



HAL
open science

Analyse moléculaire par une technique innovante de plus de cinquante translocations récurrentes dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte. Étude rétrospective de deux cent vingt-trois cas pris en charge au Centre Henri Becquerel de Rouen entre 2008 et 2013

Thomas Larson

► **To cite this version:**

Thomas Larson. Analyse moléculaire par une technique innovante de plus de cinquante translocations récurrentes dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte. Étude rétrospective de deux cent vingt-trois cas pris en charge au Centre Henri Becquerel de Rouen entre 2008 et 2013. Sciences pharmaceutiques. 2014. dumas-01073834

HAL Id: dumas-01073834

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01073834>

Submitted on 10 Oct 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITE DE ROUEN
UFR DE MEDECINE ET DE PHARMACIE

Année 2014

N°

THESE

pour le DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE

Présentée et soutenue publiquement le 11 Septembre 2014

Par

Thomas LARSON

Né le 2 novembre 1981 à Rouen

Analyse moléculaire par une technique innovante de plus de cinquante translocations récurrentes dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte.

Etude rétrospective de deux cent vingt-trois cas pris en charge au Centre Henri Becquerel de Rouen entre 2008 et 2013.

Président du jury : *Mme DUBUS Isabelle, PU*

Membres du jury : *Mr BASTARD Christian, PH*

Mr JARDIN Fabrice, PU-PH

Mr BUCHONNET Gérard, MCU-PH

Je tiens à adresser mes remerciements les plus sincères à toutes les personnes qui m'ont formé, soutenu et accompagné pendant ces quatre années d'internat.

A Mr Christian Bastard, pour avoir accepté de diriger cette thèse, pour l'accueil dans votre laboratoire et votre soutien pour mon futur poste.

A Mme Isabelle Dubus, pour avoir accepté de présider cette thèse et pour ta clairvoyance à l'examen blanc du concours de l'internat 2010.

A Mr Fabrice Jardin, pour avoir accepté de juger ce travail et pour ton accueil dans l'U918.

A Mr Gérard Buchonnet, pour avoir accepté de juger ce travail et pour la qualité de tes cours de DES.

A Mr Serge Jacquot, pour m'avoir initié à la recherche et pour votre soutien pour mon futur poste.

A Mr Bernard Lenormand, pour votre soutien pour mon futur poste.

A Mme Marie-Paule Callat, pour ton soutien pour mon futur poste.

A Mr Loïc Favennec, pour m'avoir soutenu auprès de l'autorité quand j'en ai eu besoin.

A Mme Dominique Penther, pour la formation en cytogénétique.

A Mr Olivier Boyer et l'UMR905, pour m'avoir donné le goût des réunions recherche.

A Philippe Ruminy et Vinciane Marchand, pour votre aide dans ce travail (entre autres).

A Sylvain Mareschal, pour m'avoir donné le goût de la bioinformatique.

A Pascaline Etancelin, pour m'avoir laissé l'autonomie suffisante pour réaliser mes projets.

A Valéry Brunel, pour l'article.

A Jérémie Martinet et Thomas Mourez, pour les infos et les conseils.

A mes co-internes, Jovani, Rayan, Dorian, Jawad, Yoann, France... bonne chance pour la suite.

A Abdel, Anca, Marion, Sydney, Pierre-Julien, Philippe, bonne chance pour la suite à vous aussi.

Aux techniciens, ingénieurs et ASH de l'IBC et de Génétique du CHB pour la formation, l'aide et la compagnie lors des nuits de garde.

A mes parents, pour m'avoir toujours soutenu sans me demander de résultat.

A Camille, Marie, Lulu, Anicet et Francine, pour votre soutien.

A Julien, je sais que tu veilles sur moi.

Et enfin, à Jeanne, je ne serais pas là sans toi. Merci pour tout. Le meilleur reste à venir ;-)

« L'Université de Rouen et l'UFR de Médecine et de Pharmacie de Rouen n'entendent donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans cette thèse. Ces opinions sont propres à leurs auteurs. »

ANNEE UNIVERSITAIRE 2013 - 2014
U.F.R. DE MEDECINE ET DE-PHARMACIE DE ROUEN

DOYEN : **Professeur Pierre FREGER**

ASSESEURS : **Professeur Michel GUERBET**
 Professeur Benoit VEBER
 Professeur Pascal JOLY

DOYENS HONORAIRES : **Professeurs J. BORDE - Ph. LAURET - H. PIGUET - C. THUILLEZ**

PROFESSEURS HONORAIRES : **M-P. AUGUSTIN – J. ANDRIEU-GUITRANCOURT – M. BENOZIO – J. BORDE – P. BRASSEUR – R. COLIN – E. COMOY – J. DALION – DESHAYES – C. FESSARD – J-P. FILLASTRE - P FRIGOT – J. GARNIER – J. HEMET – B. HILLEMAND – G. HUMBERT – J-M. JOUANY – R. LAUMONIER – P. LAURET – M. LE FUR – J-P. LEMERCIER – J-P. LEMOINE – H. MAGARD – B. MAITROT – M. MAISONNET – F. MATRAY – P. MITROFANOFF – A-M. ORECCHIONI – P. PASQUIS – H. PIGUET – M. SAMSON – D. SAMSON-DOLLFUS – J-C. SCHRUB – R. SOYER – B. TARDIF-J. TESTART – J-M. THOMINE – C. THUILLEZ – P. TRON – C. WINCKLER – L-M. WOLF**

I - MEDECINE

PROFESSEURS

Mr Frédéric ANSELME	HCN	Cardiologie
Mme Isabelle AUQUIT AUCKBUR	HCN	Chirurgie plastique
Mr Bruno BACHY (<i>sumombre</i>)	HCN	Chirurgie pédiatrique
Mr Fabrice BAUER	HCN	Cardiologie
Mme Soumeya BEKRI	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Jacques BENICHOU	HCN	Biostatistiques et informatique médicale
Mr Jean-Paul BESSOU	HCN	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire
Mme Françoise BEURET-BLANQUART (<i>sumombre</i>)	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Guy BONMARCHAND	HCN	Réanimation médicale
Mr Olivier BOYER	UFR	Immunologie
Mr Jean-François CAILLARD (<i>sumombre</i>)	HCN	Médecine et santé au travail
Mr François CARON	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Philippe CHASSAGNE	HB	Médecine interne (gériatrie)

Mr Vincent COMPERE	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mr Antoine CUVELIER	HB	Pneumologie
Mr Pierre CZERNICHOW	HCH	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Nicolas DACHER	HCN	Radiologie et imagerie médicale
Mr Stéfan DARMONI	HCN	Informatique médicale et techniques de communication
Mr Pierre DECHELOTTE	HCN	Nutrition
Mme Danièle DEHESDIN (<i>surnombre</i>)	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Jean DOUCET	HB	Thérapeutique - Médecine interne et gériatrie
Mr Bernard DUBRAY	CB	Radiothérapie
Mr Philippe DUCCROTTE	HCN	Hépatogastro-entérologie
Mr Frank DUJARDIN	HCN	Chirurgie orthopédique - Traumatologique
Mr Fabrice DUPARC	HCN	Anatomie - Chirurgie orthopédique et traumatologique
Mr Bertrand DUREUIL	HCN	Anesthésiologie et réanimation chirurgicale
Mme Hélène ELTCHANINOFF	HCN	Cardiologie
Mr Thierry FREBOURG	UFR	Génétique
Mr Pierre FREGER	HCN	Anatomie - Neurochirurgie
Mr Jean François GEHANNO	HCN	Médecine et santé au travail
Mr Emmanuel GERARDIN	HCN	Imagerie médicale
Mme Priscille GERARDIN	HCN	Pédopsychiatrie
Mr Michel GODIN	HB	Néphrologie
M. Guillaume GOURCEROL	HCN	Physiologie
Mr Philippe GRISE	HCN	Urologie
Mr Didier HANNEQUIN	HCN	Neurologie
Mr Fabrice JARDIN	CB	Hématologie
Mr Luc-Marie JOLY	HCN	Médecine d'urgence
Mr Pascal JOLY	HCN	Dermato - Vénérologie
Mr Jean-Marc KUHN	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mme Annie LAQUERRIERE	HCN	Anatomie et cytologie pathologiques
Mr Vincent LAUDENBACH	HCN	Anesthésie et réanimation chirurgicale
Mr Joël LECHEVALLIER	HCN	Chirurgie infantile
Mr Hervé LEFEBVRE	HB	Endocrinologie et maladies métaboliques
Mr Thierry LEQUERRE	HB	Rhumatologie
Mr Eric LEREBOURS	HCN	Nutrition
Mme Anne-Marie LEROI	HCN	Physiologie
Mr Hervé LEVESQUE	HB	Médecine interne
Mme Agnès LIARD-ZMUDA	HCN	Chirurgie Infantile

Mr Pierre Yves LITZLER	HCN	Chirurgie cardiaque
Mr Bertrand MACE	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
M. David MALTETE	HCN	Neurologie
Mr Christophe MARGUET	HCN	Pédiatrie
Mme Isabelle MARIE	HB	Médecine interne
Mr Jean-Paul MARIE	HCN	Oto-rhino-laryngologie
Mr Loïc MARPEAU	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Stéphane MARRET	HCN	Pédiatrie
Mme Véronique MERLE	HCN	Epidémiologie
Mr Pierre MICHEL	HCN	Hépto-gastro-entérologie
Mr Francis MICHOT	HCN	Chirurgie digestive
Mr Bruno MIHOUT (<i>urnombre</i>)	HCN	Neurologie
Mr Jean-François MUIR	HB	Pneumologie
Mr Marc MURAINÉ	HCN	Ophthalmologie
Mr Philippe MUSETTE	HCN	Dermatologie - Vénérologie
Mr Christophe PEILLON	HCN	Chirurgie générale
Mr Jean-Marc PERON	HCN	Stomatologie et chirurgie maxillo-faciale
Mr Christian PFISTER	HCN	Urologie
Mr Jean-Christophe PLANTIER	HCN	Bactériologie - Virologie
Mr Didier PLISSONNIER	HCN	Chirurgie vasculaire
Mr Bernard PROUST	HCN	Médecine légale
Mr François PROUST	HCN	Neurochirurgie
Mme Nathalie RIVES	HCN	Biologie du développement et de la reproduction
Mr Jean-Christophe RICHARD (<i>mise en dispo</i>)	HCN	Réanimation médicale - Médecine d'urgence
Mr Horace ROMAN	HCN	Gynécologie - Obstétrique
Mr Jean-Christophe SABOURIN	HCN	Anatomie - Pathologie
Mr Guillaume SAVOYE	HCN	Hépto-gastrologie
Mme Céline SAVOYE-COLLET	HCN	Imagerie médicale
Mme. Pascale SCHNEIDER	HCN	Pédiatrie
Mr Michel SCOTTE	HCN	Chirurgie digestive
Mme Fabienne TAMION	HCN	Thérapeutique
Mme Florence THIBAUT	HCN	Psychiatrie d'adultes
Mr Luc THIBERVILLE	HCN	Pneumologie
Mr Christian THUILLEZ	HB	Pharmacologie
Mr Hervé TILLY	CB	Hématologie et transfusion
Mr François TRON (<i>urnombre</i>)	UFR	Immunologie

Mr Jean-Jacques TUECH	HCN	Chirurgie digestive
Mr Jean-Pierre VANNIER	HCN	Pédiatrie génétique
Mr Benoît VEBER	HCN	Anesthésiologie - Réanimation chirurgicale
Mr Pierre VERA	CB	Biophysique et traitement de l'image
Mr Eric VERIN	CRMPR	Médecine physique et de réadaptation
Mr Eric VERSPYCK	HCN	Gynécologie obstétrique
Mr Olivier VITTECOQ	HB	Rhumatologie
Mr Jacques WEBER	HCN	Physiologie

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Noëlle BARBIER-FREBOURG	HCN	Bactériologie – Virologie
Mr Jeremy BELLIEN	HCN	Pharmacologie
Mme Carole BRASSE LAGNEL	HCN	Biochimie
Mr Gérard BUCHONNET	HCN	Hématologie
Mme Mireille CASTANET	HCN	Pédiatrie
Mme Nathalie CHASTAN	HCN	Physiologie
Mme Sophie CLAEYSSENS	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Moïse COEFFIER	HCN	Nutrition
Mr Stéphanie DERREY	HCN	Neurochirurgie
Mr Eric DURAND	HCN	Cardiologie
Mr Manuel ETIENNE	HCN	Maladies infectieuses et tropicales
Mr Serge JACQUOT	UFR	Immunologie
Mr Joël LADNER	HCN	Epidémiologie, économie de la santé
Mr Jean-Baptiste LATOUCHE	UFR	Biologie cellulaire
Mr Thomas MOUREZ	HCN	Bactériologie
Mr Jean-François MENARD	HCN	Biophysique
Mme Muriel QUILLARD	HCN	Biochimie et biologie moléculaire
Mr Vincent RICHARD	UFR	Pharmacologie
Mr Francis ROUSSEL	HCN	Histologie, embryologie, cytogénétique
Mme Pascale SAUGIER-VEBER	HCN	Génétique
Mme Anne-Claire TOBENAS-DUJARDIN	HCN	Anatomie
M. Pierre-Hugues VIVIER	HCN	Imagerie Médicale

