADN, au-delà de sa stabilité, permet de détecter les cellules leucémiques quiescentes qui ne synthétisent pas d'ARN. Néanmoins, dans les LAM, les gènes de fusion sont également transcrits en ARN. Ce dernier peut être utilisé comme cible de PCR après une rétrotranscription en ADNc. Il a l'avantage d'être surexprimé dans les cellules tumorales, ce qui rend sa détection plus facile. Les ADNc sont également très stables avec une conservation de plusieurs semaines à 4°C. Mais surtout, l'ARN permet de s'affranchir de l'hétérogénéité des cassures. Ainsi, l'ELN recommande le suivi de *RUNXI::RUNXITI* sur l'ARN rétro-transcrit en ADNc, matrice choisie pour la réalisation de la ddPCR.

Les séquences d'amorces et de sondes ont été choisies à l'identique par rapport à celles utilisées en qPCR, préalablement recommandées par Gabert et al. pour la standardisation de la méthode (42). L'unique différence entre le qPCR et la ddPCR concerne le marquage des sondes : *RUNXI::RUNXITI* en FAM et *ABL* en HEX. Cela permet de détecter les deux cibles en une même analyse. Les quencher TAMRA et BHQ1 ont été comparés sur *RUNXI::RUNXITI*. Les quencher sont des substances capables d'absorber l'énergie du reporter et de réémettre une grande partie de cette énergie sous forme de chaleur (dans le cas des "dark quenchers") ou de lumière visible (dans le cas des "quencher fluorescent"). Les quencher fluorescents comme le TAMRA émettent un signal de fond qui complique l'analyse des données en raison de la diaphonie entre les canaux. Cette auto-fluorescence n'est pas retrouvée avec les "dark quenchers" comme BHQ1. Ce dernier montre de meilleurs résultats avec un bruit de fond réduit et une intensité de fluorescence plus élevée permettant une meilleure distinction des billes négatives/positives. Cela est concordant avec les recommandations du fournisseur puisque Biorad® recommande de ne pas utiliser le quencher TAMRA car son émission dépasse celle du HEX conduisant à un bruit de fond supplémentaire au cours de l'analyse.

La température d'hybridation a été choisie afin de distinguer de manière optimale le nuage de billes positives des billes négatives. Le gradient de température de 62°C à 52°C a montré que le nuage de billes négatives se dédoublait et ce de manière très importante à faible température. Un second gradient de 70°C à 62°C a été réalisé afin de voir si de hautes températures pourraient permettre de s'affranchir de ce phénomène. La température de 65°C montrait un résultat intéressant. Finalement, la comparaison à 62°C versus 65°C montre que cette première température est plus adaptée à notre analyse avec une intensité de fluorescence plus élevée et une meilleure facilité à distinguer les billes positives/négatives. La température de 62°C a donc été retenue.

Concernant l'utilisation de mix de sonde et d'amorces « prêt à l'emploi », il a été décidé de ne pas les utiliser pour la suite de ce travail étant donné le coût important de ces mix et l'absence d'amélioration des résultats. Au niveau de l'ABL, les résultats semblent identiques. Il pourrait être intéressant d'utiliser ce mix en routine pour faciliter les préparations de plaques et limiter les échecs d'analyses liés à un oubli d'une sonde ou d'une amorce.

Le seuil de distinction a été fixé à 9000 RFU pour *RUNXI::RUNXITI* et 3500 RFU pour *ABL*. Ce seuil permet de bien distinguer les populations positives/négatives de manière à ne pas prendre en compte dans les billes positives le troisième nuage qui se détache des billes négatives. Une hypothèse pouvant expliquer l'origine de ce nuage non spécifique est la fixation de sonde *RUNXI::RUNXITI* sur la cible *ABL*. Une qPCR a été réalisée en incubant la sonde *RUNXI::RUNXITI* avec des plasmides d'*ABL* puis en incubant la sonde *ABL* avec le plasmide *RUNXI::RUNXITI*. Contrairement à nos attentes, la sonde *RUNXI::RUNXITI* ne fixe pas la cible *ABL* mais la sonde *ABL* quant à elle fixe la cible *RUNXI::RUNXITI*. Cela est notamment important pour les valeurs faibles (Annexe 10) Ce phénomène a peu d'impact pour la quantification mais laisse néanmoins penser que pour les faibles valeurs, une compétition pourrait exister entre les sondes. En ddPCR, l'abondance relative permet de limiter ce phénomène (104).

L'analyse en duplex étant nouvelle, l'absence de compétition entre les cibles a été vérifiée en ddPCR. Aucune n'a été constatée dans la ddPCR contrairement à la qPCR. La quantification simultanée de plusieurs cibles peut être influencée par un déséquilibre quantitatif entre ces dernières. La consommation déséquilibrée des réactifs pour l'amplification impacterait l'efficacité de la PCR pour la cible moins présente. Le partitionnement du milieu permet de s'affranchir de ce phénomène.

Afin de fixer les seuils de LOD et de LOQ, la limite de blanc a été réalisée sur des patients négatifs en duplicate car la LOD correspond à 3 fois l'écart-type de la LOB et la LOQ à 10 fois l'écart-type (105). Elle n'a montré aucune bille faussement positive. La LOD ne peut

donc pas être fixée sur l'écart-type de la LOB. Pour cela, la linéarité a été étudiée de 1 à  $10^5$  copies de *RUNXI::RUNXITI* pour  $10^5$  copies d'*ABL*. La méthode est bien linéaire. Concernant la limite de détection, une copie, au minimum, a toujours été détectée permettant de fixer à  $10^{-5}$  le seuil en travaillant toujours en duplicate pour chaque échantillon. Même si cette même sensibilité est atteinte en qPCR, cette dernière n'est pas calibrée pour détecter entre 1 et 10 copies puisque la gamme du plasmide s'étend de 10 à  $10^6$  pour *RUNXI::RUNXITI* (et  $10^3$  à  $10^6$  copies pour *ABL*). Les copies comprises entre 1 et 10 sont extrapolées pouvant introduire un biais de mesure. En ddPCR, grâce à la quantification absolue, il a été possible de détecter de manière fiable et reproductible entre 1 et 10 copies de *RUNXI::RUNXITI* pour 100 000 copies d'*ABL*. La ddPCR est donc meilleure pour la détection d'évènements rares. Ce phénomène est notamment expliqué par la notion de l'abondance relative. L'effet de partitionnement permet à la copie mutante de se trouver localement dans une abondance plus élevée que si elle était en solution libre. Le signal généré est alors plus facile à détecter.

A  $10^{-5}$ , la limite de détection de la technique de ddPCR est atteinte. Un seuil à  $10^{-6}$  (*1 copie pour  $10^6$* ) ne pourra être atteint pour deux raisons. Premièrement, il n'existe pas de prélèvements de patients avec autant de copies d'*ABL* et il n'est pas possible d'utiliser d'une solution de plasmides de  $10^6$  copies d'*ABL* car ces derniers sont hautement contaminants pour la ddPCR et leur poids moléculaire important ainsi que leur forme circulaire ne sont pas représentatifs du comportement des ADNc des patients dans les gouttelettes. Ensuite, pour les valeurs d'*ABL* supérieures à 150 000 copies environ, un phénomène de saturation est parfois observé et en l'absence de billes négatives, la loi de poisson n'est plus applicable du fait de l'erreur de partitionnement. Pour les patients contenant de grand nombre de copies de *RUNXI::RUNXITI* ou *ABL* et où une saturation serait observée, une dilution du prélèvement peut être réalisée. L'unique solution pour obtenir une sensibilité de  $10^{-6}$  serait d'analyser l'échantillon avec environ 100 000 copies d'*ABL* dans 10 puits puis d'additionner ces puits. Cela ne serait pas utilisable en routine. La limite de détection a donc été fixée à  $10^{-5}$  avec une détection fiable des valeurs comprises entre 1 et 10 copies de *RUNXI::RUNXITI* ce qui rend la ddPCR très intéressante dans le contexte du suivi de la MRD. L'étude de la répétabilité et de la fidélité intermédiaire montre une justesse de nos résultats sur les trois niveaux testés.

La comparaison de méthode basée sur le passage de 38 prélèvements de patients, issus de la même extraction et de la même rétro-transcription, montre une très bonne corrélation. Elle montre des discordances dans deux situations : pour la détection de valeurs très faibles et celle de valeurs très élevées.

