HAL
open science

Détermination de la fraction mutée de NPM1 par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes

Arbab Ahmadreza

To cite this version:

Arbab Ahmadreza. Détermination de la fraction mutée de NPM1 par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes. Médecine humaine et pathologie. 2018. dumas-01896439

HAL Id: dumas-01896439

https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01896439

Submitted on 16 Oct 2018

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.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes
BIBLIOTHÈQUES UNIVERSITAIRES Grenoble Alpes

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il n'a pas été réévalué depuis la date de soutenance.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact au SID de Grenoble :
bump-theses@univ-grenoble-alpes.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/juridique/droit-auteur
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

UFR DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Année : 2018

DETERMINATION DE LA FRACTION MUTEE DE NPM1 PAR PCR DIGITALE DANS LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES

THÈSE
PRÉSENTÉE POUR L'OBTENTION DU TITRE DE DOCTEUR EN MÉDECINE

DIPLÔME D'ÉTAT

Ahmadreza ARBAB

[Données à caractère personnel]

THÈSE SOUTENUE PUBLIQUEMENT À LA FACULTÉ DE MÉDECINE DE GRENOBLE

Le : 12/10/2018

DEVANT LE JURY COMPOSÉ DE

Président du jury :

M. le Professeur Pascal MOSSUZ (directeur de thèse)

Membres :

Mme la Docteure Christine LEFEBVRE

Mme la Professeure Sophie PARK

Mme la Docteure Marie BIDART

Mme la Docteure Sylvie TONDEUR

L'UFR de Médecine de Grenoble n'entend donner aucune approbation ni improbation aux opinions émises dans les thèses ; ces opinions sont considérées comme propres à leurs auteurs.

UFR de Médecine
UNIVERSITÉ Grenoble Alpes

Doyen de la Faculté : **Pr. Patrice MORAND**

Année 2017-2018

ENSEIGNANTS A L'UFR DE MEDECINE

CORPS	NOM-PRENOM	Discipline universitaire
PU-PH	ALBALADEJO Pierre	Anesthésiologie réanimation
PU-PH	APTEL Florent	Ophtalmologie
PU-PH	ARVIEUX-BARTHELEMY Catherine	Chirurgie générale
PU-PH	BAILLET Athan	Rhumatologie
PU-PH	BARONE-ROCHETTE Gilles	Cardiologie
PU-PH	BAYAT Sam	Physiologie
PU-PH	BENHAMOU Pierre Yves	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BERGER François	Biologie cellulaire
MCU-PH	BIDART-COUTTON Marie	Biologie cellulaire
MCU-PH	BOISSET Sandrine	Agents infectieux
PU-PH	BONAZ Bruno	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	BONNETERRE Vincent	Médecine et santé au travail
PU-PH	BOREL Anne-Laure	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	BOSSON Jean-Luc	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	BOTTARI Serge	Biologie cellulaire
PU-PH	BOUGEROL Thierry	Psychiatrie d'adultes
PU-PH	BOUILLET Laurence	Médecine interne
PU-PH	BOUZAT Pierre	Réanimation
MCU-PH	BRENIER-PINCHART Marie Pierre	Parasitologie et mycologie
PU-PH	BRICAULT Ivan	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	BRICHON Pierre-Yves	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
MCU-PH	BRIOT Raphaël	Thérapeutique, médecine d'urgence
MCU-PH	BROUILLET Sophie	Biologie et médecine du développement et de la reproduction
PU-PH	CAHN Jean-Yves	Hématologie
PU-PH	CARPENTIER Françoise	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	CARPENTIER Patrick	Chirurgie vasculaire, médecine vasculaire
PU-PH	CESBRON Jean-Yves	Immunologie
PU-PH	CHABARDES Stephan	Neurochirurgie
PU-PH	CHABRE Olivier	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
PU-PH	CHAFFANJON Philippe	Anatomie
PU-PH	CHARLES Julie	Dermatologie
PU-PH	CHAVANON Olivier	Chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
PU-PH	CHIQUET Christophe	Ophtalmologie