PROFESSEUR AGREGE OU CERTIFIE

Mme Dominique LANIEZ	UFR	Anglais
Mme Cristina BADULESCU	UFR	Communication

II - PHARMACIE

PROFESSEURS

Mr Thierry BESSON	Chimie Thérapeutique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacologie
Mr Roland CAPRON (PU-PH)	Biophysique
Mr Jean COSTENTIN (Professeur émérite)	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC (PU-PH)	Parasitologie
Mr Jean Pierre GOULLE	Toxicologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX	Physiologie
Mr Paul MULDER	Sciences du médicament
Mme Martine PESTEL-CARON (PU-PH)	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Rémi VARIN (PU-PH)	Pharmacie clinique
Mr Jean-Marie VAUGEUIS	Pharmacologie
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

MAITRES DE CONFERENCES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et Minérale
Mme Dominique BOUCHER	Pharmacologie
Mr Frédéric BOUNOURE	Pharmacie Galénique
Mr Abdeslam CHAGRAOUI	Physiologie
Mr Jean CHASTANG	Biomathématiques
Mme Marie Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation pharmaceutique et économie de la santé
Mme Elizabeth CHOSSON	Botanique
Mme Cécile CORBIERE	Biochimie
Mr Eric DITTMAR	Biophysique
Mme Nathalie DOURMAP	Pharmacologie
Mme Isabelle DUBUC	Pharmacologie
Mr Abdelhakim ELOMRI	Pharmacognosie
Mr François ESTOUR	Chimie Organique

Mr Gilles GARGALA (MCU-PH)	Parasitologie
Mme Najla GHARBI	Chimie analytique
Mme Marie-Laure GROULT	Botanique
Mr Hervé HUE	Biophysique et mathématiques
Mme Laetitia LE GOFF	Parasitologie - Immunologie
Mme Hong LU	Biologie
Mme Sabine MENAGER	Chimie organique
Mme Christelle MONTEIL	Toxicologie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Malika SKIBA	Pharmacie galénique
Mme Christine THARASSE	Chimie thérapeutique
Mr Frédéric ZIEGLER	Biochimie

PROFESSEURS ASSOCIES

Mme Cécile GUERARD-DETUNCQ	Pharmacie officinale
Mr Jean-François HOUIVET	Pharmacie officinale

PROFESSEURS CONTRACTUELS

Mme Elizabeth DE PAOLIS	Anglais
Mr Thierry WABLE	Communication

ASSISTANT HOSPITALO-UNIVERSITAIRE

Mr Jérémie MARTINET	Immunologie
----------------------------	-------------

ATTACHES TEMPORAIRES D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHE

Mme Imane EL MEOUCHE	Microbiologie
Mme Juliette GAUTIER	Pharmacie galénique
Mr Romy RAZAKANDRAINIBE	Parasitologie

LISTE DES RESPONSABLES DES DISCIPLINES PHARMACEUTIQUES

Mme Cécile BARBOT	Chimie Générale et minérale
Mr Thierry BESSON	Chimie thérapeutique
Mr Roland CAPRON	Biophysique
Mr Jean CHASTANG	Mathématiques
Mme Marie-Catherine CONCE-CHEMTOB	Législation et économie de la santé
Mme Elisabeth CHOSSON	Botanique
Mr Jean-Jacques BONNET	Pharmacodynamie
Mme Isabelle DUBUS	Biochimie
Mr Loïc FAVENNEC	Parasitologie
Mr Michel GUERBET	Toxicologie
Mr Olivier LAFONT	Chimie organique
Mme Isabelle LEROUX-NICOLLET	Physiologie
Mme Martine PESTEL-CARON	Microbiologie
Mme Elisabeth SEGUIN	Pharmacognosie
Mr Mohamed SKIBA	Pharmacie galénique
Mr Rémi VARIN	Pharmacie clinique
Mr Philippe VERITE	Chimie analytique

III – MEDECINE GENERALE

PROFESSEUR

Mr Jean-Loup **HERMIL** UFR Médecine générale

PROFESSEURS ASSOCIES A MI-TEMPS

Mr Pierre **FAINSILBER** UFR Médecine générale

Mr Alain **MERCIER** UFR Médecine générale

Mr Philippe **NGUYEN THANH** UFR Médecine générale

MAITRE DE CONFERENCES ASSOCIE A MI-TEMPS

Mr Emmanuel **LEFEBVRE** UFR Médecine générale

Mme Elisabeth **MAUVIARD** UFR Médecine générale

Mme Marie Thérèse **THUEUX** UFR Médecine générale

ENSEIGNANTS MONO-APPARTENANTS

PROFESSEURS

Mr Serguei **FETISSOV** Physiologie (ADEN)

Mme Su **RUAN** Génie Informatique

MAITRES DE CONFERENCES

Mr Sahil **ADRIOUCH** Biochimie et biologie moléculaire (Unité Inserm 905)

Mme Gaëlle **BOUGEARD-DENOYELLE** Biochimie et biologie moléculaire (UMR 1079)

Mme Carine **CLEREN** Neurosciences (Néovasc)

Mme Pascaline **GAILDRAT** Génétique moléculaire humaine (UMR 1079)

Mr Antoine **OVRARD-PASCAUD** Physiologie (Unité Inserm 1076)

Mme Isabelle **TOURNIER** Biochimie (UMR 1079)

CHEF DES SERVICES ADMINISTRATIFS : Mme Véronique DELAFONTAINE

HCN - Hôpital Charles Nicolle

HB - Hôpital de BOIS GUILLAUME

CB - Centre Henri Becquerel

CHS - Centre Hospitalier Spécialisé du Rouvray

CRMPR - Centre Régional de Médecine Physique et de Réadaptation

Table des matières

Table des matières.....	1
Table des illustrations	3
Abréviations	5
I – Introduction	6
II – Généralités.....	8
1. Classification des leucémies aiguës myéloïdes.....	8
2. Anomalies génétiques présentes dans les cellules tumorales myéloïdes	11
3. Intérêts de la recherche des anomalies génétiques dans le diagnostic et la prise en charge des LAM de l'adulte	14
3.1. Intérêt diagnostique	15
3.2. Intérêt pronostique	16
3.3 Intérêt pour la prise en charge thérapeutique	19
3.4 Intérêt pour le suivi de la maladie	20
4. La méthode de Reverse Transcription – Multiplex Ligation Probe Amplification (RT-MLPA) appliquée à la détection des transcrits de fusion ...	21
4.1. La méthode de RT-MLPA : utilisation classique	21
3.2. Application de la RT-MLPA à la recherche des transcrits de fusion par la méthode TCTM	24
3.3. Capacité de multiplexage de la méthode TCTM	25
III - Matériels et Méthodes	29
1. Patients et prélèvements.....	29
2. Extraction de l'ARN tumoral	30
3. Réaction de RT-MLPA	31
3.1 <i>Reverse transcription</i>	31
3.2 Hybridation des sondes de MLPA.....	32
3.3 Ligation des sondes de MLPA.....	32
3.4 <i>Polymerase Chain Reaction</i>	33
4. Visualisation de l'amplification.....	33

5. Pyroséquençage.....	34
IV – Résultats.....	36
1. Caractéristiques des patients	36
2. Transcrits de fusion détectés dans la série	38
2.1. Transcrits fréquents	38
2.2. Transcrits rares	42
3. Mutations détectées par le kit TCTM	44
3.1. <i>MLL</i> -PTD.....	44
3.2. mutations de <i>NPM1</i> de type A et B	45
V – Discussion	46
Références bibliographiques	51

Table des illustrations

Tableaux

Tableau 1. Classification OMS 2008 des leucémies aiguës myéloïdes et néoplasmes myéloïdes associés	10
Tableau 2. Analyses génétiques recommandées par l'ELN en 2010 dans les LAM	14
Tableau 3. Classification pronostique des LAM proposée par l'ELN en 2010	16
Tableau 4. Caractéristiques des patients	37
Tableau 5. Transcrits de fusions détectés dans la série et nombre de transcrits de fusion détectés par les techniques classiques (caryotype, FISH et RT-PCR) et la technique TCTM.....	41

Figures

Figure 1. Incidence des leucémies aiguës myéloïdes par âge en 2012	6
Figure 2. Nombre moyen de mutations somatiques par mégabase dans les cancers....	11
Figure 3. Classes de mutations impliquées dans la physiopathologie des leucémies aiguës myéloïdes	13
Figure 4. Courbes de survie dans une série de 1550 patients atteints de LAM primitive classées selon l'ELN.....	18
Figure 5. Schéma général de la prise en charge thérapeutique des LAM chez les patients de moins de 60 ans	19
Figure 6. Schéma de la réaction de RT-MLPA classique	23
Figure 7. Représentation schématique d'un réarrangement chromosomique aboutissant à la synthèse d'un transcrit de fusion	24
Figure 8. Principe de la méthode TCTM	25
Figure 9. Capacité de multiplexage de la méthode TCTM.....	26

Figure 10. Couples de gènes de fusion potentiellement détectables par la méthode TCTM.....	28
Figure 11. Exemple de gel montrant des échantillons positifs et négatifs par la technique TCTM.....	33
Figure 12. Exemples de pyrogrammes obtenus lors du pyroséquençage des amplicons par la technique TCTM.....	35
Figure 13. Schéma intégrant la technique TCTM parmi les analyses classiques de génétique dans l'évaluation diagnostique des LAM.....	50

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ADNc : ADN complémentaire

ARN : Acide RiboNucléique

BCR : *Breakpoint Cluster Region*

CBF : *Core Binding Factor*

ALL : *Acute Lymphoblastic Leukemia ou Leucémie Aiguë Lymphoblastique*

CLL : *Chronic Lymphoid Leukemia ou Leucémie Lymphoïde Chronique*

ELN : *European LeukemiaNet*

FISH : *Fluorescent In Situ Hybridization ou Hybridation Fluorescente In Situ*

ITD : *Internal Tandem Duplication ou Duplication En Tandem*

LAM : *Leucémie Aiguë Myéloïde*

LAP : *Leucémie Aiguë Promyélocytaire*

MRD : *Minimal Residual Disease ou Maladie Résiduelle*

TCTM ou MTCT : *rt-MLPA based Test for Chromosomal Translocation detection*

OMS : *Organisation Mondiale de la Santé*

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

RT : *Reverse Transcription ou Reverse Transcriptase*

RT-MLPA : *Reverse Transcriptase – Multiplex Ligation Probe Amplification*

RT-PCR : *Reverse Transcriptase – Polymerase Chain Reaction*

RT-qPCR : *Reverse Transcriptase – quantitative Polymerase Chain Reaction*

I – Introduction

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des maladies rares (< 6 cas pour 100 000 habitants par an selon la définition du groupe RAREcare; Gatta et al., 2011) dont le taux brut d'incidence en France à été estimé à 4,4 cas pour 100 000 habitants par an, soit 2791 nouveaux cas en 2012 selon l'INCa (<http://www.e-cancer.fr>). Elles représentent ainsi 0,8 % des 355 000 nouveaux cas de cancers estimés en France en 2012. Les LAM sont essentiellement des maladies du sujet âgé, leur incidence restant relativement basse avant 60 ans pour augmenter rapidement après cet âge (Figure 1).

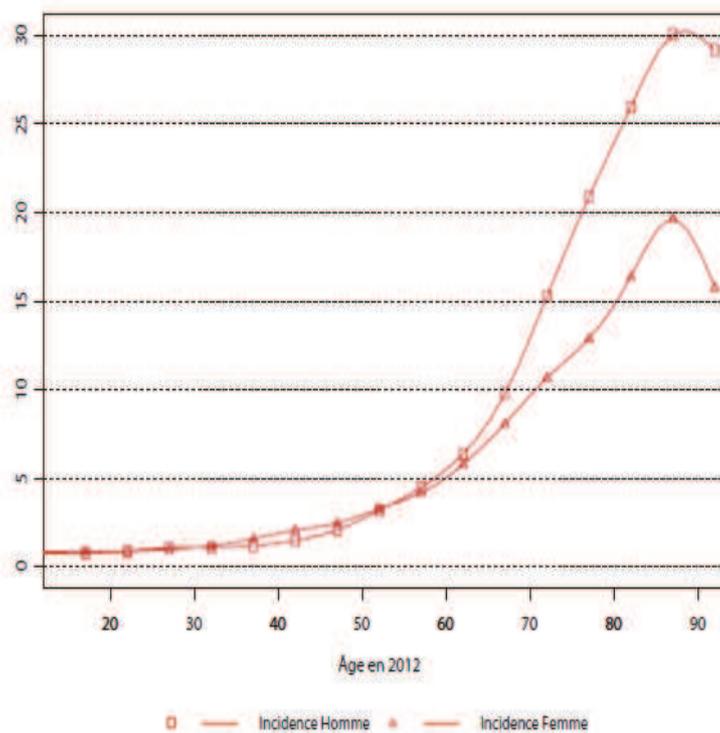


Figure 1. Incidence des leucémies aiguës myéloïdes par âge en 2012

D'après Monnereau et al., 2013.