Pour les valeurs très faibles, la qPCR n'est pas calibrée pour détecter 1 à 10 copies et elle est donc peu fiable sur ces mesures. Des discordances étaient donc attendues. Sur les 38

échantillons de patients analysés, 4 était négatifs en qPCR mais positif en ddPCR : deux prélèvements pour un patient en cours de traitement pour une rechute de sa LAM, un prélèvement dans le cadre d'un suivi de la rémission où la qPCR, un mois avant, était positive (à 0,04%) et un prélèvement dans le cadre d'un suivi de la rémission avec une MRD négative précédemment. En absence d'informations, il n'est possible de dire si ce dernier résultat est la conséquence d'un début de rechute ou d'une contamination de l'analyse. Aucun prélèvement positif en qPCR n'a été négatif en ddPCR. Ces résultats viennent conforter l'amélioration de la sensibilité avec la ddPCR.

Pour les valeurs élevées, une sous-estimation du signal en ddPCR a été observée. Ce phénomène a déjà été constaté dans plusieurs études notamment pour le suivi de la MRD dans les LMC Phi+ (suivi de *BCR::ABL1*) sur ARN (106) ou dans les LAL sur ADN (suivi de l'IgTCR) en ddPCR (107). Ce phénomène peut être imputé à la Loi de poisson et à l'erreur de partitionnement.

Très intéressante pour le suivi de la MRD des patients grâce à la détection de très faibles valeurs, la ddPCR est soumise à quatre limites. Premièrement, il existe un biais d'échantillonnage lié à un biais de représentativité de la prise d'essais par rapport à l'échantillon, mais toutes les PCR quantitatives, aussi sensibles soient-elles, sont impactées. Deuxièmement, il peut arriver que des patients soient très aplasiques ou qu'un échec se produise à l'isolement, à l'extraction ou à la rétro-transcription qui conduisent à un prélèvement de mauvaise qualité avec moins de 10 000 copies d'ABL. En cas de détection de billes positives, il est alors difficile de calculer un ratio fiable. Dans ces cas-là, à la place d'un résultat quantitatif, il est pertinent de rendre que l'analyse est « positive mais non quantifiable ». Puis, il existe l'erreur de partitionnement qui correspond à l'erreur commise lors de l'estimation par la loi de Poisson. Elle est d'autant plus importante que les concentrations sont très élevées mais ce biais peut être évité en diluant les prélèvements très riches. Enfin, avec une sensibilité aussi élevée, la ddPCR est d'autant plus sensible aux contaminations et aux amplifications artéfactuelles. Le choix de sondes et amorces spécifiques est donc essentiel ainsi que le travail en duplicate. La discordance entre les deux puits peut être le motif de repasse de l'analyse. Le travail du biologiste alors est d'autant plus important qu'il peut grâce à l'analyse du suivi de la MRD et du contexte détecter ces contaminations.

Dans l'application aux hémopathies myéloïdes, il n'existe à l'heure actuelle par de recommandations ni de travaux de standardisation comme il peut exister en qPCR. Dans le domaine des hémopathies, l'unique document a été émis par les EuroMRD pour le suivi en ddPCR de la MRD dans les lymphomes du manteau (71). Il existe également une recommandation européenne mais elle reste très générique car applicable dans de nombreux

domaines pour la détection et la quantification (microbiologie, industrie alimentaire, environnement, identification d'espèces)(108)

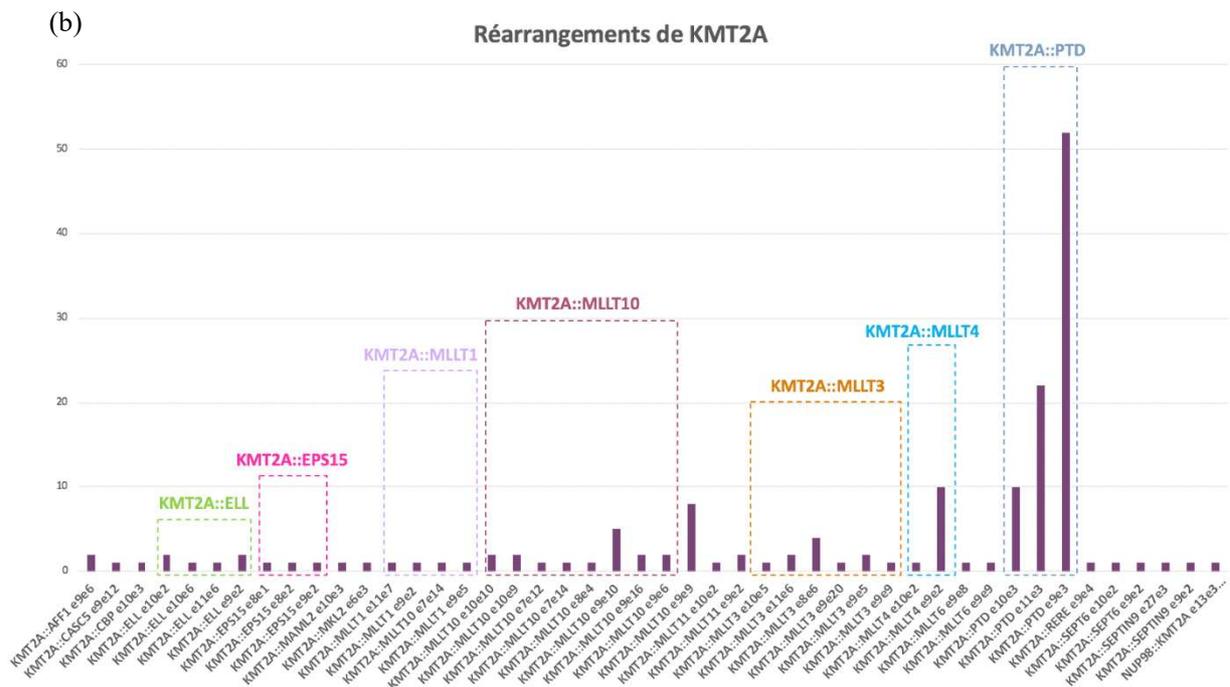
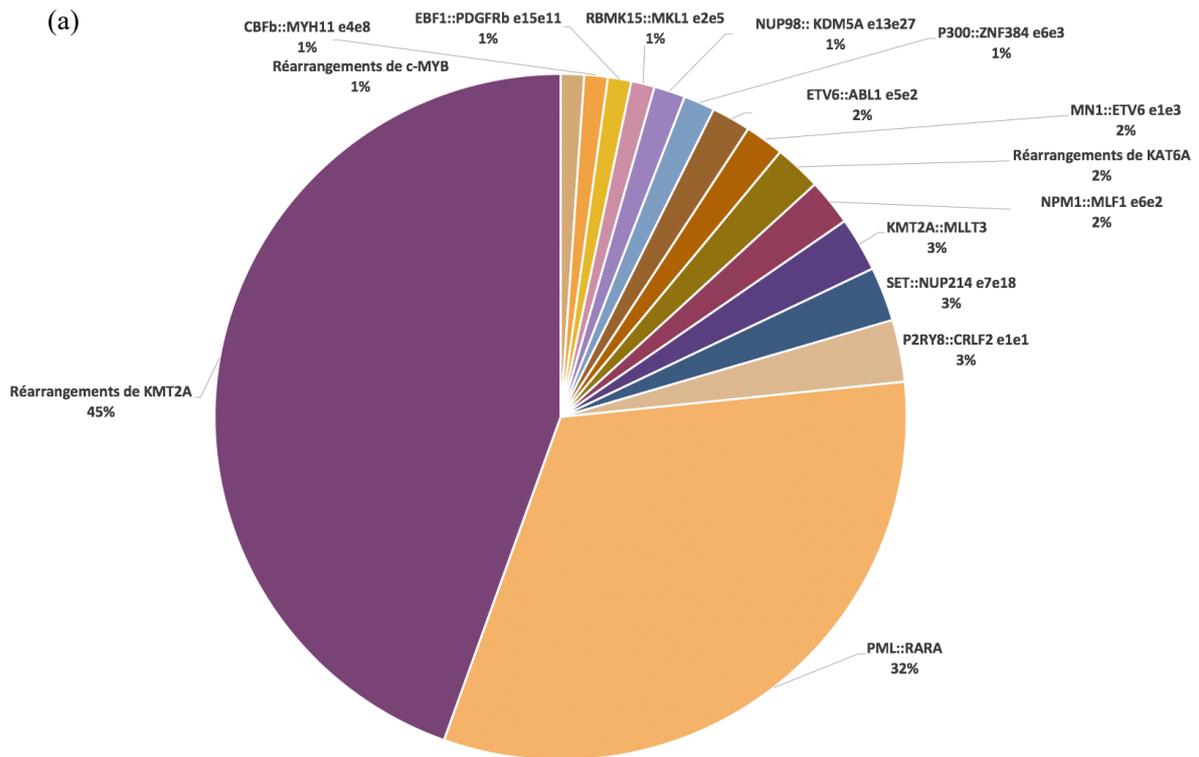
Ainsi, la ddPCR semble très prometteuse pour le suivi de la MRD chez les patients mutés *RUNX1::RUNX1T1*. Au-delà d'une meilleure sensibilité et d'une détection plus fiable des faibles valeurs, elle permet aussi d'économiser du matériel des patients et de travailler sur des ADNc moins dilués. Également, l'analyse unique permet un rendu plus rapide des résultats puisque le temps d'analyse est divisé par deux.