PU-PH	CHIRICA Mircea	Chirurgie générale
PU-PH	CINQUIN Philippe	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	CLAVARINO Giovanna	Immunologie
PU-PH	COHEN Olivier	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	COURVOISIER Aurélien	Chirurgie infantile
PU-PH	COUTURIER Pascal	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	CRACOWSKI Jean-Luc	Pharmacologie fondamentale, pharmacologie clinique
PU-PH	CURE Hervé	Oncologie
PU-PH	DEBILLON Thierry	Pédiatrie
PU-PH	DECAENS Thomas	Gastro-entérologie, Hépatologie
PU-PH	DEMATTEIS Maurice	Addictologie
MCU-PH	DERANSART Colin	Physiologie
PU-PH	DESCOTES Jean-Luc	Urologie
MCU-PH	DETANTE Olivier	Neurologie
MCU-PH	DIETERICH Klaus	Génétique et procréation
MCU-PH	DOUTRELEAU Stéphane	Physiologie
MCU-PH	DUMESTRE-PERARD Chantal	Immunologie
PU-PH	EPAULARD Olivier	Maladies Infectieuses et Tropicales
PU-PH	ESTEVE François	Biophysique et médecine nucléaire
MCU-PH	EYSSERIC Hélène	Médecine légale et droit de la santé
PU-PH	FAGRET Daniel	Biophysique et médecine nucléaire
PU-PH	FAUCHERON Jean-Luc	Chirurgie générale
MCU-PH	FAURE Julien	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	FERRETTI Gilbert	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	FEUERSTEIN Claude	Physiologie
PU-PH	FONTAINE Éric	Nutrition
PU-PH	FRANCOIS Patrice	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-MG	GABOREAU Yoann	Médecine Générale
PU-PH	GARBAN Frédéric	Hématologie, transfusion
PU-PH	GAUDIN Philippe	Rhumatologie
PU-PH	GAVAZZI Gaétan	Gériatrie et biologie du vieillissement
PU-PH	GAY Emmanuel	Neurochirurgie
MCU-PH	GILLOIS Pierre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
MCU-PH	GRAND Sylvie	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	GRIFFET Jacques	Chirurgie infantile
PU-PH	GUEBRE-EGZIABHER Fitsum	Néphrologie
MCU-PH	GUZUN Rita	Endocrinologie, diabétologie, nutrition, éducation thérapeutique
PU-PH	HAINAUT Pierre	Biochimie, biologie moléculaire
PU-PH	HENNEBICQ Sylviane	Génétique et procréation
PU-PH	HOFFMANN Pascale	Gynécologie obstétrique
PU-PH	HOMMEL Marc	Neurologie
PU-MG	IMBERT Patrick	Médecine Générale
PU-PH	JOUK Pierre-Simon	Génétique
PU-PH	JUVIN Robert	Rhumatologie