En tant que plateforme hospitalière de génétique moléculaire des cancers, le Centre Henri Becquerel de Rouen a pour mission de développer l'accessibilité des analyses de génétique moléculaire au plus grand nombre de patients atteints de pathologie tumorale. Dans ce contexte, une technique innovante de biologie moléculaire permettant de mettre en évidence des anomalies caractéristiques des leucémies aiguës a récemment été inventée au sein de son laboratoire de recherche. Nous nous proposons ici d'évaluer ses performances dans une série de 223 patients adultes atteints de LAM pris en charge au Centre entre 2008 et 2013. Nous analysons également la place et l'utilité éventuelle de cette technique au sein du panel d'outils déjà disponibles dans un laboratoire hospitalier de génétique moléculaire.

II – Généralités

1. Classification des leucémies aiguës myéloïdes

Les LAM sont des maladies causées par des proliférations clonales de blastes appartenant à une ou plusieurs lignée(s) myéloïde(s) qui envahissent la moelle osseuse, le sang, et éventuellement d'autres tissus. En raison de l'hétérogénéité clinico-biologique des LAM, leur classification en différentes entités aussi homogènes que possible est indispensable pour permettre une prise en charge optimale des patients atteints de cette maladie. La classification des LAM repose les données cliniques, la morphologie des blastes, leurs caractéristiques cytochimiques et immuno-phénotypiques, et sur l'étude génétique des cellules tumorales.

La mise en évidence des anomalies génétiques présentes dans les cellules tumorales a été intégrée dans l'algorithme utilisé pour classer les LAM depuis la troisième édition de la Classification des Tumeurs des Tissus Hématopoïétiques et Lymphoïdes publiée par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) en 2001 (Jaffe and World Health Organization, 2001). Des entités "clinico-pathologico-génétiques" de LAM ont ainsi été définies et un nouveau groupe appelé "LAM avec anomalies génétiques récurrentes" a été créé.

Dans la mesure où la physiopathologie des LAM s'explique principalement par l'accumulation d'anomalies génétiques dans les blastes tumoraux, la création de ce nouveau groupe prend tout son sens. Les LAM ayant des anomalies génétiques identiques évoluent *a priori* de la même manière sur un terrain similaire. A partir des données de survie existantes, on peut donc évaluer leur pronostic et ajuster la thérapeutique à l'agressivité de la maladie. De plus, certaines anomalies génétiques peuvent être spécifiquement visées par les nouvelles thérapies « ciblées ». Anisi, leur mise en évidence permet un traitement adapté.

Dans la dernière édition de la classification de l'OMS, parue en 2008, la part des entités définies par des anomalies génétiques a été renforcée en raison d'avancées dans les connaissances de la physiopathologie des LAM (Swerdlow et al., 2008). Les groupes décrits dans cette édition sont listés dans le tableau 1. Les remaniements chromosomiques, principalement des translocations réciproques, caractérisent la majorité des LAM avec anomalies génétiques récurrentes. Deux types de LAM avec mutations de gènes spécifiques ont été ajoutées en tant qu'entités provisoires dans l'attente de données complémentaires.

<p>Leucémies aiguës myéloïdes avec anomalies génétiques récurrentes</p> <p>LAM avec t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i></p> <p>LAM avec inv(16)(p13.1;q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i></p> <p>LAP avec t(15;17)(q22;q12); <i>PML-RARA</i></p> <p>LAM avec t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i></p> <p>LAM avec t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i></p> <p>LAM avec inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVI1</i></p> <p>LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13;q13); <i>RBM15-MKL1</i></p> <p>Entité provisoire : LAM avec <i>NPM1</i> muté</p> <p>Entité provisoire : LAM avec <i>CEBPA</i> muté</p> <p>Leucémies aiguës myéloïdes avec altérations associées aux myélodysplasies</p> <p>Leucémies aiguës myéloïdes secondaires aux thérapies cytotoxiques</p> <p>Leucémies aiguës myéloïdes, sans autre spécification</p> <p>LAM avec différenciation minimale</p> <p>LAM sans maturation</p> <p>LAM avec maturation</p> <p>Leucémie aiguë myélomonocytaire</p> <p>Leucémie aiguë monoblastique/monocytaire</p> <p>Leucémies aiguës érythroïdes</p> <p> Leucémie érythroïde pure</p> <p> Erythroleucémie (érythroïde/myéloïde)</p> <p>Leucémie aiguë mégacaryoblastique</p> <p>Leucémie aiguë basophilique</p> <p>Panmyélose aiguë avec myélofibrose</p> <p>Sarcome myéloïde</p> <p>Proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down</p> <p> Myélopoïèse anormale transitoire</p> <p> Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down</p> <p>Néoplasie à cellules blastiques plasmocytoïdes</p>

Tableau 1. Classification OMS 2008 des leucémies aiguës myéloïdes et néoplasmes myéloïdes associés

Abréviations : LAM, leucémie aiguë myéloïde; LAP, leucémie aiguë promyélocytaire

Adapté de Swerdlow et al., 2008.

2. Anomalies génétiques présentes dans les cellules tumorales myéloïdes

Les LAM ont la particularité d'être des cancers pour lesquels seul un faible nombre de mutations est retrouvé dans le génome des cellules tumorales (Alexandrov et al., 2013; Figure 2). L'étude récente par séquençage haut débit de 200 LAM incluses dans « *The Cancer Genome Atlas* » a permis d'évaluer à 13 le nombre moyen de mutations dans les parties codantes du génome, dont 5 sont récurrentes (The Cancer Genome Atlas Research Network, 2013).

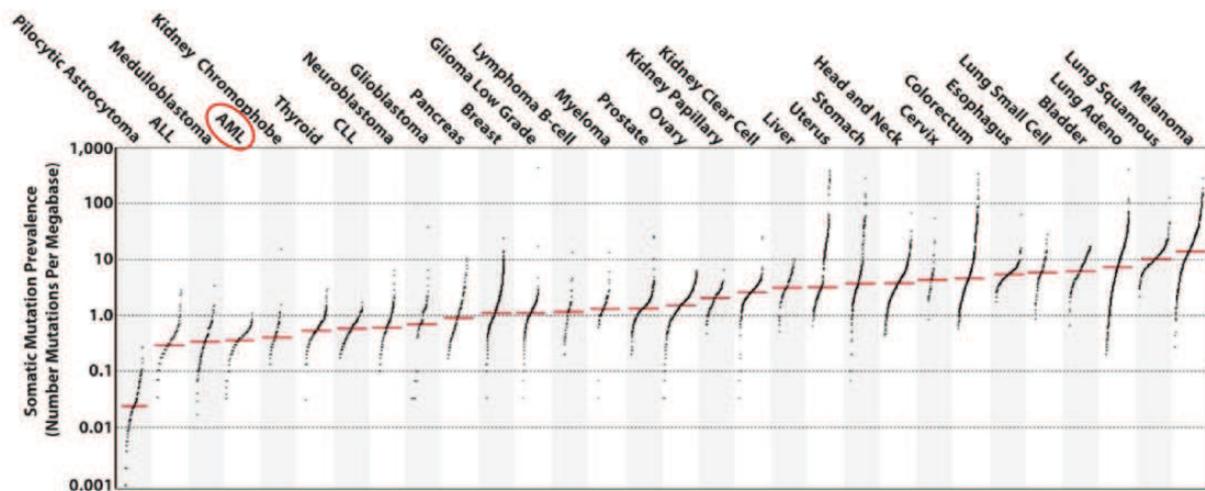


Figure 2. Nombre moyen de mutations somatiques par mégabase dans les cancers

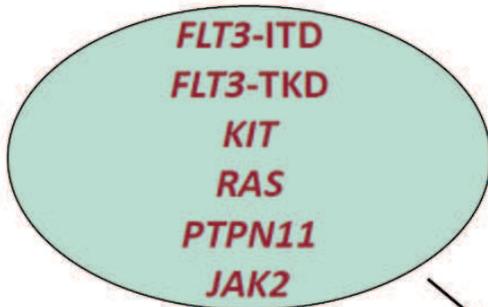
Abréviations : AML, *acute myeloid leukemia* ou leucémie aiguë myéloïde; ALL, *acute lymphoblastic leukemia* ou leucémie aiguë lymphoblastique; CLL, *chronic lymphoid leukemia* ou leucémie lymphoïde chronique.

Adapté de Alexandrov et al., 2013.

Dans un nombre significatif de LAM, seules deux mutations sont mises en évidence. L'une d'entre elle affecte un facteur de transcription, l'autre touche un gène codant une protéine impliquée dans la transduction du signal. Ce faible nombre de mutations dans les LAM suggère que seuls quelques événements génétiques sont nécessaires pour initier la leucémogénèse.

De manière schématique, les deux types de mutations les plus fréquentes ont été regroupés en deux classes (Swerdlow et al., 2008; Figure 2). Les anomalies dites de classe I sont celles qui affectent la transduction du signal. Elles confèrent aux cellules un pouvoir augmenté de prolifération et/ou de survie, et sont liées à des mutations de gènes tels que *FLT3* ou *KIT*. Les autres, dites de classes II, ont pour effet de bloquer la maturation cellulaire et l'apoptose subséquente. Elles sont principalement associées à des remaniements chromosomiques, parmi lesquels les translocations figurent au premier plan, et impliquent des gènes de facteurs de transcription tels que *RUNX1*, *CBFB* ou *RARA*.

Mutations de classe I



Prolifération et/ou avantage de survie; différenciation non affectée

Mutations de classe II



Différenciation hématopoïétique et apoptose subséquente déficientes

LAM

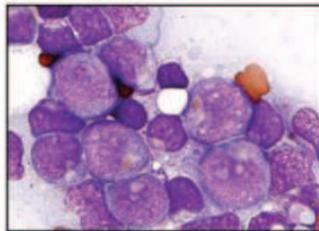


Figure 3. Classes de mutations impliquées dans la physiopathologie des leucémies aiguës myéloïdes

Abréviation : LAM, leucémie aiguë myéloïde

Adapté de Swerdlow et al., 2008.

3. Intérêts de la recherche des anomalies génétiques dans le diagnostic et la prise en charge des LAM de l'adulte

Les données génétiques fournissent des éléments essentiels au diagnostic et à la prise en charge des LAM. Des recommandations intégrant ces données ont été publiées par un groupe international d'experts de l'*European LeukemiaNet* (ELN) dans le journal *Blood* en 2010 (Döhner et al., 2010). Les examens de génétique recommandés par l'ELN (hors leucémie aiguë promyélocytaire) sont listés dans le tableau 2.

Examens	Pratique générale	Essais cliniques
Examens diagnostiques		
Cytogénétique	Oui	Oui
<i>RUNX1-RUNX1T1, CFBF-MYH11, PML-RARA</i> , recherche d'autres gènes de fusion	Optionnel ^a	Optionnel ^a
Examens pronostiques		
Mutations de <i>NPM1, CEBPA, FLT3</i>	Optionnel ^b	Oui
Mutations de <i>WT1, RUNX1, MLL, KIT, RAS, TP53, TET2, IDH1</i>	Non	Expérimental
Expression de <i>ERG, MNI, EVII, BAALC</i>	Non	Expérimental
Détection de la maladie résiduelle	Non	Expérimental

Tableau 2. Analyses génétiques recommandées par l'ELN en 2010 dans les LAM

^a Doit être réalisé en cas de caryotype de mauvaise qualité ou en cas de morphologie cellulaire typique avec absence de l'anomalie cytogénétique suspectée.

^b Fortement recommandé dans les LAM à caryotype normal.

Adapté de Döhner et al., 2010.

3.1. Intérêt diagnostique

Dans environ 55% des cas, des anomalies de structure chromosomique sont mises en évidence dans les LAM. Sept d'entre-elles, listées dans le tableau 1, définissent des LAM avec anomalies génétiques récurrentes dans la classification OMS 2008. La présence d'une des trois anomalies : $t(8;21)(q22;q22)$, $inv(16)/t(16;16)(p13.1;q22)$ et $t(15;17)(q22;q12)$, permet de porter le diagnostic biologique de LAM indépendamment du pourcentage de blastes médullaires, qui dans les autres cas doit être supérieur à 20% (mis à part le cas particulier de l'érythroleucémie).

D'après la classification de l'OMS de 2008, certaines anomalies cytogénétiques sont suffisantes pour porter le diagnostic de LAM avec altérations associées aux myélodysplasies lorsque la blastose médullaire est supérieure à 20% :

- la présence d'un caryotype complexe (défini par trois anomalies chromosomiques ou plus),
- les anomalies non équilibrées suivantes : -7 ou $del(7q)$; -5 ou $del(5q)$; $i(17q)$ ou $t(17p)$; -13 ou $del(13q)$; $del(11q)$; $del(12p)$ or $t(12p)$; $del(9q)$; $idic(X)(q13)$,
- les anomalies équilibrées suivantes : $t(11;16)(q23;p13.3)$; $t(3;21)(q26.2;q22.1)$; $t(1;3)(p36.3;q21.1)$; $t(2;11)(p21;q23)$; $t(5;12)(q33;p12)$; $t(5;7)(q33;q11.2)$; $t(5;17)(q33;p13)$; $t(5;10)(q33;q21)$; $t(3;5)(q25;q34)$.