Au-delà du suivi de *RUNX1::RUNX1T1*, l'analyse en point final permet de s'affranchir de l'utilisation de droite de calibration. Cela étend alors considérablement l'utilisation de cette méthode pour la détection de nombreux transcrits de fusion rares dont il n'existe pas de plasmides de référence et de suivre la MRD de manière très personnalisée.

Même si à l'heure actuelle, les transcrits rares représentent moins de 1% des LAM, des nouvelles méthodes, comme la RT-MLPA et le transcriptome, permettent de mettre en évidence des nouveaux transcrits au diagnostic. Apparue au début des années 2002, la RT-MPLA (*amplification multiplex de sonde dépendant d'une ligation*) met en évidence de nombreux réarrangements de gènes de manière simple et rapide. Après rétrotranscription de l'ADN en ARN, ce dernier est incubé avec des centaines de « demi-sondes » spécifiques des séquences cibles des gènes de fusion. Grâce à l'ajout d'une ligase, les demi-amorces sont liées entre elles par une liaison covalente. Puis, une PCR est réalisée amplifiant uniquement les sondes complètes. La dernière étape consiste à séquencer par pyro-séquencage les séquences amplifiées. Ainsi, elle permet d'étudier des centaines de séquences différentes de façon simultanée et de connaître les points de cassures précis.

Puis, le séquençage des ARN sur génome entier (analyse du transcriptome) permet de mettre en évidence des transcrits de fusion rares qui n'auraient pas été détectés en RT-MLPA ou en cytogénétique (transcrits cryptiques) (109) (110). Grâce au plan France Médecine Génomique 2025, le séquençage génomique très haut débit des tumeurs est intégré au parcours de soin (projet Sequoia : Sequencing, Omics, Information Analysis) et peut être proposée pour dans tous les contextes de LA au diagnostic.

Détecter ces nouveaux transcrits est très important mais il l'est d'autant plus s'il est possible de les quantifier. La ddPCR permet de compléter le diagnostic en offrant la possibilité de quantifier la MRD de ces transcrits atypiques et rares. Depuis la mise en place de la ddPCR au CHU de Lille, plus de 430 patients ont pu être suivis sur plus de 100 transcrits de fusions rares (Figure 30-a). 35% de ces transcrits rares sont des réarrangements de *KMT2A* retrouvés chez des patients atteints de LAM ou LAL (Figure 30-b).



**Figure 30 (a) Transcrits de fusion rares quantifiés au CHU de Lille depuis 2019 (b) Rearrangements de KMT2A quantifiés au CHU de Lille depuis 2019**

Au-delà des transcrits de fusion, la ddPCR trouve également un intérêt grandissant pour la détection de formes rares de NPM1 sur ARN (plus de 174 patients suivis au CHU de Lille) (63) ou de mutations d'IDH1/2 sur ADN même si l'intérêt du suivi reste à démontrer.

Ces analyses ne sont pas restreintes LAM puisque certains transcrits de LAL sont également inclus. Habituellement, les LAL sont suivies par quantification de l'IgTCR mais les

patients peuvent présenter des changements immuno-phénotypiques ou un changement vers la lignée myéloïde sous l'influence de thérapies par anticorps dirigés contre le CD19 et par CAR-T cells rendant le suivi obsolète (111). Il a été montré que 40% d'entre elles étaient associées à un transcrits de fusion. La détection et le monitoring de KMT2A::MATR3 ont notamment été décrits par ddPCR dans un cas de LAL pédiatriques (112).

A l'heure actuelle, le suivi de ces variants rares n'est pas recommandé par l'ELN ni dans les LAM ou les LAL probablement car il existe peu d'études montrant l'intérêt de la MRD sur ces anomalies rares et la difficulté de mettre en place des qPCR pour de l'analyse de routine.

## CONCLUSIONS

La ddPCR est une méthode récente basée sur la compartimentation d'un échantillon pour la détection d'anomalies moléculaires rares. Avec une sensibilité de  $10^{-5}$ , elle est plus précise que la qPCR pour la détection des faibles valeurs. La quantification absolue permet de s'affranchir de l'extrapolation de la courbe de calibration. Cette absence de calibrant, au-delà de la diminution des coûts de l'analyse, permet surtout d'augmenter considérablement le nombre de cibles moléculaires. La méthode a pu être validée sur les LAM t(8;21)(q22;22) exprimant *RUNX1::RUNX1T1*. Par la suite, la méthode pourra être élargie à l'ensemble des transcrits de fusions rares détectés en RT-MPLA ou par l'analyse complète du transcriptome offrant aux patients la possibilité de suivre l'évolution de leur clone leucémique. Ce suivi précis et personnel permettra l'adaptation la plus précise possible du traitement à chaque patient en fonction de sa maladie et du terrain sur lequel elle survient. Cela ouvre les portes de la médecine personnalisée dans le domaine des LAM.

## RÉFÉRENCES

1. Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat Res.* févr 1961;14:213-22.
2. Passegué E, Jamieson CHM, Ailles LE, Weissman IL. Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci U S A.* 30 sept 2003;100 Suppl 1(Suppl 1):11842-9.
3. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 23 avr 2015;125(17):2605-13.
4. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* juill 1997;3(7):730-7.
5. Gilliland DG. Molecular genetics of human leukemias: new insights into therapy. *Semin Hematol.* oct 2002;39(4 Suppl 3):6-11.
6. Naoe T, Kiyoi H. Gene mutations of acute myeloid leukemia in the genome era. *Int J Hematol.* 1 févr 2013;97(2):165-74.
7. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 9 juin 2016;374(23):2209-21.
8. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: Epidemiology and etiology. *Cancer.* 2006;107(9):2099-107.
9. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.
10. Schoch C, Kern W, Schnittger S, Büchner T, Hiddemann W, Haferlach T. The influence of age on prognosis of de novo acute myeloid leukemia differs according to cytogenetic subgroups. *Haematologica.* sept 2004;89(9):1082-90.
11. McNerney ME, Godley LA, Le Beau MM. Therapy-Related Myeloid Neoplasms: When Genetics and Environment Collide. *Nat Rev Cancer.* 24 août 2017;17(9):513-27.
12. Yang D, Fu X, Zhang X, Li W, Zhang M. Therapy-related acute myeloid leukemia in patients with lymphoma: A report of four cases and review of the literature. *Oncol Lett.* nov 2015;10(5):3261-5.
13. Preston DL, Kusumi S, Tomonaga M, Izumi S, Ron E, Kuramoto A, et al. Cancer incidence in atomic bomb survivors. Part III. Leukemia, lymphoma and multiple myeloma, 1950-1987. *Radiat Res.* févr 1994;137(2 Suppl):S68-97.
14. Kossman SE, Weiss MA. Acute myelogenous leukemia after exposure to strontium-89 for the treatment of adenocarcinoma of the prostate. *Cancer.* 1 févr 2000;88(3):620-4.
15. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al.

- International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 15 sept 2022;140(11):1200-28.
16. Francois Dreyfus. Syndrome de lyse tumorale : Épidémiologie et facteurs de risque. *Réanimation*. 2005;217-20.
  17. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood*. 22 sept 2022;140(12):1345-77.
  18. Luquet I, Bidet A, Cuccuini W, Lafage-Pochitaloff M, Mozziconacci MJ, Terré C. Cytogenetics in the management of acute myeloid leukemia: an update by the Groupe francophone de cytogénétique hématologique (GFCH). *Ann Biol Clin (Paris)*. sept 2016;74(5):535-46.
  19. Mak ACY, Lai YYY, Lam ET, Kwok TP, Leung AKY, Poon A, et al. Genome-Wide Structural Variation Detection by Genome Mapping on Nanochannel Arrays. *Genetics*. janv 2016;202(1):351-62.
  20. Duployez N, Preudhomme C. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2015;2015(471):51-64.
  21. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton D a. G, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-8.
  22. Vardiman JW, Harris NL, Brunning RD. The World Health Organization (WHO) classification of the myeloid neoplasms. *Blood*. 1 oct 2002;100(7):2292-302.
  23. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*. 30 juill 2009;114(5):937-51.
  24. 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.
  25. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. juill 2022;36(7):1703-19.
  26. Young AL, Davis HC, Challen GA. Droplet Digital PCR for Oncogenic KMT2A Fusion Detection. *J Mol Diagn*. 1 déc 2023;25(12):898-906.
  27. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, Grauman PV, Shareef S, Allen SL, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 26 févr 2015;125(9):1367-76.
  28. Döhner H, Estey EH, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, Burnett AK, et al.

Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood*. 21 janv 2010;115(3):453-74.

29. Godley LA, Larson RA. Therapy-related Myeloid Leukemia. *Semin Oncol*. août 2008;35(4):418-29.

30. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med*. 17 sept 2015;373(12):1136-52.

31. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol*. 2023;98(3):502-26.

32. Campana D, Pui CH. Detection of minimal residual disease in acute leukemia: methodologic advances and clinical significance. *Blood*. 15 mars 1995;85(6):1416-34.

33. Ommen HB. Monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukaemia: a review of the current evolving strategies. *Ther Adv Hematol*. févr 2016;7(1):3-16.

34. 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.

35. Walter RB, Buckley SA, Pagel JM, Wood BL, Storer BE, Sandmaier BM, et al. Significance of minimal residual disease before myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation for AML in first and second complete remission. *Blood*. 5 sept 2013;122(10):1813-21.

36. 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.

37. Heuser M, Freeman SD, Ossenkuppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 30 déc 2021;138(26):2753-67.

38. Badaoui B, Sloma I, Tarfi S. Suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2023;2023(551):64-74.

39. Short NJ, Zhou S, Fu C, Berry DA, Walter RB, Freeman SD, et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 1 déc 2020;6(12):1890-9.

40. Lambert J, Lambert J, Thomas X, Marceau-Renaut A, Micol JB, Renneville A, et al. Early detection of WT1 measurable residual disease identifies high-risk patients, independent of transplantation in AML. *Blood Adv*. 12 déc 2021;5(23):5258.

41. Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase

- chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 15 août 1991;88(16):7276-80.
42. Van Dongen JJM, Macintyre EA, Gabert JA, Delabesse E, Rossi V, Saglio G, et al. Standardized RT-PCR analysis of fusion gene transcripts from chromosome aberrations in acute leukemia for detection of minimal residual disease. *Leukemia*. déc 1999;13(12):1901-28.
  43. Masson E. EM-Consulte. Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023.
  44. Cappelli LV, Meggendorfer M, Baer C, Nadarajah N, Hutter S, Jeromin S, et al. Indeterminate and oncogenic potential: CHIP vs CHOP mutations in AML with NPM1 alteration. *Leukemia*. févr 2022;36(2):394-402.
  45. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 août 1999;96(16):9236-41.
  46. Morley AA. Digital PCR: A brief history. *Biomol Detect Quantif*. sept 2014;1(1):1-2.
  47. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 20 avr 2018;18(4):1271.
  48. Galimberti S, Balducci S, Guerrini F, Del Re M, Cacciola R. Digital Droplet PCR in Hematologic Malignancies: A New Useful Molecular Tool. *Diagnostics*. 24 mai 2022;12(6):1305.
  49. Daniela Cilloni. Digital PCR in Myeloid Malignancies: Ready to Replace Quantitative PCR? - PMC. 2019.
  50. Fontanelli G, Baratè C, Ciabatti E, Guerrini F, Grassi S, Re MD, et al. Real-Time PCR and Droplet Digital PCR: two techniques for detection of the JAK2V617F mutation in Philadelphia-negative chronic myeloproliferative neoplasms. *Int J Lab Hematol*. 1 déc 2015;37(6):766-73.
  51. Waterhouse M, Follo M, Pfeifer D, von Bubnoff N, Duyster J, Bertz H, et al. Sensitive and accurate quantification of JAK2 V617F mutation in chronic myeloproliferative neoplasms by droplet digital PCR. *Ann Hematol*. avr 2016;95(5):739-44.
  52. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, James C, Verger E, Robin M, et al. Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. *J Mol Diagn JMD*. janv 2016;18(1):68-74.
  53. Guglielmelli P, Pietra D, Pane F, Pancrazzi A, Cazzola M, Vannucchi AM, et al. Recommendations for molecular testing in classical Ph1-neg myeloproliferative disorders—A consensus project of the Italian Society of Hematology. *Leuk Res*. 1 juill 2017;58:63-72.
  54. Wang WJ, Zheng CF, Liu Z, Tan YH, Chen XH, Zhao BL, et al. Droplet digital PCR for BCR/ABL(P210) detection of chronic myeloid leukemia: A high sensitive method of the minimal residual disease and disease progression. *Eur J Haematol*. sept 2018;101(3):291-6.

55. Goh HG, Lin M, Fukushima T, Saglio G, Kim D, Choi SY, et al. Sensitive quantitation of minimal residual disease in chronic myeloid leukemia using nanofluidic digital polymerase chain reaction assay. *Leuk Lymphoma*. mai 2011;52(5):896-904.
56. Akahoshi Y, Nakasone H, Kawamura K, Kusuda M, Kawamura S, Takeshita J, et al. Detection of T315I using digital polymerase chain reaction in allogeneic transplant recipients with Ph-positive acute lymphoblastic anemia in the dasatinib era. *Exp Hematol*. janv 2020;81:60-7.
57. Tan Y, Liu Z, Wang W, Zhu G, Guo J, Chen X, et al. Monitoring of clonal evolution of double C-KIT exon 17 mutations by Droplet Digital PCR in patients with core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. juin 2018;69:89-93.
58. Yuan D, Cui M, Yu S, Wang H, Jing R. Droplet digital PCR for quantification of PML-RAR $\alpha$  in acute promyelocytic leukemia: a comprehensive comparison with real-time PCR. *Anal Bioanal Chem*. févr 2019;411(4):895-903.
59. Alfonso V, Iaccarino L, Ottone T, Cicconi L, Lavorgna S, Divona M, et al. Early and sensitive detection of PML-A216V mutation by droplet digital PCR in ATO-resistant acute promyelocytic leukemia. *Leukemia*. juin 2019;33(6):1527-30.
60. Ferret Y, Boissel N, Helevaut N, Madic J, Nibourel O, Marceau-Renaut A, et al. Clinical relevance of IDH1/2 mutant allele burden during follow-up in acute myeloid leukemia. A study by the French ALFA group. *Haematologica*. 1 mai 2018;103(5):822-9.
61. Brambati C, Galbiati S, Xue E, Toffalori C, Crucitti L, Greco R, et al. Droplet digital polymerase chain reaction for DNMT3A and IDH1/2 mutations to improve early detection of acute myeloid leukemia relapse after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Haematologica*. avr 2016;101(4):e157.
62. Koizumi Y, Furuya D, Endo T, Asanuma K, Yanagihara N, Takahashi S. Quantification of Wilms' tumor 1 mRNA by digital polymerase chain reaction. *Int J Hematol*. févr 2018;107(2):230-4.
63. Fournier E, Heiblig M, Lespinasse C, Flandrin-Gresta P, Geay A, Miguet L, et al. Molecular heterogeneity and measurable residual disease of rare NPM1 mutations in acute myeloid leukemia: a nationwide experience from the GBMHHM study group. *Leukemia*. mai 2022;36(5):1390-400.
64. Ip BBK, Wong ATC, Law JHY, Au CH, Ma SY, Chim JCS, et al. Application of droplet digital PCR in minimal residual disease monitoring of rare fusion transcripts and mutations in haematological malignancies. *Sci Rep*. 16 mars 2024;14(1):6400.
65. Ansuinelli M, Della Starza I, Lauretti A, Elia L, Siravo V, Messina M, et al. Applicability of droplet digital polymerase chain reaction for minimal residual disease monitoring in Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukaemia. *Hematol Oncol*. déc

2021;39(5):680-6.

66. Shirai R, Osumi T, Keino D, Nakabayashi K, Uchiyama T, Sekiguchi M, et al. Minimal residual disease detection by mutation-specific droplet digital PCR for leukemia/lymphoma. *Int J Hematol.* juin 2023;117(6):910-8.

67. Drandi D, Ferrante M, Borriero M, Ferrero S. MYD88 L265P Mutation Detection by ddPCR: Recommendations for Screening and Minimal Residual Disease Monitoring : ddPCR for Highly Sensitive Detection of MYD88 L265P Mutation. *Methods Mol Biol Clifton NJ.* 2023;2621:57-72.

68. Ferrante M, Furlan D, Zibellini S, Borriero M, Candido C, Sahnane N, et al. MYD88L265P Detection in IgM Monoclonal Gammopathies: Methodological Considerations for Routine Implementation. *Diagnostics.* 26 avr 2021;11(5):779.

69. Dong L, Wang X, Wang S, Du M, Niu C, Yang J, et al. Interlaboratory assessment of droplet digital PCR for quantification of BRAF V600E mutation using a novel DNA reference material. *Talanta.* 15 janv 2020;207:120293.