PU-PH	KAHANE Philippe	Physiologie
MCU-PH	KASTLER Adrian	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	KRACK Paul	Neurologie
PU-PH	KRAINIK Alexandre	Radiologie et imagerie médicale
PU-PH	LABARERE José	Epidémiologie ; Eco. de la Santé
MCU-PH	LABLANCHE Sandrine	Endocrinologie, diabète et maladies métaboliques
MCU-PH	LANDELLE Caroline	Bactériologie - virologie
MCU-PH	LAPORTE François	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARDY Bernard	Biochimie et biologie moléculaire
MCU-PH	LARRAT Sylvie	Bactériologie, virologie
MCU - PH	LE PISSART Audrey	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	LECCIA Marie-Thérèse	Dermato-vénéréologie
PU-PH	LEROUX Dominique	Génétique
PU-PH	LEROY Vincent	Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie
PU-PH	LEVY Patrick	Physiologie
PU-PH	LONG Jean-Alexandre	Urologie
PU-PH	MAGNE Jean-Luc	Chirurgie vasculaire
MCU-PH	MAIGNAN Maxime	Thérapeutique, médecine d'urgence
PU-PH	MAITRE Anne	Médecine et santé au travail
MCU-PH	MALLARET Marie-Reine	Epidémiologie, économie de la santé et prévention
MCU-PH	MARLU Raphaël	Hématologie, transfusion
MCU-PH	MAUBON Danièle	Parasitologie et mycologie
PU-PH	MAURIN Max	Bactériologie - virologie
MCU-PH	MC LEER Anne	Cytologie et histologie
PU-PH	MERLOZ Philippe	Chirurgie orthopédique et traumatologie
PU-PH	MORAND Patrice	Bactériologie - virologie
PU-PH	MOREAU-GAUDRY Alexandre	Biostatistiques, informatique médicale et technologies de communication
PU-PH	MORO Elena	Neurologie
PU-PH	MORO-SIBILOT Denis	Pneumologie
PU-PH	MOUSSEAU Mireille	Cancérologie
PU-PH	MOUTET François	Chirurgie plastique, reconstructrice et esthétique ; brûlologie
MCU-PH	PACLET Marie-Hélène	Biochimie et biologie moléculaire
PU-PH	PALOMBI Olivier	Anatomie
PU-PH	PARK Sophie	Hémato - transfusion
PU-PH	PASSAGGIA Jean-Guy	Anatomie
PU-PH	PAYEN DE LA GARANDERIE Jean-François	Anesthésiologie réanimation
MCU-PH	PAYSANT François	Médecine légale et droit de la santé
MCU-PH	PELLETIER Laurent	Biologie cellulaire
PU-PH	PELLOUX Hervé	Parasitologie et mycologie
PU-PH	PEPIN Jean-Louis	Physiologie
PU-PH	PERENNOU Dominique	Médecine physique et de réadaptation
PU-PH	PERNOD Gilles	Médecine vasculaire
PU-PH	PIOLAT Christian	Chirurgie infantile
PU-PH	PISON Christophe	Pneumologie

PU-PH	**PLANTAZ Dominique**	**Pédiatrie**
PU-PH	**POIGNARD Pascal**	**Virologie**
PU-PH	**POLACK Benoît**	**Hématologie**
PU-PH	**POLOSAN Mircea**	**Psychiatrie d'adultes**
PU-PH	**PONS Jean-Claude**	**Gynécologie obstétrique**
PU-PH	**RAMBEAUD Jacques**	**Urologie**
PU-PH	**RAY Pierre**	**Biologie et médecine du développement et de la reproduction**
PU-PH	**REYT Émile**	**Oto-rhino-laryngologie**
PU-PH	**RIGHINI Christian**	**Oto-rhino-laryngologie**
PU-PH	**ROMANET Jean Paul**	**Ophtalmologie**
PU-PH	**ROSTAING Lionel**	**Néphrologie**
MCU-PH	**ROUSTIT Matthieu**	**Pharmacologie fondamentale, pharmaco clinique, addictologie**
MCU-PH	**ROUX-BUISSON Nathalie**	**Biochimie, toxicologie et pharmacologie**
MCU-PH	**RUBIO Amandine**	**Pédiatrie**
PU-PH	**SARAGAGLIA Dominique**	**Chirurgie orthopédique et traumatologie**
MCU-PH	**SATRE Véronique**	**Génétique**
PU-PH	**SAUDOU Frédéric**	**Biologie Cellulaire**
PU-PH	**SCHMERBER Sébastien**	**Oto-rhino-laryngologie**
PU-PH	**SCHWEBEL-CANALI Carole**	**Réanimation médicale**
PU-PH	**SCOLAN Virginie**	**Médecine légale et droit de la santé**
MCU-PH	**SEIGNEURIN Arnaud**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
PU-PH	**STAHL Jean-Paul**	**Maladies infectieuses, maladies tropicales**
PU-PH	**STANKE Françoise**	**Pharmacologie fondamentale**
MCU-PH	**STASIA Marie-José**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**STURM Nathalie**	**Anatomie et cytologie pathologiques**
PU-PH	**TAMISIER Renaud**	**Physiologie**
PU-PH	**TERZI Nicolas**	**Réanimation**
MCU-PH	**TOFFART Anne-Claire**	**Pneumologie**
PU-PH	**TONETTI Jérôme**	**Chirurgie orthopédique et traumatologie**
PU-PH	**TOUSSAINT Bertrand**	**Biochimie et biologie moléculaire**
PU-PH	**VANZETTO Gérald**	**Cardiologie**
PU-PH	**VUILLEZ Jean-Philippe**	**Biophysique et médecine nucléaire**
PU-PH	**WEIL Georges**	**Epidémiologie, économie de la santé et prévention**
PU-PH	**ZAOUI Philippe**	**Néphrologie**
PU-PH	**ZARSKI Jean-Pierre**	**Gastro-entérologie, hépatologie, addictologie**