Il est donc indispensable de réaliser un caryotype standard lors de l'évaluation diagnostique d'une LAM.

3.2. Intérêt pronostique

Les données de cytogénétique et de biologie moléculaire fournissent les éléments les plus puissants pour prédire le pronostic des LAM (Döhner et al., 2010). En se basant sur les études disponibles les plus pertinentes, l'ELN a proposé une classification pronostique basée sur l'étude génétique des blastes de LAM (Tableau 3).

Groupe génétique	Caractéristiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> <i>NPM1</i> muté sans <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) <i>CEBPA</i> muté (caryotype normal)
Intermédiaire I	<i>NPM1</i> muté et <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) <i>NPM1</i> non muté et <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal) <i>NPM1</i> non muté sans <i>FLT3-ITD</i> (caryotype normal)
Intermédiaire II	t(9;11)(p22;q23); <i>MLLT3-MLL</i> Anomalies cytogénétiques non classées comme favorables ou défavorables
Défavorable	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); <i>RPN1-EVII</i> t(6;9)(p23;q34); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11)(v;q23); <i>MLL</i> réarrangé -5 or del(5q); -7; anomalie (17p); caryotypes complexes*

Tableau 3. Classification pronostique des LAM proposée par l'ELN en 2010

Abréviations : ITD, *internal tandem duplication* ou duplication en tandem.

*Trois anomalies chromosomiques ou plus en l'absence de t(8;21)(q22;q22), inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22); t(15;17)(q22;q12), t(9;11)(p22;q23), t(v;11)(v;q23), t(6;9)(p23;q34), inv(3)(q21;q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2).

Adapté de Döhner et al., 2010.

Quatre groupes génétiques à valeur pronostique ont ainsi été définis. La leucémie aiguë promyélocytaire (LAP ou LAM3), qui présente le meilleur pronostic de toutes les LAM en raison de l'existence d'une thérapie spécifique, n'a pas été incluse dans la classification.

La puissance pronostique de cette classification a récemment été évaluée dans une étude comprenant 1550 patients adultes atteints de LAM primitive, dont 818 patients d'âge inférieur à 60 ans et 732 patients d'âge supérieur à 60 ans (Mrozek et al., 2012). Les groupes génétiques étaient clairement séparés en fonction de la survie sans maladie et de la survie globale, ce qui confirme la valeur pronostique de cette classification dans cette grande série (Figure 4). Il faut toutefois noter l'inversion de pronostic dans les sous-groupes intermédiaires I et II chez les patients âgés de moins de 60 ans.

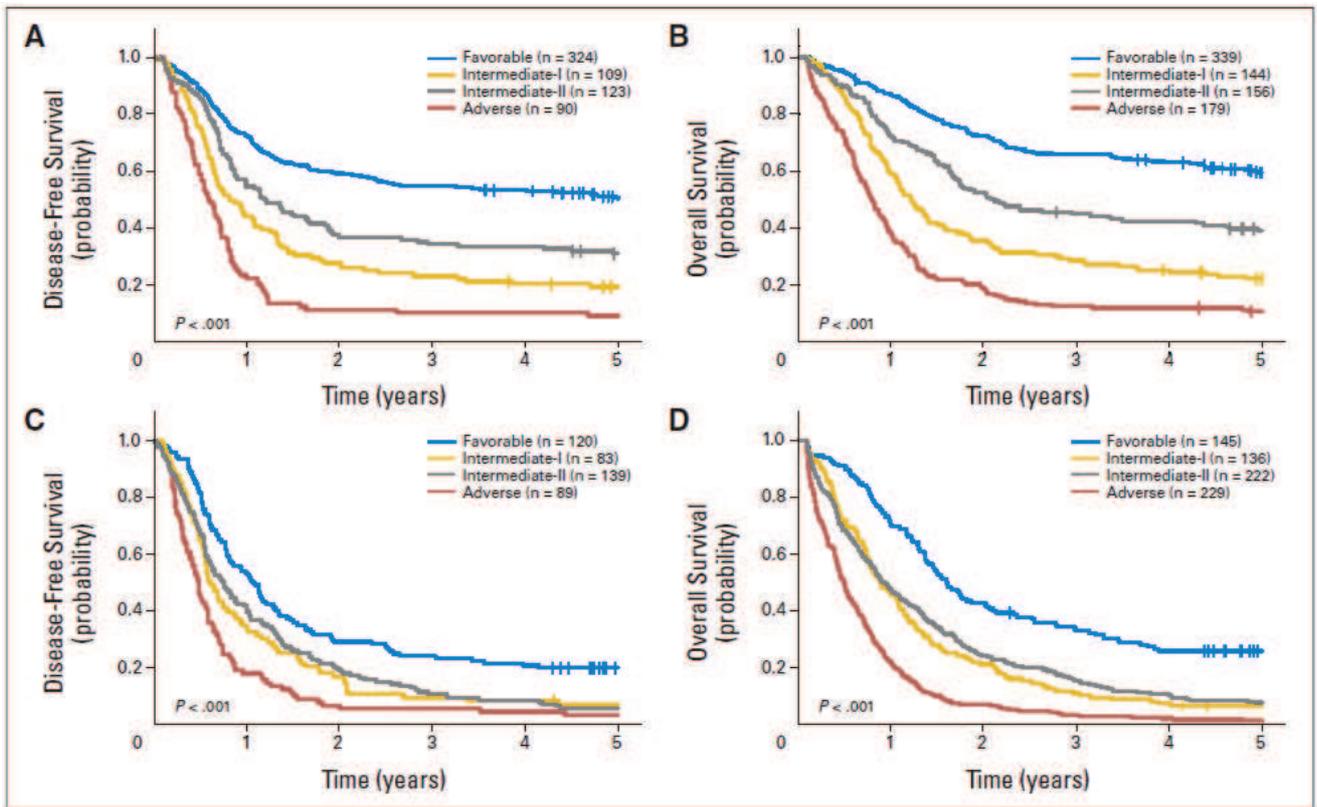


Figure 4. Courbes de survie dans une série de 1550 patients atteints de LAM primitive classées selon l'ELN

(A) Survie sans maladie (*disease-free survival*) et (B) survie globale (*overall survival*) chez les patients âgés de moins de 60 ans; (C) Survie sans maladie et (D) survie globale chez les patients âgés de plus de 60 ans.

D'après Mrozek et al., 2012.

3.3 Intérêt pour la prise en charge thérapeutique

La prise en charge thérapeutique des LAM est aujourd'hui grandement influencée par les données de génétique mises en évidence dans les cellules tumorales. En effet, chez les patients de moins de 60 ans, et lorsque leur état général le permet, la réalisation d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en post-rémission peut être effectuée. Cependant, environ 20 % des patients allogreffés décèdent directement à cause de ce traitement. Ainsi, chez les patients classés dans le groupe génétique favorable, un schéma thérapeutique n'incluant pas l'allogreffe de CSH est généralement recommandé (Döhner et al., 2010; National Comprehensive Cancer Network, 2014). Un schéma général de la prise en charge thérapeutique des LAM des patients de moins de 60 ans est présenté dans la figure 5.

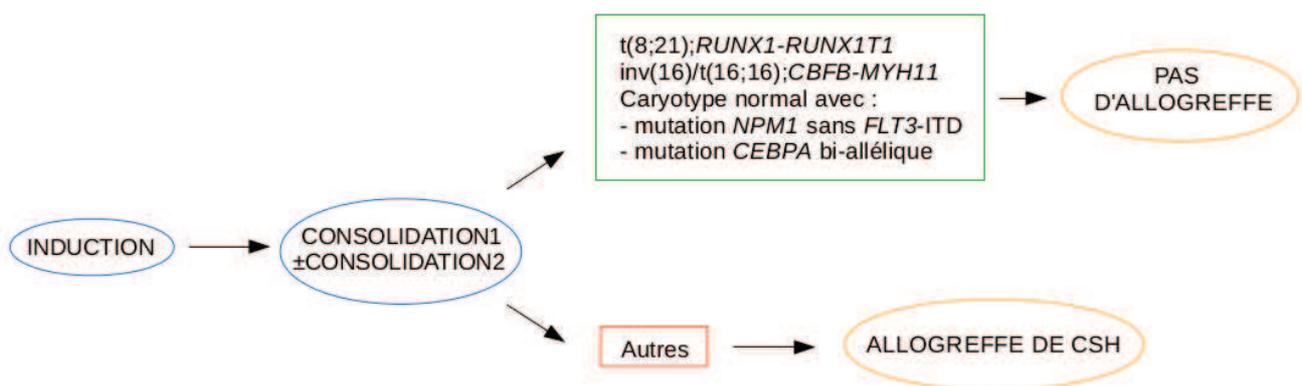


Figure 5. Schéma général de la prise en charge thérapeutique des LAM chez les patients de moins de 60 ans

D'après Döhner et al., 2010 et National Comprehensive Cancer Network, 2014.

3.4 Intérêt pour le suivi de la maladie

Le suivi de la maladie résiduelle (MRD) post-induction et post-consolidation paraît utile dans les LAM pour estimer la réponse aux traitements et détecter précocement les rechutes. Celui-ci peut s'effectuer par *Reverse Transcriptase - quantitative Polymerase Chain Reaction* (RT-qPCR), en détectant des éléments spécifiques des cellules tumorales tels que les fusions, mutations ou surexpressions de gènes. Actuellement, seul le suivi de la MRD dans la LAM3, basé sur la détection du transcrit PML-RARA par RT-qPCR, est recommandé par l'ELN (Sanz et al., 2009; Döhner et al., 2010). Cependant, la recherche très active dans ce domaine fournit des résultats prometteurs dans les autres LAM avec anomalies génétiques récurrentes, telles que les fusions *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11*, les fusions et duplication partielles en tandem de *MLL* (*MLL-PTD*), ou les mutations de *NPM1* et de *CEBPA* (National Comprehensive Cancer Network, 2014).

4. La méthode de Reverse Transcription – Multiplex Ligation Probe Amplification (RT-MLPA) appliquée à la détection des transcrits de fusion

Récemment, Philippe Ruminy, Vinciane Marchand et Fabrice Jardin ont créé une nouvelle méthode de détection des transcrits de fusion au Centre Henri Becquerel de Rouen. Celle-ci permet la recherche simultanée d'un grand nombre de transcrits chimériques en utilisant les propriétés originales de la RT-MLPA. Cette méthode se nomme TCTM ou MTCT (*rt-MLPA based Test for Chromosomal Translocation detection*).

4.1. La méthode de RT-MLPA : utilisation classique

La RT-MLPA est une méthode de RT-PCR multiplexe utilisée classiquement pour détecter des variations quantitatives de séquences d'ARN messagers (ARNm) entre différents échantillons, de manière à créer des profils d'expression de ces ARNm (Figure 6). Elle permet d'étudier jusqu'à 50 séquences différentes de façon simultanée. Une réaction de *reverse transcription* (RT) est effectuée avant l'étape de MLPA afin de produire les ADN complémentaires (ADNc) des séquences d'intérêt. Contrairement à la RT-PCR multiplexe standard, ce ne sont pas les séquences cibles d'ADNc qui sont amplifiées mais des sondes de MLPA hybridées à ces séquences cibles.

Les sondes de MLPA sont constituées de deux oligonucléotides différents qui comprennent chacun une séquence « primer » de PCR, respectivement au niveau de leurs extrémités 5' et 3'. Ces deux oligonucléotides sont conçus pour s'hybrider sur des séquences cibles immédiatement adjacentes, et lors d'une réaction de ligation enzymatique, ils sont joints de façon covalente de manière à former une sonde unique appelée sonde de MLPA. Cette sonde est ensuite amplifiée par PCR. La quantité de produits d'amplification de chaque sonde est exponentiellement proportionnelle au nombre de séquences cibles dans l'échantillon. Les oligonucléotides non joints ne sont pas amplifiés de manière exponentielle et ne produisent aucun signal. Le même couple de séquences « primer » étant fixé aux extrémités des sondes de MLPA, un seul couple d'amorces de PCR est nécessaire pour l'amplification de toutes les sondes formées. L'une des deux amorces de PCR est marquée par un fluorochrome, de manière à générer des amplicons détectables par spectrométrie à l'aide d'un séquenceur en mode « analyse de fragments ».

En assignant aux séquences initiales d'ARN des sondes spécifiques de tailles différentes, à l'aide de fragments appelés *spacers*, il est possible de générer des produits de PCR fluorescents de taille spécifique de chaque séquence d'ARN. A chaque amplicon est associé un pic de fluorescence dont l'intensité est proportionnelle à la quantité d'ARNm initialement présente dans l'échantillon. La durée totale de l'analyse est d'environ 24 heures.