70. Hoofd C, Huang SJ, Gusscott S, Lam S, Wong R, Johnston A, et al. Ultrasensitive Detection of NOTCH1 c.7544\_7545delCT Mutations in Chronic Lymphocytic Leukemia by Droplet Digital PCR Reveals High Frequency of Subclonal Mutations and Predicts Clinical Outcome in Cases with Trisomy 12. *J Mol Diagn JMD.* avr 2020;22(4):571-8.

71. Drandi D, Alcantara M, Benmaad I, Söhlbrandt A, Lhermitte L, Zaccaria G, et al. Droplet Digital PCR Quantification of Mantle Cell Lymphoma Follow-up Samples From Four Prospective Trials of the European MCL Network. *HemaSphere.* avr 2020;4(2):e347.

72. Valero-Garcia J, González-Espinosa M del C, Barrios M, Carmona-Antoñanzas G, García-Planells J, Ruiz-Lafora C, et al. Earlier relapse detection after allogeneic haematopoietic stem cell transplantation by chimerism assays: Digital PCR versus quantitative real-time PCR of insertion/deletion polymorphisms. *PLoS ONE.* 22 févr 2019;14(2):e0212708.

73. Preudhomme C. Biologie moléculaire et leucémies aiguës. *Rev Fr Lab.* 1 juin 2002;2002(344):41-6.

74. Nowell P., Hungerford D. A minute chromosome in human chronic granulocytic leukemia. *Sciences.* 1960;

75. Rowley JD. Letter: A new consistent chromosomal abnormality in chronic myelogenous leukaemia identified by quinacrine fluorescence and Giemsa staining. *Nature.* 1 juin 1973;243(5405):290-3.

76. Mugneret F, Callier P, Favre-Audry B. Anomalies chromosomiques dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Pathol Biol.* 1 août 2003;51(6):314-28.

77. Paschka P. Core binding factor acute myeloid leukemia. *Semin Oncol.* août 2008;35(4):410-7.

78. Grimwade D, Walker H, Oliver F, Wheatley K, Harrison C, Harrison G, et al. The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*. 1 oct 1998;92(7):2322-33.
79. 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.
80. Rowley JD. Identification of a translocation with quinacrine fluorescence in a patient with acute leukemia. *Ann Genet*. juin 1973;16(2):109-12.
81. Rubnitz JE, Raimondi SC, Halbert AR, Tong X, Srivastava DK, Razzouk BI, et al. Characteristics and outcome of t(8;21)-positive childhood acute myeloid leukemia: a single institution's experience. *Leukemia*. oct 2002;16(10):2072-7.
82. Al-Harbi S, Aljurf M, Mohty M, Almohareb F, Ahmed SOA. An update on the molecular pathogenesis and potential therapeutic targeting of AML with t(8;21)(q22;q22.1);RUNX1-RUNX1T1. *Blood Adv*. 14 janv 2020;4(1):229-38.
83. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud Ø. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *J Biomed Biotechnol*. 2011;2011:104631.
84. Darwish C, Farina K, Tremblay D. The core concepts of core binding factor acute myeloid leukemia: Current considerations for prognosis and treatment. *Blood Rev*. 1 nov 2023;62:101117.
85. Downing JR. The core-binding factor leukemias: lessons learned from murine models. *Curr Opin Genet Dev*. févr 2003;13(1):48-54.
86. Peterson LF, Zhang DE. The 8;21 translocation in leukemogenesis. *Oncogene*. 24 mai 2004;23(24):4255-62.
87. Miyamoto T, Nagafuji K, Akashi K, Harada M, Kyo T, Akashi T, et al. Persistence of multipotent progenitors expressing AML1/ETO transcripts in long-term remission patients with t(8;21) acute myelogenous leukemia. *Blood*. 1 juin 1996;87(11):4789-96.
88. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, Petit A, Bucci M, Geffroy S, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 19 mai 2016;127(20):2451-9.
89. Micol JB, Duployez N, Boissel N, Petit A, Geffroy S, Nibourel O, et al. Frequent ASXL2 mutations in acute myeloid leukemia patients with t(8;21)/RUNX1-RUNX1T1 chromosomal translocations. *Blood*. 28 août 2014;124(9):1445-9.
90. Pseudo-Chediak-Higashi Anomaly in Acute Myeloid Leukemia Wit... : *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*.

91. Pullarkat V, Bedell V, Kim Y, Bhatia R, Nakamura R, Forman S, et al. Neoplastic mast cells in systemic mastocytosis associated with t(8;21) acute myeloid leukemia are derived from the leukemic clone. *Leuk Res.* févr 2007;31(2):261-5.
92. Reikvam H, Hatfield KJ, Kittang AO, Hovland R, Bruserud Ø. Acute Myeloid Leukemia with the t(8;21) Translocation: Clinical Consequences and Biological Implications. *J Biomed Biotechnol.* 2011;2011:104631.
93. Bloomfield CD, Lawrence D, Byrd JC, Carroll A, Pettenati MJ, Tantravahi R, et al. Frequency of prolonged remission duration after high-dose cytarabine intensification in acute myeloid leukemia varies by cytogenetic subtype. *Cancer Res.* 15 sept 1998;58(18):4173-9.
94. Hospital MA, Prebet T, Bertoli S, Thomas X, Tavernier E, Braun T, et al. Core-binding factor acute myeloid leukemia in first relapse: a retrospective study from the French AML Intergroup. *Blood.* 21 août 2014;124(8):1312-9.
95. Shimony S, Stahl M, Stone RM. Acute myeloid leukemia: 2023 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2023;98(3):502-26.
96. Oo ZM, Illendula A, Grembecka J, Schmidt C, Zhou Y, Esain V, et al. A tool compound targeting the core binding factor Runt domain to disrupt binding to CBF $\beta$ . *Leuk Lymphoma.* sept 2018;59(9):2188-200.
97. 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.
98. Park SH, Chi HS, Min SK, Park BG, Jang S, Park CJ. Prognostic impact of c-KIT mutations in core binding factor acute myeloid leukemia. *Leuk Res.* oct 2011;35(10):1376-83.
99. Rücker FG, Agrawal M, Corbacioglu A, Weber D, Kapp-Schworer S, Gaidzik VI, et al. Measurable residual disease monitoring in acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22.1): results from the AML Study Group. *Blood.* 7 nov 2019;134(19):1608-18.
100. Gabert J, Beillard E, Van Der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of 'real-time' quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia – A Europe Against Cancer Program. *Leukemia.* 1 déc 2003;17(12):2318-57.
101. Chen X, Zong S, Yi M, Liu C, Wang B, Duan Y, et al. Minimal residual disease monitoring via AML1-ETO breakpoint tracing in childhood acute myeloid leukemia. *Transl Oncol.* août 2021;14(8):101119.
102. Wallace RB, Shaffer J, Murphy RF, Bonner J, Hirose T, Itakura K. Hybridization of synthetic oligodeoxyribonucleotides to phi chi 174 DNA: the effect of single base pair

mismatch. *Nucleic Acids Res.* 10 août 1979;6(11):3543-57.

103. COFRAC. Guide technique d'accréditation pour l'évaluation des incertitudes de mesure en biologie médicale (SH-GTA-14 Révision 00).

104. Droplet Digital PCR Applications Guide. Bulletin 6407. Bio-Rad

105. Armbruster DA, Pry T. Limit of blank, limit of detection and limit of quantitation. *Clin Biochem Rev.* août 2008;29 Suppl 1(Suppl 1):S49-52.

106. Smitalova D, Dvorakova D, Racil Z, Romzova M. Digital PCR can provide improved BCR-ABL1 detection in chronic myeloid leukemia patients in deep molecular response and sensitivity of standard quantitative methods using EAC assays. *Pract Lab Med.* 9 mars 2021;25:e00210.

107. Schwinghammer C, Koopmann J, Chitadze G, Karawajew L, Brüggemann M, Eckert C. A New View on Minimal Residual Disease Quantification in Acute Lymphoblastic Leukemia using Droplet Digital PCR. *J Mol Diagn.* 1 août 2022;24(8):856-66.

108. European Network of GMO Laboratories (ENGL). Overview and recommendations for the application of digital PCR. 2019

109. *Cancers* | Free Full-Text | Novel and Rare Fusion Transcripts Involving Transcription Factors and Tumor Suppressor Genes in Acute Myeloid Leukemia

110. Stengel A, Shahswar R, Haferlach T, Walter W, Hutter S, Meggendorfer M, et al. Whole transcriptome sequencing detects a large number of novel fusion transcripts in patients with AML and MDS. *Blood Adv.* 4 nov 2020;4(21):5393-401.