PU-PH : Professeur des Universités et Praticiens Hospitaliers
MCU-PH : Maître de Conférences des Universités et Praticiens Hospitaliers
PU-MG : Professeur des Universités de Médecine Générale
MCU-MG : Maître de Conférences des Universités de Médecine Générale

Remerciements

A monsieur le **Professeur Pascal MOSSUZ**, Directeur et Président du jury,

Merci de m'avoir encadré pour ce travail de thèse, pour votre soutien et vos conseils tout au long de mon internat. Vous me faites l'honneur de présider cette thèse.

A madame la **Docteure Christine LEFEBVRE**,

Merci pour cette année de formation, de participer à ce jury. J'ai apprécié ta disponibilité, tes connaissances et tes compétences en génétique des hémopathies. Je t'adresse mon respect et ma grande reconnaissance.

A madame la **Professeure Sophie PARK,**

Je vous suis reconnaissant d'avoir accepté de juger ce travail en tant que clinicienne. Merci d'avoir pris du temps pour évaluer ma thèse.

A madame la **Docteure Marie BIDART,**

Je suis très sensible à l'honneur que vous me faites de participer à ce jury. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.

A madame la **Docteure Sylvie TONDEUR**,

Merci d'avoir accepté avec gentillesse et sans hésitation de juger ce travail. J'ai énormément apprécié de travailler avec toi pendant mon dernier stage d'internat.

Merci au **Docteur Benoit BUSSER** pour ton aide précieuse dans la réalisation technique de notre travail.

A tous les biologistes du secteur de l'**hématologie** : Professeur Polack, Docteur Vettier, Docteur Bulabois, Docteur Marlu et Docteur Szymanski. Merci de me montrer la beauté de l'hématologie.

A L'équipe de **biologie moléculaire, cytogénétique en onco-hématologie du CHU de Grenoble,**

Merci notamment aux techniciennes de biologie moléculaire pour leurs soutiens techniques et leurs disponibilités ainsi que pour cet agréable séjour en biologie moléculaire : Céline, Isabelle, Lauriane, Katia et Claire. Un grand merci aussi aux techniciennes de cytogénétique et d'exploration de l'hématopoïèse : Nathalie, Emilie, Géraldine, Anne, Rachel et Anne pour votre accueil chaleureux au sein de votre équipe et pour toutes les pauses de petit déjeuner !!. Merci aussi à nos chères secrétaires, Horia et Séverine (je vous embête plus avec mes dossiers de validation). Merci également à notre cadre Cécile.

Merci à Pierre et à toutes les techniciennes de cytologie : Marie-Jo, Monique, Nicole, Sandrine, Catherine, Caroline, Séverine, Camille, Marie-Noëlle et Jocelyne. Ça a été un plaisir de travailler avec vous.

Un grand merci aussi aux personnes de la garde : Laurent, Ambre, Sandy, Elodie, Isabelle, Amandine, Mathilde, Guillemette, Stéphanie, Mélanie, Aline, Emmanuelle, Manon et Yasmine ainsi qu'aux externes. Merci pour votre aide dans les moments difficiles en garde.

Merci les **amis co-internes** pour les jolis moments qu'on a passés ensemble et ce n'est pas encore fini !!! Spécial remerciement aux JD Juppy, Zélinoudoudou, Bénji, Vinchenzo, Saimon, Clairoudoudou, Gladous, Caro Plazy, Fanny Fan Fan, Caro LP, Tonton Théo, Luciole, Aurélie,

Léa (grande), Emmanuelle, Julliane, Quentin despi, Quentino, Charlotti, Mery, Lionnel, Léa (petite), Alex, Ann-So, Tristan, Elisounette, Anaëlle, Arthur speedy, Laura et bien sûr Aurélien.