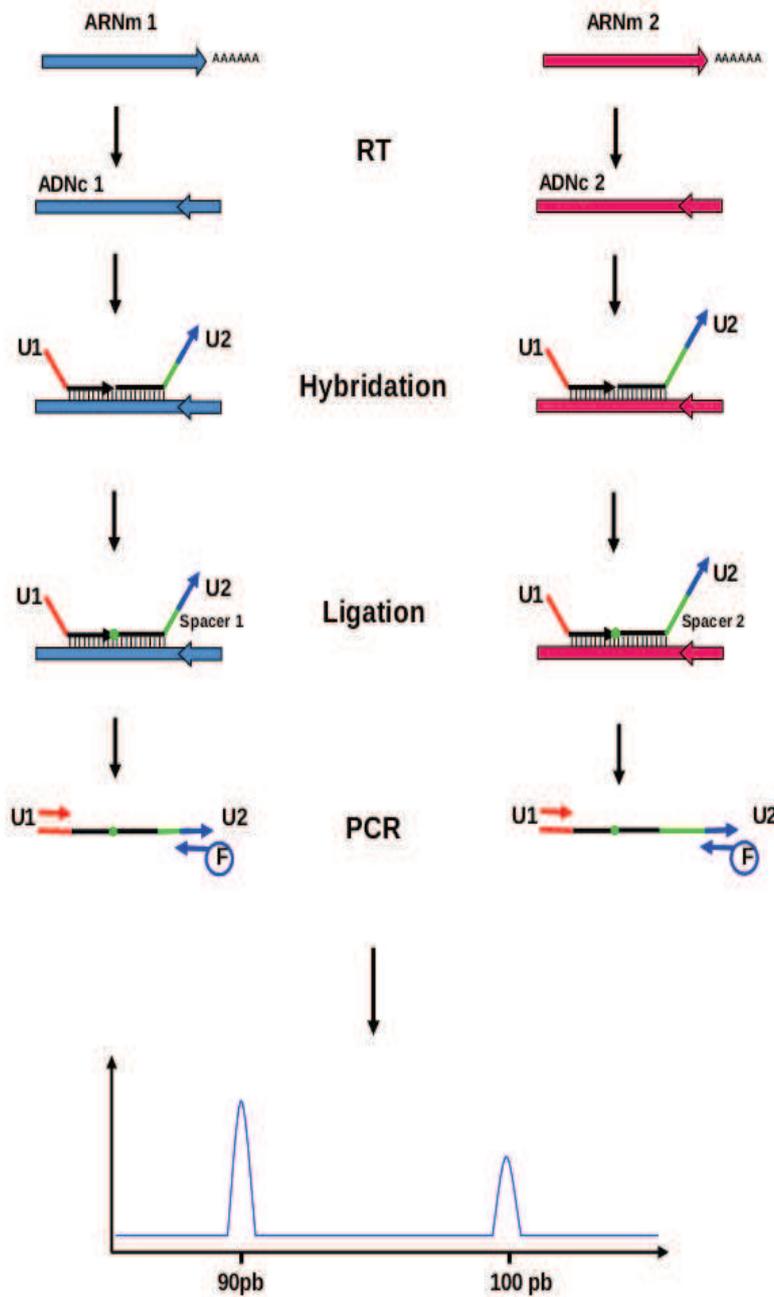


Figure 6. Schéma de la réaction de RT-MLPA classique

Les étapes de la réaction sont les suivantes : 1) *Reverse transcription* des ARNm
 2) Dénaturation de l'ADNc et hybridation des sondes de MLPA; 3) Ligation des sondes de MLPA; 4) Réaction de PCR; 5) Séparation des produits d'amplification par électrophorèse capillaire sur un séquenceur et analyse de l'intensité de fluorescence.

3.2. Application de la RT-MLPA à la recherche des transcrits de fusion par la méthode TCTM

Les transcrits de fusion sont caractérisés par la présence d'une jonction entre deux exons appartenant aux deux gènes fusionnés par le réarrangement chromosomique (Figure 7). En construisant des sondes avec des oligonucléotides situés de part et d'autre des jonctions, la méthode de RT-MLPA peut être utilisée pour amplifier spécifiquement ces jonctions chimériques. C'est cette propriété qui est utilisée dans la méthode TCTM (Figure 8).

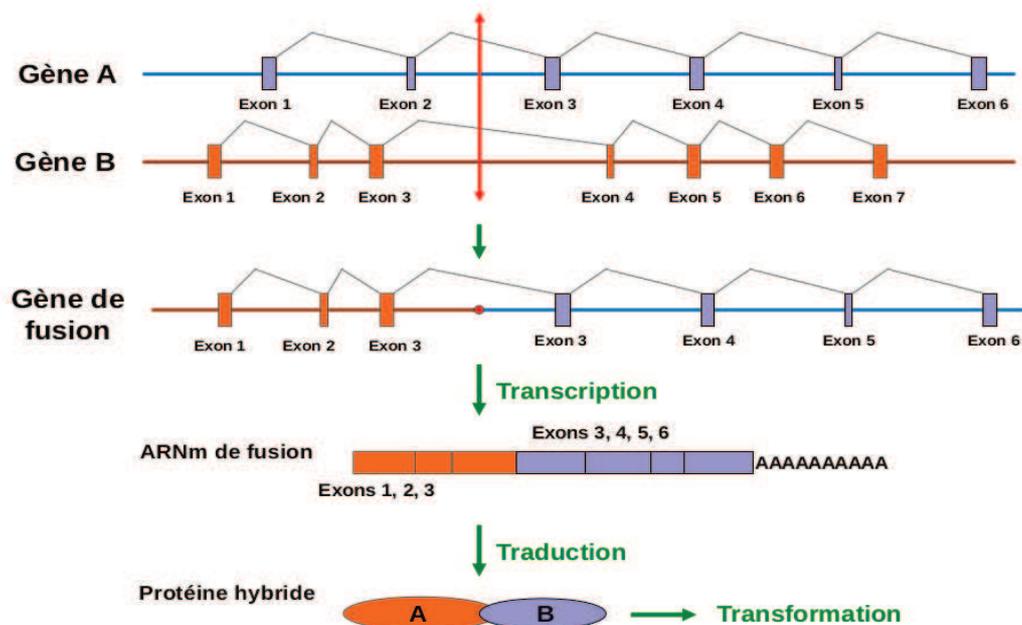


Figure 7. Représentation schématique d'un réarrangement chromosomique aboutissant à la synthèse d'un transcrit de fusion

Dans cet exemple, l'exon 3 du gène A et l'exon 3 du gène B sont joints sur le transcrit (ARNm) de fusion.

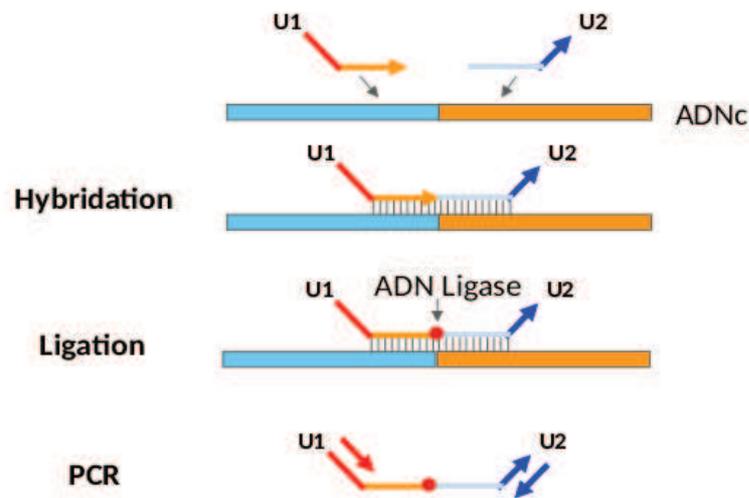


Figure 8. Principe de la méthode TCTM

Les sondes de MLPA sont construites pour s'hybrider sur l'ADNc correspondant à la jonction chimérique d'exons du transcrit de fusion.

3.3. Capacité de multiplexage de la méthode TCTM

La puissance de la méthode TCTM provient de sa forte capacité de multiplexage. Le fait d'utiliser des oligonucléotides servant de demi-sondes permet à chacun d'entre eux d'avoir une multitude de partenaires potentiels. Ceci présente un intérêt majeur puisque les points de cassures chromosomiques aboutissant à la fusion de deux gènes se situent fréquemment dans des régions recouvrant plusieurs introns et exons appelées *breakpoint cluster regions* (bcr). Il est donc possible de couvrir l'ensemble des possibilités de fusions grâce à cette technique (Figure 9).

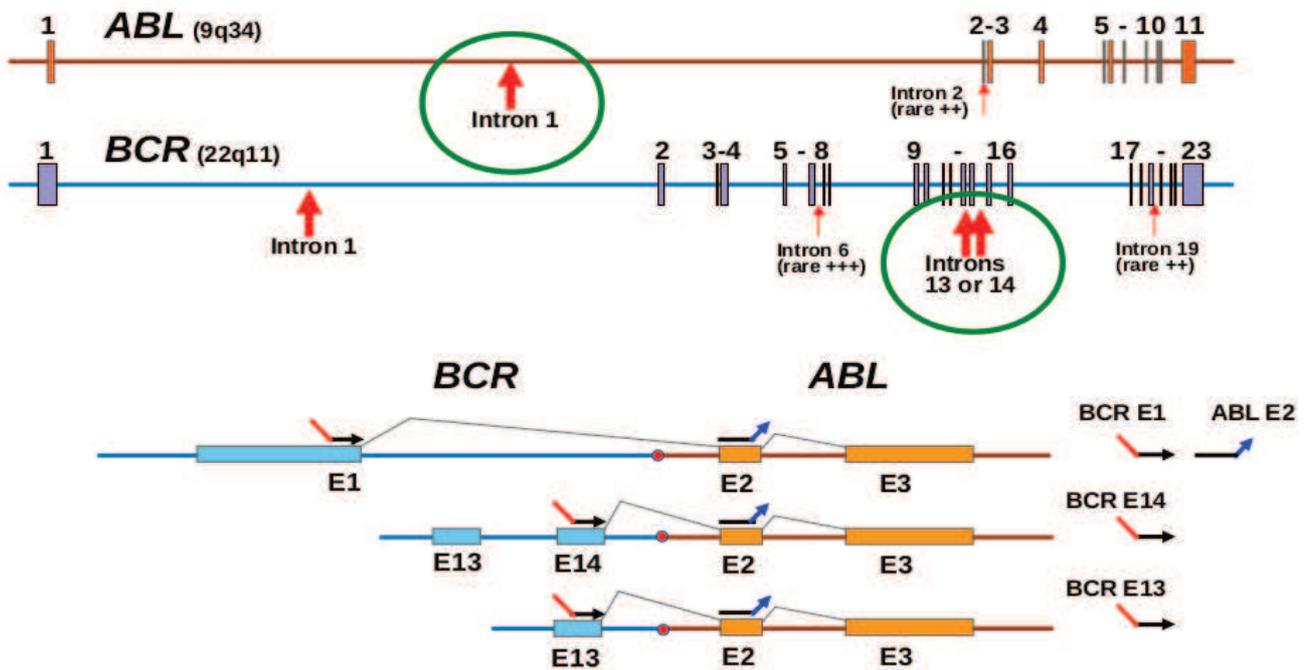


Figure 9. Capacité de multiplexage de la méthode TCTM

Exemple de trois transcrits *BCR-ABL* fréquemment observés. Alors que le point de cassure se situe presque toujours dans l'intron 1 du gène *ABL*, sa localisation est plus variable dans le gène *BCR*, en étant fréquemment situés après les exons 1, 14 ou 13. Par conséquent, pour amplifier l'une de ces trois fusions par RT-MLPA, une seule demi-sonde placée sur l'exon 2 de l'ARNm du gène *ABL* sera nécessaire.

Un gène peut également fusionner avec différents autres gènes. L'exemple le plus marquant est celui du gène *MLL*, pour lequel environ 80 gènes partenaires sont aujourd'hui caractérisés à l'échelle moléculaire (Meyer et al., 2013). Là encore, la méthode TCTM s'avère être un atout majeur de par son fort pouvoir de multiplexage. Au total, le kit TCTM dans sa version 2 détecte potentiellement plus de 400 transcrits de fusions issus de 58 translocations décrites dans les leucémies aiguës, ainsi que les duplications partielles en tandem de *MLL* (*MLL*-PTD) et les mutations de *NPM1* de type A et B (Figure 10). Ce potentiel de multiplexage est grandement supérieur à celui de la PCR multiplexe classique.