111. Saygin C, Cannova J, Stock W, Muffly L. Measurable residual disease in acute lymphoblastic leukemia: methods and clinical context in adult patients. *Haematologica.* 1 déc 2022;107(12):2783-93.

112. Komatsu K, Sakaguchi K, Shimizu D, Yamoto K, Kato F, Miyairi I, et al. Characterization of KMT2A::MATR3 fusion in a patient with acute lymphoblastic leukemia and monitoring of minimal residual disease by nanoplate digital PCR. *Pediatr Blood Cancer.* 2023;70(4):e30120.

## ANNEXES

### **Annexe 1 : Classification historique de l'OMS**

2001

2008

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities  
 Acute myeloid leukemia with t(8;21)(q22;q22), (*AML1/ETO*)  
 Acute myeloid leukemia with abnormal bone marrow eosinophils and inv(16)(p13q22) or t(16;16)(p13;q22), (*CBFB/MYH11*)  
 Acute promyelocytic leukemia with t(15;17)(q22;q12), (*PML/RAR $\alpha$* ) and variants  
 Acute myeloid leukemia with 11q23 (*MLL*) abnormalities

Acute myeloid leukemia with multilineage dysplasia  
 Following MDS or MDS/MPD  
 Without antecedent MDS or MDS/MPD, but with dysplasia in at least 50% of cells in 2 or more myeloid lineages

Acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes, therapy related  
 Alkylating agent/radiation-related type  
 Topoisomerase II inhibitor-related type (some may be lymphoid)  
 Others

Acute myeloid leukemia, not otherwise categorized  
 Classify as:  
 Acute myeloid leukemia, minimally differentiated  
 Acute myeloid leukemia without maturation  
 Acute myeloid leukemia with maturation  
 Acute myelomonocytic leukemia  
 Acute monoblastic/acute monocytic leukemia  
 Acute erythroid leukemia (erythroid/myeloid and pure erythroleukemia)  
 Acute megakaryoblastic leukemia  
 Acute basophilic leukemia  
 Acute panmyelosis with myelofibrosis  
 Myeloid sarcoma

#### Acute myeloid leukemia and related neoplasms

Acute myeloid leukemia with recurrent genetic abnormalities  
 AML with t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*  
 AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*  
 APL with t(15;17)(q22;q12); *PML-RARA*  
 AML with t(9;11)(p22;q23); *MLLT3-MLL*  
 AML with t(6;9)(p23;q34); *DEK-NUP214*  
 AML with inv(3)(q21q26.2) or t(3;3)(q21;q26.2); *RPN1-EVI1*  
 AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13;q13); *RBM15-MKL1*  
 Provisional entity: *AML with mutated NPM1*  
 Provisional entity: *AML with mutated CEBPA*

Acute myeloid leukemia with myelodysplasia-related changes  
 Therapy-related myeloid neoplasms  
 Acute myeloid leukemia, not otherwise specified  
 AML with minimal differentiation  
 AML without maturation  
 AML with maturation  
 Acute myelomonocytic leukemia  
 Acute monoblastic/monocytic leukemia  
 Acute erythroid leukemia  
 Pure erythroid leukemia  
 Erythroleukemia, erythroid/myeloid  
 Acute megakaryoblastic leukemia  
 Acute basophilic leukemia  
 Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma  
 Myeloid proliferations related to Down syndrome  
 Transient abnormal myelopoiesis  
 Myeloid leukemia associated with Down syndrome  
 Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm

2016

#### Acute myeloid leukemia (AML) and related neoplasms

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

AML with myelodysplasia-related changes  
 Therapy-related myeloid neoplasms  
 AML, NOS  
 AML with minimal differentiation  
 AML without maturation  
 AML with maturation  
 Acute myelomonocytic leukemia  
 Acute monoblastic/monocytic leukemia  
 Pure erythroid leukemia  
 Acute megakaryoblastic leukemia  
 Acute basophilic leukemia  
 Acute panmyelosis with myelofibrosis

Myeloid sarcoma  
 Myeloid proliferations related to Down syndrome  
 Transient abnormal myelopoiesis (TAM)  
 Myeloid leukemia associated with Down syndrome

## Annexe 2 : Données brutes de l'analyse en simplex vs duplex en qPCR et en ddPCR

ddPCR				
Passage	Droplet	Copies <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)

<b>RUNX1::RUNX1T1 + ABL</b>	18368	10980	20000	55.65
	18205	11600	20560	
<b>RUNX1::RUNX1T1</b>	19310	6200	0	57.7
	21632	6480	0	
<b>ABL</b>	20628	0	11300	
	20438	0	10660	

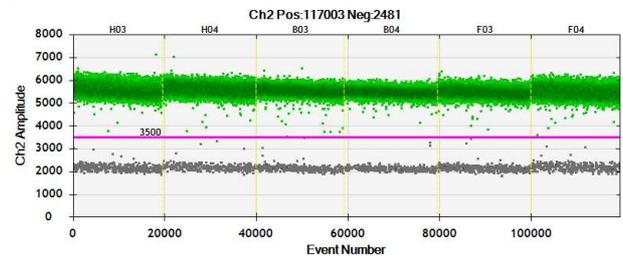
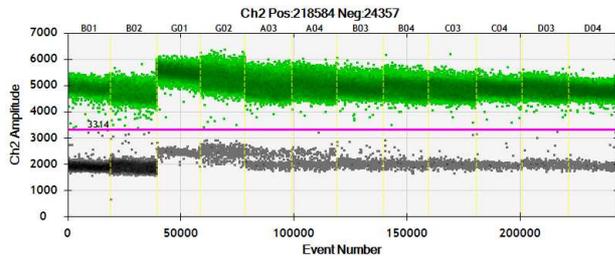
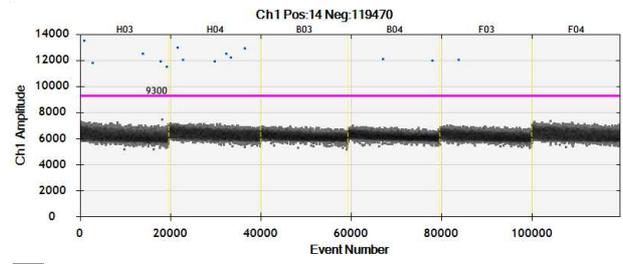
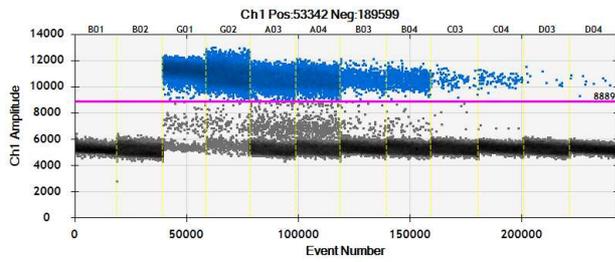
qPCR			
Passage	Copies <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
<b>RUNX1::RUNX1T1 + ABL</b>	29932	76319	39,1
<b>RUNX1::RUNX1T1</b>	46675	0	70,2
<b>ABL</b>	0	66468	

### **Annexe 3 : Limite de blanc : données brutes**

Passage	Droplet	Copies <i>RUNX1 ::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio
1	20059	0	139674	0
2	20125	0	138455	0
3	20649	0	133147	0
4	20735	0	124820	0
5	19727	0	109364	0
6	19541	0	128504	0
7	20826	0	85083	0
8	21450	0	81148	0
9	20897	0	101305	0
10	21465	0	102272	0

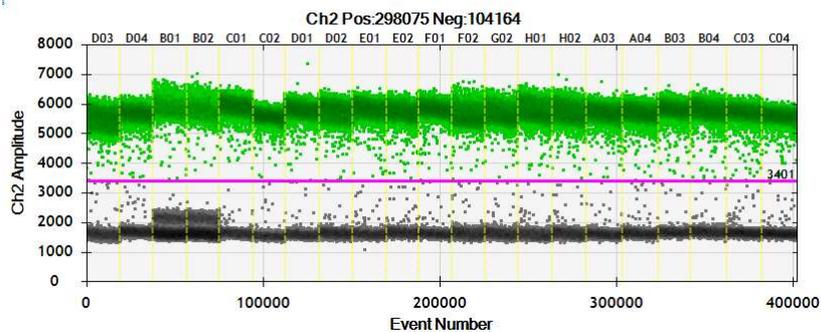
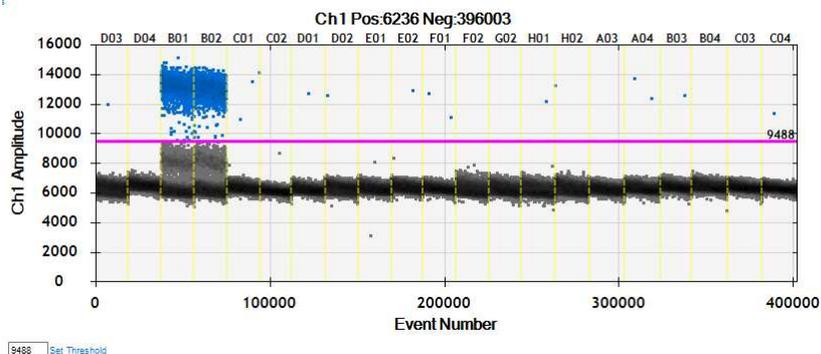
### **Annexe 4 : Limite de linéarité : données brutes et graphes**