A ma famille, mon frère **Aliréza** et ma sœur **Roshane** et leurs familles, merci pour vos encouragements.

A mes parents, **Ebi** et **Zohreh**, pour votre amour et votre soutien éternel.

Un immense merci à l'association **ARAMIS,** de nous avoir fourni le moyen matériel et financier pour la réalisation de ce projet.

Table des matières

Liste des tableaux **14**

Liste des figures **15**

Abréviations **17**

INTRODUCTION **18**

Partie 1 : Rappels Bibliographiques **20**

1. Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes **20**

1.1) Définition 20

1.2) Epidémiologie 20

1.3) Classification des LAM 21

1.3.1) LAM avec anomalies génétiques récurrentes 23

1.3.2) LAM–MRC 23

1.3.3) LAM secondaires aux traitements 24

1.3.4) LAM–NOS 24

1.3.5) Sarcome Myéloïde 25

1.3.6) Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down 25

1.3.7) LAM de lignée ambiguë (MPAL) 25

2) Démarche diagnostique **26**

2.1) Morphologie 26

2.2) Immunophénotypage 26

2.3) Cytogénétique 28

2.4) Analyses moléculaires 29

3) Facteurs pronostiques **37**

3.1) Facteurs avant traitement 37

3.2) Facteurs liés au patient 39

3.3) Facteurs après traitement : Monitoring de la maladie résiduelle 39

3.3.1) Définition de la maladie résiduelle (MRD) 39

3.3.2) Techniques de détection de la MRD 40

3.3.3) Marqueurs moléculaires de la MRD 40

4) Mutations NPM1 dans les LAM **41**

4.1) Généralités 41

4.1.1) Structure du gène et de la protéine NPM1 42

4.1.2) Fonctions de NPM1 43

4.1.3) Mutations de NPM1: types et fréquences 46

4.1.4) Conséquence fonctionnelle des mutations NPM1 47

4.1.5) NPM1c et leucémogenèse 48

4.2) Conséquences clinico-biologiques des mutations de NMP1 49

4.2.1) Morphologie et classification des LAM NPM1 49

4.2.2) Fréquence et manifestations cliniques 50

4.3) Mutations associées à NPM1 51

4.3.1) NPM1 & FLT3 52

4.3.2) NPMI & DNMT3A 52

4.3.3) NPM1 & Autres mutations 52

4.4) NPM1 : Marqueur pronostique 53

4.5) NPM1 : Marqueur de la maladie résiduelle 53

5) Méthodes moléculaires de détection de la MRD **54**

5.1) RT-qPCR 54

5.2) Séquencage de nouvelle génération (NGS) 54

5.3) PCR Digitale 55

5.3.1) Définition, concept de base 55

5.3.2) Description générale de la méthode 56

5.3.3) Principe 58

5.3.4) Applications de la dPCR et avantages 62

6) Objectifs de l'étude **66**

Partie 2 : Matériels et Méthodes **67**

1) Matériels : lignée, patients, témoins **67**

1.1) Lignée cellulaire 67

1.2) Témoins 67

1.3) Patients 67

2) Méthode : PCR Digitale **69**

2.1) Amorces et sondes 69

2.2) Extraction de l'ADN 70

2.3) Extraction de l'ARN 71

2.4) Transcription inverse (Reverse transcription, RT) 71

2.5) Digestion Enzymatique 71

2.6) ddPCR 72

3) Paramètres analytiques de dPCR **73**

3.1) Limite de charge 73

3.2) Spécificité de la réaction PCR 73

3.3) Limite de spécificité de la sonde du variant muté 73

3.4) Détection d'une fraction muté élevée 73

3.5) Limite de la détection pour une fraction muté faible (sensibilité) 73

3.6) Répétabilité 74

4) Méthode : Analyse des données **74**

4.1) analyse des données du logiciel 74

4.2) analyse statistique 75

Partie 3 : Résultats **76**

1) Paramètres analytiques **76**

1.1) Vérification de la lignée OCI/AML3 76

1.2) Faisabilité technique et analytique de la PCR digitale ; Validation des amorces et des sondes 77