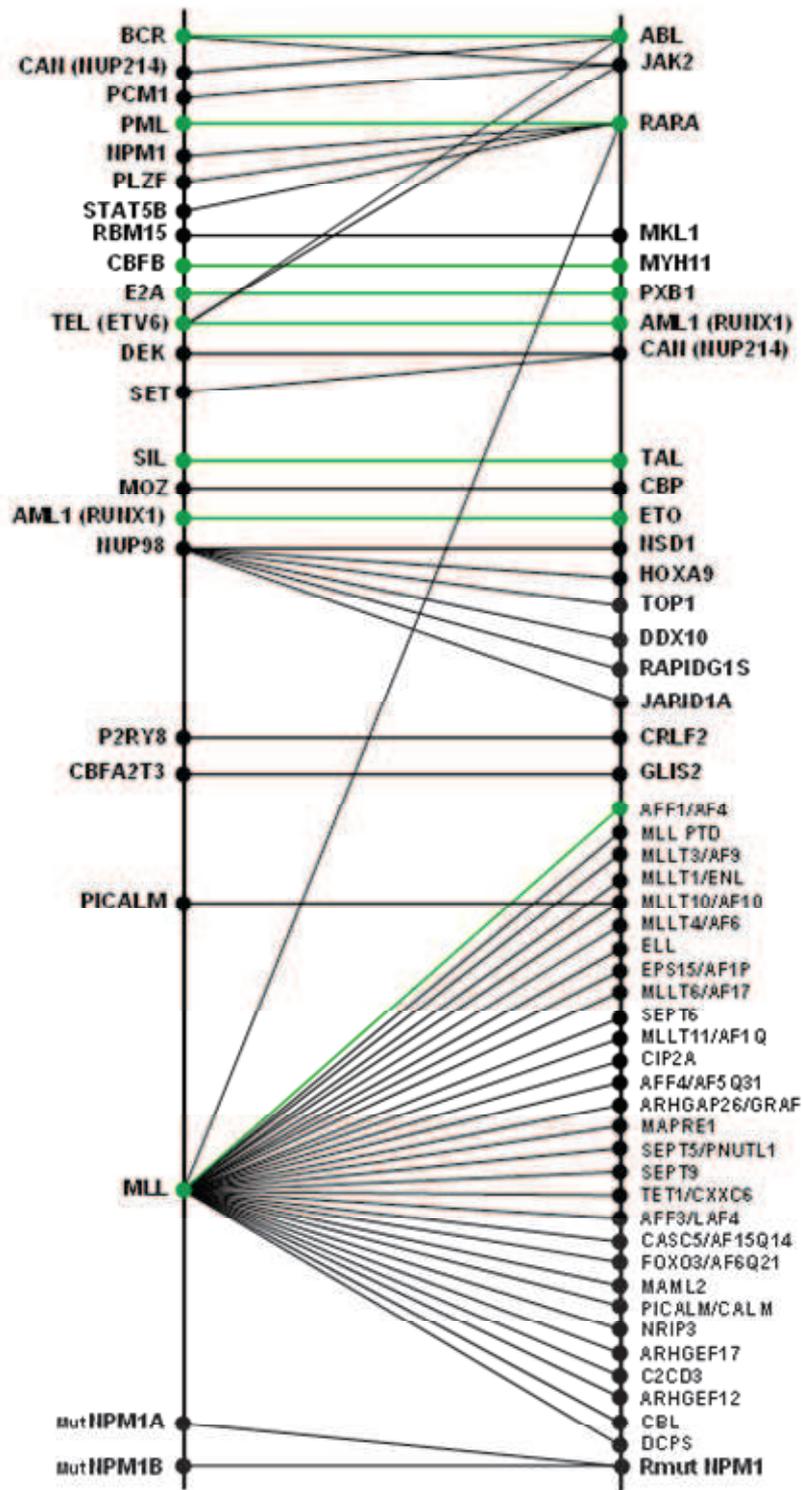


Figure 10. Couples de gènes de fusion potentiellement détectables par la méthode TCTM

Ce schéma décrit la version 2 du kit TCTM. Les couples de gènes de la version 1 sont reliés par des lignes vertes.

III - Matériels et Méthodes

1. Patients et prélèvements

Une série de 223 cas de leucémies aiguës myéloïdes (LAM) prises en charge au Centre Henri Becquerel de Rouen a été étudiée de manière rétrospective. Cette série était constituée de tous les cas incidents de LAM de l'adulte adressés au Centre Henri Becquerel entre 2008 et 2013, pour lesquels un échantillon d'ARN tumoral était disponible dans la banque du Centre. Sur les 241 cas recensés pendant cette période, 18 (7.5%) d'entre eux n'avaient pas d'ARN disponible. Les échantillons de moelle et/ou de sang dont étaient issus les ARN ont été recueillis au moment du diagnostic. Tous ont été obtenus après consentement écrit des patients. Le diagnostic biologique de LAM a été effectué par des cytologistes, cytométristes et généticiens experts selon les critères de l'Organisation Mondiale de la Santé de 2008. Les données morphologiques, de cytogénétique et de biologie moléculaire disponibles ont été colligées dans un tableau de type Excel.

2. Extraction de l'ARN tumoral

Les cellules mononucléées ont été isolées du sang ou de la moelle à l'aide de Ficoll-Paque (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) puis mises en suspension dans 20 mL de milieu RPMI-1640 (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France). La concentration en cellules de la suspension a été évaluée à l'aide d'un compteur de cellules Sysmex KX21N (Sysmex Corporation, Kobe, Japan) puis une quantité correspondant à 10 million de cellules a été prélevée. En cas de quantité de cellules inférieure à 10 millions, l'intégralité de la suspension a été utilisée. Après centrifugation pendant 10 min à 1500 tours/min, le surnageant était éliminé et le culot cellulaire remis en suspension dans 1 mL de Trizol (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) et conservé à -80°C jusqu'à la réalisation de l'étape suivante.

Après décongélation, l'extraction était poursuivie par ajout de 200 μ L de chloroforme (Merck, Darmstadt, Allemagne) à la suspension précédente. Après homogénéisation, le mélange était incubé 5 min dans de la glace puis centrifugé à 4°C pendant 15 min à 12000 tours/min. La phase aqueuse était ensuite prélevée et 500 μ L d'isopropanol pur (Sigma Aldrich, St Quentin Fallavier, France) y étaient ajoutés. Après homogénéisation et incubation pendant 10 min dans de la glace, le mélange était centrifugé à 4°C pendant 10 min à 12000 tours/min. Après décantation du surnageant, les culots étaient lavés par environ 1 mL d'éthanol à 70% puis centrifugés à 4°C pendant 5 min à 7500 tours/min. Deux nouveaux lavages étaient ensuite réalisés.

Après séchage, les culots étaient repris dans 100 μL d'eau puis le mélange était incubé à 55°C pendant 5 à 10 min.

Après dosage de l'ARN à l'aide d'un NanoDrop Spectrophotometer (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE, USA), la concentration des ARN obtenus est ajustée entre 50 et 250 ng/ μL .

3. Réaction de RT-MLPA

Les réactions de RT-MLPA ont été réalisées dans des tubes de 200 μL dans un thermocycleur à couvercle chauffant.

3.1 Reverse transcription

Pour chaque échantillon, un volume de 4 μL de la solution d'ARN extrait (200 à 1000 ng) a été placé au fond du tube. Après addition de 7.5 μL de mix de *reverse transcription* (2.5 μl de tampon 5x RT-MMLV, 1 μl DTT 100 mM, 2 μl dNTPs 10 mM et 2 μl d'hexamères à 100 pmol/ μl ; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) les échantillons ont été chauffés 1 min à 80°C puis incubés 5 min à 37°C et réfrigérés à 4°C.

1 μL de transcriptase inverse MMLV (30u; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) a ensuite été ajouté puis les échantillons ont été incubés à 37°C pendant 15 min, puis chauffés à 98°C pendant 2 min et réfrigérés à 4°C.

3.2 Hybridation des sondes de MLPA

Un volume de 5 μL de solution d'ADNc a été transféré dans un nouveau tube, puis a été ajouté 3 μL d'un mix de sondes de RT-MLPA : 1.5 μL de tampon SALSA-MLPA (MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) + 1.5 μL de dilution finale du mix des sondes. Les échantillons ont été chauffés 2 min à 95°C et incubés 1 heure à 60°C pour permettre l'hybridation des sondes de MLPA sur leurs ADNc cibles.

3.3 Ligation des sondes de MLPA

La ligation des oligonucléotides sondes hybridés a été réalisée par l'ajout de mix de ligation (3 μl de tampon SALSA-Ligase 65 A, 3 μL de tampon SALSA-Ligase B, 25 μl d'eau RNase-free et 1 μl de SALSA-Ligase 65; MRC Holland, Amsterdam, Netherlands) suivie d'une incubation à 54°C pendant 15 min et de l'inactivation de l'enzyme par chauffage à 95°C pendant 5 min.

3.4 Polymerase Chain Reaction

Pour effectuer la réaction de PCR, 5 μL de produit de ligation a été ajouté à 35 μL d'un mix de PCR : 20 μL de Eurogentec Red'y'Start Mix (Eurogentec, Angers, France), 1 μl de primer U1 biotinyté à 10 μM , 1 μl de primer U2 à 10 μM , 13 μl d'eau RNase-free. L'amplification a été réalisée selon le programme suivant : 6 min 94°C; 35 cycles (30 sec 94°C, 30 sec 58°C, 30 sec 72°C; 4 min 72°C) 4 min 72 °C; maintien à 16°C.

4. Visualisation de l'amplification

Pour visualiser les échantillons dans lesquels une amplification s'était produite, une électrophorèse sur gel d'acrylamide à 8 % (Biosolve B.V., Valkenswaard, Netherlands) a été effectuée. Après bain du gel dans une solution de GelRed (Biotum, Delhi, India), les échantillons positifs étaient caractérisés par la présence d'une bande fluorescente. Un exemple de gel est présenté dans la figure 11.

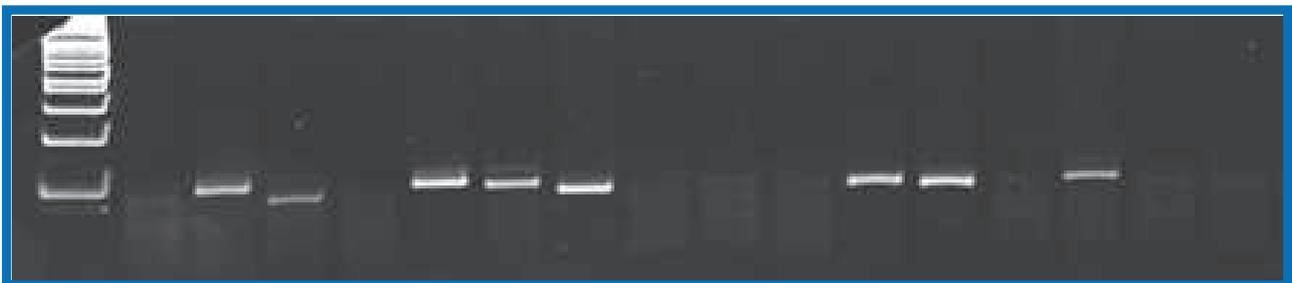


Figure 11. Exemple de gel montrant des échantillons positifs et négatifs par la technique TCTM

Sur ce gel, 8 échantillons sont positifs et 8 sont négatifs.

5. Pyroséquençage

Pour identifier les transcrits de fusion dans des échantillons positifs, un pyroséquençage des sondes amplifiées a été réalisé sur PyroMark Q24 (Qiagen, Maryland, Germany) selon les recommandations du fabricant. Préalablement au séquençage, une étape de capture des sondes de MLPA ayant subi une amplification a été réalisée à l'aide de bille de sépharose "coatées" par de la streptavidine et d'un système de filtre utilisant une pompe à vide. Après lavage et dénaturation de l'ADN des sondes, celui-ci a été placé sur une plaque contenant le primer de séquençage. La plaque a été ensuite introduite dans le pyroséquenceur. L'analyse des résultats a été effectuée à l'aide du logiciel PyroMark Q24MDx (Qiagen, Maryland, Germany). Des exemples de pyrogrammes obtenus sont présentés dans la figure 12.

IV – Résultats

1. Caractéristiques des patients

Les caractéristiques des 223 patients sont résumées dans le tableau 4. Tous les types morphologiques de la classification FAB ainsi que toutes les anomalies cytogénétiques définissant les LAM avec anomalies génétiques récurrentes selon la classification OMS de 2008 étaient représentés (à l'exception de la t(1;22)(p13;q13) n'ayant jamais été décrite chez l'adulte).

Caracteristiques (223 patients)	Nombre	(%)
Age		
Moyen (années)	58.8	
18-59 ans	100	44.8
≥ 60 ans	123	55.2
FAB		
M0	7	3.1
M1	40	17.9
M2	61	27.4
M3	27	12.1
M4	41	18.4
M5	22	9.9
M6	13	5.8
M7	6	2.7
NC	6	2.7
Caryotype		
Normal	83	37.1
t(8;21)(q22;q22)	8	4.0
inv(16)/t(16;16)(p13.1;q22)	15	6.7
t(15;17)(q22;q12)	23	10.3
t(11;17)(q23;q12)	2	0.9
t(9;11)(p23;q23)	2	0.9
t(6;11)(q36;q23)	1	0.4
t(11;19)(q23;p13)	1	0.4
t(6;9)(p22;q34)	1	0.4
t(9;22)(q34;q11)	1	0.4
t(8;16)(p11;p13)	1	0.4
t(10;11)(p14;q21)	1	0.4
inv(3)(q21;q26)	1	0.4
Complexe (≥ 3 anomalies)	35	15.6
del(5q)	4	1.8
-7	3	1.3
Anomalie 17p	3	1.3
Autres anomalies	27	12.1
N/A	4	1.8

Tableau 4. Caractéristiques des patients

Abréviations : NC, non classable ; N/A : non disponible.