Passage	Droplet	Copies <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
110%	19402	91215,98	99474,93	95,985
	19539	86295,56	86060,98	
11%	20630	9487,95	89745,98	10,506
	19931	9523,24	91213,74	
1.1%	20652	1010,32	91598,45	1,06
	19950	960,52	94467,77	
0.11%	21032	104,27	91096,03	0,11
	20438	109,62	103058,21	
0.011%	20619	12,56	92882,73	0.013
	21083	11,16	96565,16	
0.0054%	19751	5,96	90604,81	0.0065
	20283	6,96	97191,55	
0.0022%	19359	0	89799,37	0.0024
	20314	2,32	94185,02	
0.0011%	20022	1,18	100132,07	0.0012
	20398	1,15	86933,67	



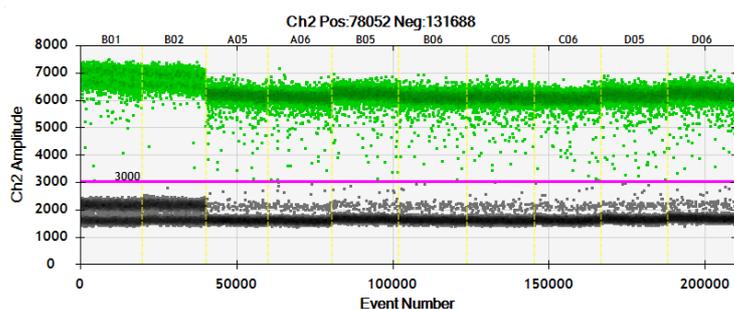
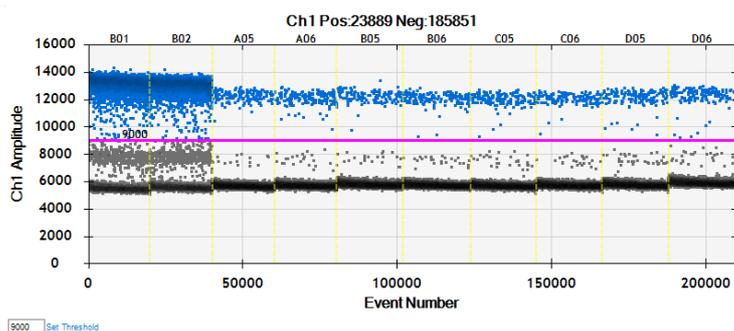
### Annexe 5 : Limite de détection : données brutes et graphes

Passage	Droplet	Copies RUNX1::RUNX1T	Copies ABL	Copies RUNX1::RUNX1T1	Copies ABL	Ratio (10 <sup>-5</sup> )
1	19086	3.6	40780	3.6	87240	4.1
	18489	0	46460			
2	19203	1.2	41220	2.4	77060	3.1
	18992	1.2	35840			
3	19070	0	38860	1.4	75800	1.6
	18086	1.4	36940			
4	18860	2.4	37820	2.4	74120	3.2
	18599	0	36300			
5	18735	1.2	37980	1.2	74340	1.6
	18862	0	36360			
6	19489	1.2	39160	2.4	75000	3.2
	19087	1.2	35840			
7	20663	0	37660	2.4	73560	3.2
	20144	2.4	35900			
8	18303	1.2	36580	1.2	71880	1,7
	20297	0	35300			
9	19959	0	30500	1.2	59760	2,1
	19813	1.2	29260			
	19635	0	31840			



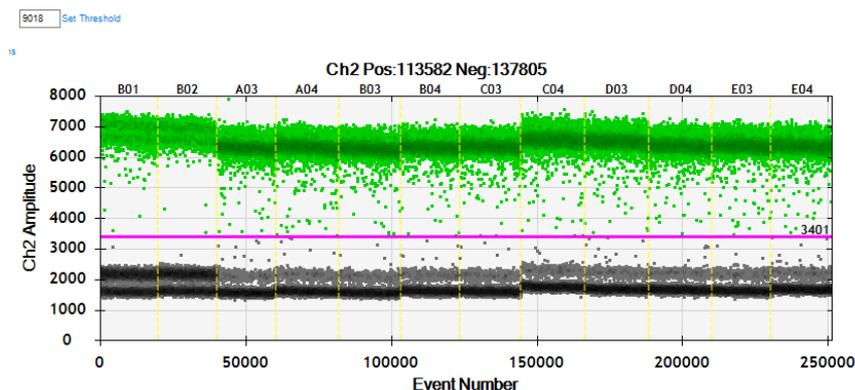
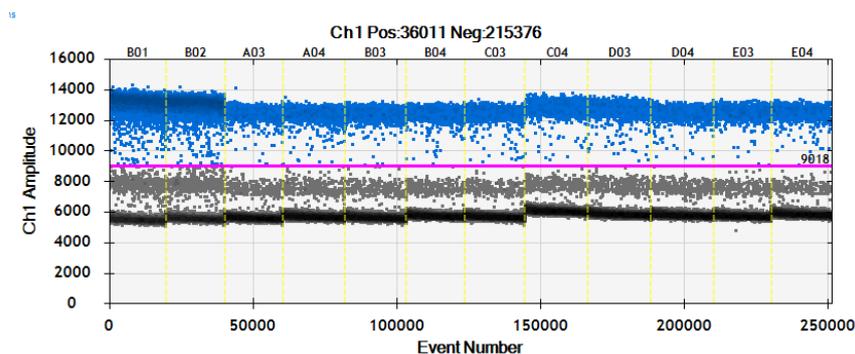
### Annexe 6-a: Répétabilité à 1% : données brutes et graphes

Passage	Droplet	Copies <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio
1	19972	180	12720	1.41
2	20288	194	13320	1.45
3	21460	158	13140	1.20
4	21858	184	12820	1.43
5	21431	186	12940	1.43
6	21321	162	12480	1.30
7	21398	156	12700	1.23
8	21586	182	12900	1.42
9	21722	144	12460	1.15
10	21085	170	12380	1.37



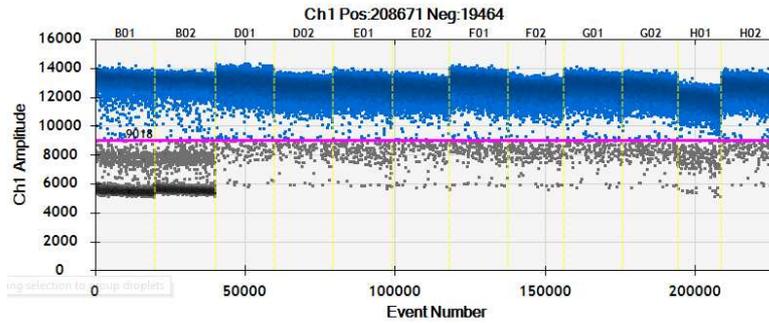
### Annexe 6-b : Répétabilité à 10% - données brutes et graphes

Passage	Droplet	Copies <i>RUNXI::RUNXIT1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
1	20095	1532	17260	8,900
2	21563	1648	17300	9,500
3	21283	1680	17760	9,400
4	20416	1554	16940	9,200
5	21027	1456	16160	9,000
6	21897	1594	17020	9,400
7	22006	1470	16400	9,000
8	21610	1466	15620	9,400
9	20218	1544	16760	9,200
10	20846	1470	15200	9,700

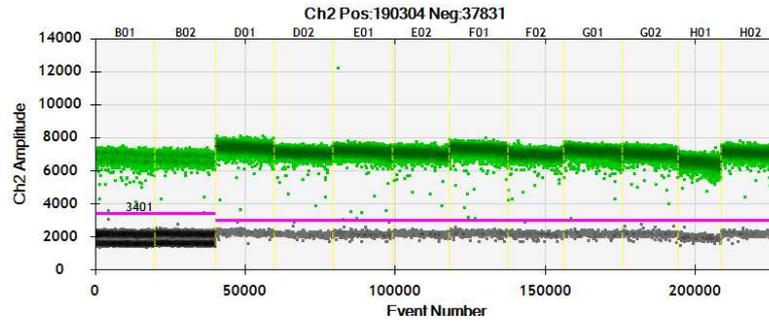


### Annexe 6-c : Répétabilité à 100% - données brutes et graphes

Passage	Droplet	Copies <i>RUNXI ::RUNXIT1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
1	19406	119200	94200	127
2	19707	118800	96400	123
3	19760	109200	86400	126,4
4	19124	115800	93200	124
5	19369	110000	89400	122,9
6	18522	108200	87000	124,4
7	19685	113000	90400	125
8	18723	109400	90200	121,2
9	14102	98200	82400	119,2
10	19311	111400	91200	122,3



9018 Set Threshold



**Annexe 7-a : Fidélité intermédiaire à 1% - données brutes**

Passage	Droplet	Copies <i>RUNX1::RUNX1T1</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
1	20733	133,12	12043	1.114
	20908	120,32	10240	
2	18438	118,98	12376	1.012
	19360	127,96	12233	
3	19350	128,03	12092	1,063
	19400	132,57	12427	
4	18471	146,95	12197	1,034
	18976	104,39	12101	
5	19955	119,39	11765	1,075
	20833	143,88	12671	
6	18401	120,51	12699	0,999
	18472	136,69	13028	
7	21603	155,17	14032	1,171
	21313	175,08	14167	
8	19404	148,40	12646	1,084
	19175	125,50	12611	
9	18471	146,95	12197	1,034
	18976	104,39	12101	

**Annexe 7-b : Fidélité intermédiaire à 10 % - données brutes**

Passage	Droplet	Copies <i>RUNXI::RUNXITI</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
1	20841	1072	8960	12,10
	21050	1116	9060	
2	19259	1293	11361	11,524
	19696	1277	10952	
3	19049	1321	11252	11,667
	18572	1243	10723	
4	18690	1236	10584	12,310
	18903	1340	10364	
5	19145	1288	10635	11,950
	20082	1220	10353	
6	18500	1275	10718	11,926
	19640	1169	9779	
7	21473	1290	10739	12,193
	21646	1308	10579	
8	19307	1212	10157	11,975
	18911	1143	9520	
9	19391	1208	9808	12,130
	19055	1160	9723	
10	18690	1236	10584	12,31
	18903	1340	10364	

**Annexe 7-c : Fidélité intermédiaire à 100% - données brutes**

Passage	Droplet	Copies <i>RUNXI::RUNXITI</i>	Copies <i>ABL</i>	Ratio (%)
1	20269	37160	27080	137,8
	20222	41860	30560	
2	18460	36435	26652	138,478
	18764	38484	27439	
3	19134	35724	26383	134,558
	19681	37912	28353	
4	18391	36954	26922	137,402
	18160	38539	28019	
5	19120	38160	28165	136,566
	18708	38497	27968	
6	18384	37361	27718	134,648
	17727	37516	27890	
7	20749	31625	23737	135,638
	29589	33198	24048	
8	19205	43904	32826	133,618
	18281	39870	29868	
9	18391	36954,46	26922,91	137,402
	18160	38539,38	28019,85	

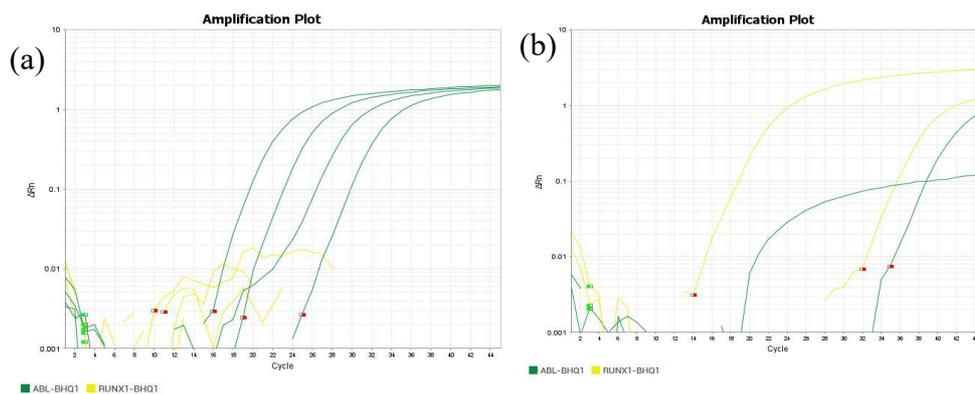
### Annexe 8 : Comparaison aux EEQ

EEQ23		
	qPCR (%)	ddPCR (%)
EEQ-A	8,64	9,964
EEQ-B	42,2	52,397
EEQ-C	1,04	1,012
EEQ-D	0	0
EEQ24		
EEQ-A	3,47	3,609
EEQ-B	29,95	33,441
EEQ-C	0	0
EEQ-D	0,585	0,732

### Annexe 9 : Comparaison des patients en qPCR et ddPCR

qPCR (%)	ddPCR (%)
467	458,210
1,58	1,040
0,224	0,149
0,194	0,144
14,4	12,316
4,45	3,267
162	116,920
0	0
0,012	0,011
0	0,000
0	0,000
361	329,779
0,518	0,466
0	0
0	0
0	0
0	0,008
0	0,010
1,289	1,054
0,049	0,040
0,012	0,010
1,013	1,020
68,509	56,900
154,855	137,700
0,0080	0,004
0,0040	0,010
0,0090	0,004
0,0040	0,007
0,0030	0,003
0,0110	0,003
3,34	2,64
0	0
0	0,005
0,635	0,447
0,61	0,439
0,425	0,272
0	0,0012
62,35	47,439

**Annexe 10 (a) Plasmide *RUNX1::RUNX1T1* avec la sonde ABL (b) Plasmide ABL avec la sonde *RUNX1::RUNX1T1***



- (a) Plasmides ABL incubés avec les amorces et les sonde de *RUNX1::RUNX1T1* et d'ABL. Absence de fixation des sondes *RUNX1::RUNX1T1* sur les plasmides ABL
- (b) Plasmides de *RUNX1::RUNX1T1* ABL incubés avec les amorces et les sonde de *RUNX1::RUNX1T1* et d'ABL. En vers fixation non spécifique des sondes de d'ABL sur les plasmides de *RUNX1::RUNX1T1*

Université de  
LilleUFR3S-  
Pharmacie  
**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN  
PHARMACIE**  
Année Universitaire 2023/2024

**Nom :** DANTEC  
**Prénom :** Mélinda

**Titre de la thèse :** Étude de la maladie résiduelle dans les Leucémies Aigües Myéloïdes avec transcrite de fusion par PCR digitale : validation de la méthode sur les LAM t(8;21) et utilisation clinique

**Mots-clés :** LAM, transcrite de fusion, MRD, PCR digitale, quantification absolue, t(8;21)

---

**Résumé :** Les leucémies myéloïdes aiguës représentent un défi important dans le domaine de la biologie médicale, tant pour le diagnostic que pour leur suivi. Les récentes avancées diagnostiques ont élargi le nombre de marqueurs leucémiques potentiellement mesurables pour le suivi de la maladie résiduelle minimale (MRD). Parmi ces marqueurs, les transcrits de fusion ont été reconnus comme de bons marqueurs pour la MRD par le European Leukemia Network, mais seuls les plus fréquents peuvent être mesurés par qPCR. Cette méthode nécessite des plasmides de calibration disponibles dans le commerce et n'est donc pas applicable aux transcrits rares. L'objectif de cette étude était de mettre en place et valider l'utilisation de la PCR digitale pour le suivi personnalisé des LAM avec transcrits de fusion, quelle que soit leur fréquence. Initialement, la méthode a été validée sur *RUNX1::RUNX1T1* exprimé dans les LAM t(8;21)(q22;q22). Au-delà d'une sensibilité accrue de  $10^{-5}$ , la ddPCR s'est révélée très précise pour détecter des nombres de copies très faibles, ainsi que rapide, reproductible et répétable. Les résultats obtenus avec la ddPCR ont montré une très bonne corrélation avec ceux de la qPCR sur *RUNX1::RUNX1T1*. La validation de la méthode peut ainsi être étendue aux transcrits rares dont le nombre ne cesse d'augmenter grâce à l'amélioration des techniques diagnostiques de RT-MLPA et RNAséq et ceux dans les LAM et les LAL permettant un suivi personnalisé de leur MRD. Également, cette technique permettra de fournir des outils pour l'étude des profils pronostiques des LAM exprimant des transcrits de fusions atypiques selon la MRD.

---

**Membres du jury :**

**Président :** Madame le Professeur Stéphanie Poulain (PU/PH)

**Assesseur(s) :**

Monsieur le Docteur Nicolas Duployez (MCU/PH)

Madame le Docteur Céline Berthon (PH)

**Directeur de thèse :** Madame le Docteur Élise Fournier (PH)