2. Transcrits de fusion détectés dans la série

Parmi les 223 patients, un transcrit de fusion a été détecté dans 63 cas (28%) avec les techniques classiques (caryotype, FISH ou RT-PCR) et/ou avec le kit TCTM. Tous les transcrits détectés uniquement avec le kit TCTM ont été validés *a posteriori* par RT-PCR et/ou par FISH. Les résultats sont résumés dans le tableau 5 (page 41).

2.1. Transcrits fréquents

2.1.1. *RUNX1-RUNX1T1*

Dans la série, 9 patients (4%) présentaient une LAM avec t(8;21)(q22;q22); *RUNX1-RUNX1T1*. Dans un cas, la translocation était cryptique et la morphologie des blastes non évocatrice. Les techniques classiques ont permis la détection du transcrit de fusion dans les 8 cas (3.6%) où la translocation n'était pas cryptique. La technique TCTM a permis d'identifier le transcrit dans l'ensemble des 9 cas (4%).

2.1.2. CFBF-MYH11

15 patients (6.7%) avaient une LAM avec $\text{inv}(16)/\text{t}(16;16)(\text{p}13.1;\text{q}22)$; *CBFB-MYH1*. Trois types de transcrits : A (80%), D (13%) et E (7%) ont été identifiés. La concordance entre la technique TCTM et les techniques classiques pour la détection de ces anomalies était de 100%.

2.1.3. PML-RARA et variants

24 patients (10.8%) présentaient une LAM3 avec $\text{t}(15;17)(\text{q}22;\text{q}12)$; *PML-RARA*. Le transcrit de fusion était détecté par les deux approches dans les 22 cas (9.9%) où les transcrits *bcr1* ou *bcr3* étaient présents. Un cas (0.4%) présentait le transcrit *bcr2* dont la recherche n'est pas incluse dans le kit TCTM. Pour le dernier cas (0.4%), la translocation n'a pas été détectée par les techniques de cytogénétique conventionnelle et moléculaire. La recherche du transcrit était faiblement positive en biologie moléculaire et la blastose médullaire n'était que de 6%.

La translocation variante *ZBTB16(PLZF)-RARA* était présente dans 2 cas (0.9%) de LAM3 avec $\text{t}(11;17)(\text{q}23;\text{q}12)$. Elle a été identifiée conjointement par le kit TCTM et les techniques classiques dans les 2 cas.

2.1.4. *MLL-X*

Une translocation impliquant le gène *MLL*, détectée au caryotype et/ou par FISH, était présente dans 7 cas (3.1%). Les partenaires étaient *MLLT3(AF9)* dans 2 cas (0.9%), *MLLT4(AF6)* dans 2 cas (0.9%), *MLLT10(AF10)* dans 1 cas (0.4%), *ENL* dans 1 cas (0.4%). Le partenaire n'a pas pu être identifié dans un cas (0.4%) de LAM5 avec t(11;17)(q23;q12).

L'approche classique a permis de détecter la translocation dans 5 cas (2.2%). Dans les deux autres cas, l'un avec une t(10;11); *MLL-MLLT10(AF10)* et l'autre avec une t(6;11); *MLL-MLLT4(AF6)*, les caryotypes étaient normaux et il n'avait pas été effectué de recherche complémentaire au moment du diagnostic. La réalisation d'une FISH *MLL* aurait probablement permis de les identifier.

Le kit TCTM a permis d'identifier la translocation dans 6 (2.7%) des 7 cas. Le cas qui n'a pas été détecté est le cas de LAM5 avec t(11;17)(q23;q12) dont le partenaire n'a pas pu être identifié. La recherche du transcrit *MLL-RARA*, effectuée par RT-PCR, était négative. Le gène impliqué est très probablement un partenaire rare de *MLL*.

Transcrit de fusion	Nombre de patients	Caryotype	FISH	RT-PCR	TCTM
<i>RUNX1-RUNX1T1</i>	9 (4.0%)	8 (3.6%)	-	8 (3.6%)	9 (4.0%)
Cyptique	1 (0.4%)	0	0*	0*	1 (0.4%)
<i>CBFB-MYH11</i>	15 (6.7%)	15 (6.7%)	-	15 (6.7%)	15 (6.7%)
Type A	12 (5.4%)	12 (5.4%)	-	12 (5.4%)	12 (5.4%)
Type D	2 (0.9%)	2 (0.9%)	-	2 (0.9%)	2 (0.9%)
Type E	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)	1 (0.4%)
<i>PML-RARA</i>	24 (10.8%)	23 (10.3%)	-	24 (10.8%)	22 (9.9%)
Bcr1	10 (4.5%)	10 (4.5%)	-	10 (4.5%)	10 (4.5%)
Bcr3	12 (5.4%)	12 (5.4%)	-	12 (5.4%)	12 (5.4%)
Bcr2	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)	0
N/A	1 (0.4%)	0	échec	faible	0
<i>ZBTB16(PLZF)-RARA</i>	2 (0.9%)	2 (0.9%)	-	2 (0.9%)	2 (0.9%)
<i>MLL-X</i>	7 (3.1%)	5 (2.2%)	5 (2.2%)	-	6 (2.7%)
<i>MLLT3(AF9)</i>	2 (0.9%)	2 (0.9%)	2 (0.9%)	-	2 (0.9%)
<i>MLLT4(AF6)</i>	2 (0.9%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	0*	2 (0.9%)
<i>MLLT10(AF10)</i> (cryptique)	1 (0.4%)	0	0*	0*	1 (0.4%)
<i>ENL</i>	1 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)
N/A	1 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	0	0
<i>DEK-NUP214</i>	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)	1 (0.4%)
<i>NUP98-NSD1</i> (cryptique)	2 (0.9%)	0	0	0*	2 (0.9%)
<i>CALM-MLLT10</i> (<i>PICALM-AF10</i>)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	0**	0*	1 (0.4%)
<i>BCR-ABL1</i> (b3a2)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)	1 (0.4%)
<i>MOZ-CBP</i>	1 (0.4%)	1 (0.4%)	1 (0.4%)	-	1 (0.4%)

Tableau 5. Transcrits de fusions détectés dans la série et nombre de transcrits de fusion détectés par les techniques classiques (caryotype, FISH et RT-PCR) et la technique TCTM

* Validés par FISH et/ou RT-PCR après les résultats de TCTM.

** Recherches arrêtées après négativité du split de la sonde de FISH *MLL*.

Abréviations : N/A, non disponible.

2.2. Transcrits rares

2.2.1. DEK-NUP214

Le transcrit *DEK-NUP214* était présent dans un cas (0.4%) de LAM avec t(6;9) (p22;q34). Les deux approches ont permis l'identification de ce transcrit.

2.2.2. CALM-MLLT10 (PICALM-AF10)

Un cas (0.4%) de LAM exprimant le transcrit *CALM-MLLT10 (PICALM-AF10)* a été détecté dans la série. Une translocation t(10;11) (p14;q21) avait été observée au moment du diagnostic sur le caryotype. Une fusion impliquant *MLL* avait été suspectée mais la FISH était négative et il n'y a pas eu de recherche complémentaire. Cette fusion a été détectée par le kit TCTM et a été validée par RT-PCR.

2.2.3. NUP98-NSD1

Le transcrit *NUP98-NSD1*, issu de la translocation cryptique t(5;11)(q35;p15.5), rare chez l'adulte (Hollink et al., 2011), a été identifié dans 2 cas (0.9%) grâce à la technique TCTM et validé par RT-PCR. Cette translocation n'est pas recherchée en routine.

2.2.4. BCR-ABL1

Un cas (0.4%) présentant le transcrit *BCR-ABL1* dans une LAM avec t(9;22)(q34;q11) était présent dans la série. Les techniques classiques et TCTM ont toutes deux permis de l'identifier.

2.2.5. MOZ-CBP

Le transcrit *MOZ-CBP* a été détecté par les deux approches dans un cas (0.4%) de LAM5 avec t(8;16)(p11;p13).

3. Mutations détectées par le kit TCTM

Le kit TCTM, dans sa version 2, a été conçu pour de détecter les duplications partielles en tandem de *MLL* (*MLL*-PTD) ainsi que les deux principales mutations de NPM1 (type A et type B, > 90% des cas). Les résultats obtenus dans la série sont présentés ci-dessous. Il s'agit dans ce cas d'une étude préliminaire dont les résultats sont présentés ici à titre indicatif.

3.1. *MLL*-PTD

10 cas (4.5%) de LAM avec *MLL*-PTD ont été mis en évidence chez les 223 patients grâce à la technique TCTM. Tous les échantillons positifs ont été vérifiés par RT-PCR. Cette mutation n'étant pas recherchée en routine, les autres cas de la série n'ont pas été testés pour cette mutation au diagnostic. La présence de faux négatifs ne peut donc pas être exclue ici. La fréquence dans la série est similaire à celle retrouvée dans deux grandes séries de LAM adultes de la littérature : 5.8% dans une série de 1881 patients (Bacher et al., 2005; technique de PCR génomique XL) et 5% dans une série de 956 patients (Studel et al., 2003; techniques de RT-PCR et de Southern Blot).

3.2. mutations de *NPM1* de type A et B

44 cas (19.7%) de LAM avec mutation de *NPM1* de type A ou B ont été mis en évidence grâce à la technique TCTM. Tous les échantillons positifs ont été vérifiés par RT-PCR et séquençage Sanger. Là encore, la présence de faux négatifs ne peut être exclue car la mutation n'est pas systématiquement recherchée en routine. Parmi les 25 cas de mutation détectées au diagnostic par l'approche classique, le kit TCTM n'a pas permis d'identifier un cas (0.4%) de mutation de classe A (faux négatif) et un cas de mutation de classe J, dont la recherche n'est pas incluse dans le kit. Parmi les 83 cas de LAM à caryotype normal de la série, la mutation a été détectée avec le kit TCTM dans 38 cas soit 45.8%. En estimant que les types A et B représentent 90% des cas de mutation de *NPM1*, la fréquence des mutations de *NPM1* dans les LAM à caryotype normal de la série est d'environ 50%, ce qui est comparable à celle décrite dans la littérature (45-64%; Marcucci et al., 2011).

V – Discussion

La technique TCTM, basée sur la RT-MLPA, représente un outil intéressant pour un laboratoire hospitalier de génétique oncologique effectuant des examens de biologie dans les LAM.

Tout d'abord, sa grande capacité de multiplexage permet un « *screening* » efficace des principaux transcrits de fusion rencontrés dans les LAM. La technique peut d'ailleurs être appliquée à d'autres pathologies caractérisées par des transcrits de fusion non étudiés ici.

Ensuite, elle présente une spécificité et une sensibilité remarquables. Aucun faux positif n'a été identifié. Un seul faux négatif parmi les 63 transcrits de fusion détectés a été mis en évidence. Dans ce cas précis, la blastose n'était que de 6 % mais la morphologie des blastes était typique d'une LAM3. Seule une technique très sensible de RT-qPCR a permis de mettre en évidence le transcrit

Deux des 63 transcrits de fusion présents dans la série n'ont pas été détectés parce que le kit n'était pas prévu à cet effet. L'un d'entre eux, un transcrit *PML-RARA* bcr2, a la particularité de posséder un point de cassure variable dans l'exon 6 du gène *PML*. Il n'est par conséquent pas détectable par la technique TCTM. Cependant, ce type de transcrit est rare (5% des cas). Il peut en outre être identifié « par défaut » dans les cas de LAM3 avec t(15;17) pour lesquels un transcrit de type bcr1 ou bcr3 n'a pas été mis en évidence. Le second est un transcrit de fusion éventuel impliquant le gène

MLL et un partenaire non identifié en 17q12. Le kit inclut la recherche des 30 partenaires les plus fréquents de *MLL* sur les 80 décrits, et peut difficilement être exhaustif. Toutefois, il a détecté 6 fusions de *MLL* sur les 7 présentes, permettant ainsi d'éviter autant de FISH *MLL*. On peut également s'affranchir de cette technique dans les cas où la TCTM parvient à détecter des *MLL*-PTD, puisque cette anomalie ne coexiste en principe pas avec une translocation impliquant ce gène. Dix réactions de FISH *MLL* supplémentaires seraient ainsi économisées pour cette série, soit 16 au total. A titre informatif, un examen par FISH coûte environ 200 €.

La technique TCTM est une technique peu onéreuse. Le coût en réactifs est d'environ 5 € par échantillon. Sa mise en œuvre est simple et ne nécessite que des appareils courants dans un laboratoire classique de génétique moléculaire, à l'exception du pyroséquenceur.

Un autre avantage majeur de cette méthode d'analyse réside dans la détection des translocations cryptiques. Par exemple, une translocation $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1* cryptique a été mise en évidence par le kit TCTM, ce qui n'avait pas été possible par l'approche habituelle. Dans ce type de cas, de bon pronostic, on évite au patient un traitement intensif d'emblée. Pour obtenir un résultat similaire par l'approche habituelle, il faudrait systématiquement rechercher le transcrit par RT-PCR dans toutes les LAM2, qui sont les LAM les plus fréquentes. En effet, la morphologie des blastes n'est pas toujours typique et ne permet donc pas d'orienter systématiquement la recherche.

La détection des deux cas de translocations cryptiques $t(5;11)(q35;p15.5); NUP98-NSDI$ est également un bon exemple de l'utilité du kit TCTM. En effet, la présence de ce transcrit, rare chez l'adulte, semble être associée à un mauvais pronostic (Hollink et al., 2011; Ostronoff et al., 2014) .

La rapidité d'exécution est également un atout important de cette technique, qui est réalisée en moins d'une journée. En incluant 24 heures supplémentaires pour l'extraction de l'ARN, deux jours au total sont nécessaires pour obtenir les résultats. Avec les techniques classiques, ce même délai de deux jours est utilisé pour la réalisation du caryotype seul (qui inclut une étape de culture de 18-24 heures). La technique TCTM peut être réalisée parallèlement au caryotype et renseigner sur la présence d'un transcrit de fusion pendant sa réalisation. Son intégration dans la démarche actuelle paraît donc optimale.

De plus, en une étape, elle permet d'identifier le type de transcrit dans les cas de remaniements tels que les $inv(16)/t(16;16)(p13.1;q22); CBF\beta-MYH11$, pour lesquels il existe au moins 10 variants (type A à J). Ce typage nécessite habituellement de tester « à l'aveugle » par RT-PCR ou qRT-PCR chaque possibilité, et d'avoir éventuellement recours à des mélanges complexes de primers de PCR, ou bien par séquençage de la fusion. Cette information sur le type de transcrit est rendue nécessaire dans la prise en charge des LAM parce qu'elle permet le suivi moléculaire de la maladie résiduelle.

En outre, les kits TCTM sont très largement modulables. Des sondes détectant des transcrits de fusion d'intérêt particulier ou nouvellement décrits peuvent y être ajoutées facilement, après une simple commande d'oligonucléotides sans modification particulière.

L'ensemble de ces données démontre l'intérêt majeur de la technique TCTM parmi les outils de génétique utilisés actuellement lors de l'évaluation diagnostique des LAM. Le schéma présenté dans la figure 13 intègre cette technique à la démarche de diagnostic biologique classiquement effectuée.

Enfin, l'utilisation du kit TCTM en routine ne s'envisage pas sans le développement d'outils de « contrôle qualité ». Des témoins positifs, permettant de dépister les faux négatifs, s'avèrent particulièrement nécessaires avec cette technique. Il est cependant impossible de contrôler l'ensemble des transcrits recherchés à chaque manipulation, étant donné leur nombre très important. Une solution serait de valider la détection de chacun des transcrits à chaque nouvelle fabrication d'un kit, et définir une durée limite d'utilisation. De ce fait un seul témoin positif, éventuellement aléatoire, serait nécessaire par manipulation.

Au terme de ce travail, le kit TCTM apparaît très prometteur et mérite d'être intégré comme outil diagnostique de routine.

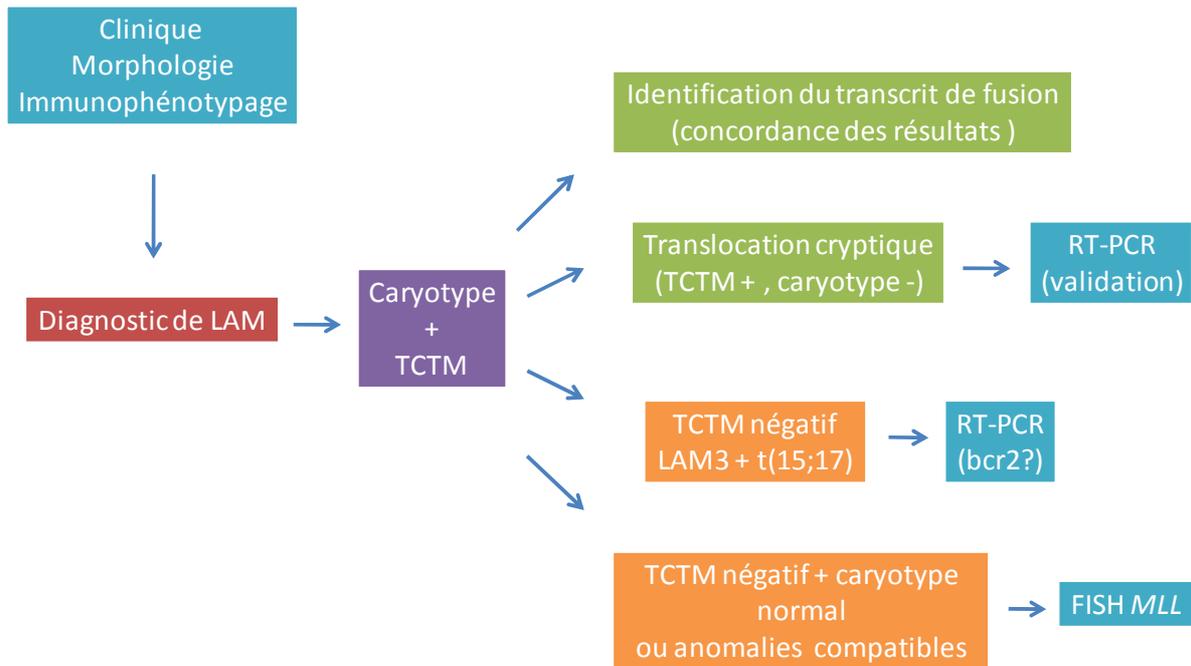


Figure 13. Schéma intégrant la technique TCTM parmi les analyses classiques de génétique dans l'évaluation diagnostique des LAM

Références bibliographiques

Alexandrov, L.B., Nik-Zainal, S., Wedge, D.C., Aparicio, S.A.J.R., Behjati, S., Biankin, A.V., Bignell, G.R., Bolli, N., Borg, A., Børresen-Dale, A.-L., et al. (2013). Signatures of mutational processes in human cancer. *Nature* 500, 415–421.

Bacher, U., Kern, W., Schnittger, S., Hiddemann, W., Haferlach, T., and Schoch, C. (2005). Population-based age-specific incidences of cytogenetic subgroups of acute myeloid leukemia. *Haematologica* 90, 1502–1510.

Döhner, H., Estey, E.H., Amadori, S., Appelbaum, F.R., Buchner, T., Burnett, A.K., Dombret, H., Fenaux, P., Grimwade, D., Larson, R.A., et al. (2010). Diagnosis and management of acute myeloid leukemia in adults: recommendations from an international expert panel, on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 115, 453–474.

Gatta, G., van der Zwan, J.M., Casali, P.G., Siesling, S., Dei Tos, A.P., Kunkler, I., Otter, R., Licitra, L., Mallone, S., Tavilla, A., et al. (2011). Rare cancers are not so rare: The rare cancer burden in Europe. *Eur. J. Cancer* 47, 2493–2511.

Hollink, I.H.I.M., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Arentsen-Peters, S.T.C.J.M., Pratcorona, M., Abbas, S., Kuipers, J.E., van Galen, J.F., Beverloo, H.B., Sonneveld, E., Kaspers, G.-J.J.L., et al. (2011). NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood* 118, 3645–3656.

Jaffe, E.S., and World Health Organization (2001). Pathology and genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Lyon; Oxford: IARC Press; Oxford University Press).

Marcucci, G., Haferlach, T., and Dohner, H. (2011). Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *J. Clin. Oncol.* 29, 475–486.

Meyer, C., Hofmann, J., Burmeister, T., Gröger, D., Park, T.S., Emerenciano, M., Pombo de Oliveira, M., Renneville, A., Villarese, P., Macintyre, E., et al. (2013). The MLL recombinome of acute leukemias in 2013. *Leukemia* 27, 2165–2176.

Monnereau A., Remontet L., Maynadié M., Binder-Foucard F., Belot A., Troussard X., and Bossard N. (2013). Estimation nationale de l'incidence des cancers en France entre 1980 et 2012. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim Partie 2 – Hémopathies malignes.

Mrozek, K., Marcucci, G., Nicolet, D., Maharry, K.S., Becker, H., Whitman, S.P., Metzeler, K.H., Schwind, S., Wu, Y.-Z., Kohlschmidt, J., et al. (2012). Prognostic Significance of the European LeukemiaNet Standardized System for Reporting Cytogenetic and Molecular Alterations in Adults With Acute Myeloid Leukemia. *J. Clin. Oncol.* 30, 4515–4523.

National Comprehensive Cancer Network (2014). NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. Acute myeloid leukemia. V. 2.2014.

Ostronoff, F., Othus, M., Gerbing, R.B., Loken, M.R., Raimondi, S.C., Hirsch, B.A., Lange, B.J., Petersdorf, S., Radich, J., Appelbaum, F.R., et al. (2014). Co-expression of NUP98/NSD1 and FLT3/ITD is more prevalent in younger AML patients and leads to high-risk of induction failure: a COG and SWOG report. *Blood*.

Sanz, M.A., Grimwade, D., Tallman, M.S., Lowenberg, B., Fenaux, P., Estey, E.H., Naoe, T., Lengfelder, E., Buchner, T., Dohner, H., et al. (2009). Management of acute promyelocytic leukemia: recommendations from an expert panel on behalf of the European LeukemiaNet. *Blood* 113, 1875–1891.

Studel, C., Wermke, M., Schaich, M., Schäkel, U., Illmer, T., Ehninger, G., and Thiede, C. (2003). Comparative analysis of MLL partial tandem duplication and FLT3 internal tandem duplication mutations in 956 adult patients with acute myeloid leukemia. *Genes. Chromosomes Cancer* 37, 237–251.

Swerdlow, S.H., International Agency for Research on Cancer, and World Health Organization (2008). WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues (Lyon, France: International Agency for Research on Cancer).

The Cancer Genome Atlas Research Network (2013). Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia. *N. Engl. J. Med.* 368, 2059–2074.

SERMENT DE GALIEN

Je jure d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.

D'exercer dans l'intérêt de la Santé publique ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur mais aussi les règles de l'Honneur, de la Probité et du Désintéressement.

De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine.

De ne dévoiler à personne les secrets qui m'auraient été confiés ou dont j'aurais eu connaissance dans l'exercice de ma Profession.

En aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser les actes criminels.

Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.

Que je sois méprisé de mes Confrères si je manque à mes engagements.



LARSON Thomas

Analyse moléculaire par une technique innovante de plus de cinquante translocations récurrentes dans les leucémies aiguës myéloïdes de l'adulte. Etude rétrospective de deux cent vingt-trois cas pris en charge au Centre Henri Becquerel de Rouen entre 2008 et 2013.

Th. D. Pharm., Rouen, 2014, p.53

La recherche des anomalies génétiques dans les cellules tumorales fait désormais partie intégrante des examens biologiques effectués lors de l'évaluation diagnostique des leucémies aiguës myéloïdes (LAM). L'étude des remaniements chromosomiques produisant des gènes de fusion fournit en outre l'un des éléments pronostiques actuellement les plus pertinents. Une technique innovante de *screening* des transcrits de fusion, appelée TCTM, a été développée récemment au Centre Henri Becquerel de Rouen. L'objectif de ce travail était d'évaluer ses performances dans les LAM de l'adulte.

Une série rétrospective de 223 patients adultes atteints de LAM pris en charge au Centre Henri Becquerel entre 2008 et 2013 a été constituée pour cette étude. Les échantillons de moelle et/ou de sang de tous les patients ont été analysés avec un kit basé sur la technique TCTM permettant la recherche simultanée de plus de 400 transcrits de fusion issus de 58 translocations.

Un transcrit de fusion a été identifié chez 63 patients (28%) de la série. 60 transcrits ont été détectés avec la technique TCTM contre 57 avec l'approche classique. Un seul faux négatif a été observé dans un cas où la blastose médullaire n'était que de 6%. En revanche, la technique TCTM a permis d'identifier 4 translocations cryptiques qui n'avaient pas été mises en évidence lors du diagnostic, dont une $t(8;21)(q22;q22)$; *RUNX1-RUNX1T1* qui présente un impact pronostique et thérapeutique majeur.

De par sa capacité à détecter les remaniements chromosomiques cryptiques et rares, la technique TCTM se révèle utile en complément des techniques classiques.

MOTS CLES : Leucémie aiguë myéloïde – Génétique – Transcrit de fusion – TCTM

JURY

Président : Mme DUBUS Isabelle, PU

Membres : Mr BASTARD Christian, PH

Mr JARDIN Fabrice, PU-PH

Mr BUCHONNET Gérard, MCU-PH

DATE DE SOUTENANCE : 11 septembre 2014