1.3) Limite de charge 80

1.4) Spécificité de réaction de PCR 83

1.5) Intérêt de réalisation d'une étape de digestion 85

1.6) Limite de spécificité de la sonde du variant muté 87

1.7) Détection de fractions mutés élevées 89

1.8) Limite de la détection (sensibilité) 90

1.9) Répétabilité 94

2) Expériences réalisées sur les échantillons des patients **95**

2.1) Caractéristiques des patients LAM avec mutation NPM1 95

2.2) Etude rétrospective sur 37 échantillons d'ADNc 97

2.3) Etude longitudinale de 3 patients 101

Partie 4 : Discussion **107**

Partie 5 : Conclusion et perspectives **111**

Références **115**

Tableaux annexes **134**

Liste des tableaux

Tableau 1- Classification de l'OMS 2016 des LAM [1] 22

Tableau 2- Expression des marqueurs de surface cellulaire et des marqueurs cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM et MPAL [1] 27

Tableau 3 - Anomalies cytogénétiques suffisantes pour classer une LAM en MRC selon la classification de l'OMS 2016 [1] 28

Tableau 4 - Groupes fonctionnels des mutations en fonction des altérations génétiques dans les LAM [2] 30

Tableau 5 - Stratification du risque selon les recommandations d'ELN 2017 [1] 38

Tableau 6 - RT-qPCR Vs dPCR [3] 65

Tableau 7 - Données relatives aux différentes quantités d'ADN examinées 81

Tableau 8 - Données relatives à la limite de détection pour l'ADN génomique 92

Tableau 9- Données relatives à la limite de détection pour l'ADN complémentaire 93

Tableau 10 - Données relatives à l'application de la loi de distribution binomiale 94

Tableau 11- Evaluation de la répétabilité de l'ADN génomique 95

Tableau 12- Principales caractéristiques des patients LAM inclus dans l'étude 96

Tableau 13 – Cinétique de l'évolution des marqueurs WT1 et NPM1 pour les patients LAM NPM1c+ sur les prélèvements sanguins 98

Liste des figures

Figure 1 - Gènes les plus fréquemment mutés dans les LAM [4] 36

Figure 2 - Structure du gène et de la protéine NPM1 [5 ' 6] 43

Figure 3 - Principaux rôles et fonctions cellulaires de NPM1 [6] 45

Figure 4 - Type, séquence d'acides nucléiques, séquences des acides aminés de différentes mutations NPM1 [7] 46

Figure 5 – Protéines NPM1 muté et sauvage [7] 47

Figure 6 - Différentes classes de LAM : fréquence des mutations associées à la mutation NPM1 [1] 51

Figure 7- Répartition de molécules cibles dans des partitions (Guide d'application de ddPCR, BIO-RAD) 56

Figure 8 - Application de la loi de poisson (Guide d'application de ddPCR, BIO-RAD) 58

Figure 9 - Lecture des gouttelettes (Guide d'application de ddPCR, BIO-RAD) 59

Figure 10 - Principe de fonctionnement de ddPCR [8] 61

Figure 11 - Illustration de la distribution des gouttelettes (ddPCR) [9] 61

Figure 12 – Détection de séquence rare mutée au sein d'un grand nombre de variants sauvages (Guide d'application de ddPCR, BIO-RAD) 63

Figure 13 - Patients et échantillons sélectionnés pour la quantification de NPM1 par ddPCR 69

Figure 14 - Principe de détection compétitive de cibles par les sondes 70

Figure 15 - Caryotype de la lignée OCI/AML3 77

Figure 16 - Validation technique de la PCR digitale 78

Figure 17 - Validation analytique des amorces et sondes 79

Figure 18 - Effet de charge d'ADN sur la détection de cible (NPM1 type A) 82

Figure 19 – Spécificité de réaction (gradient de température) 84

Figure 20 - Vérification de l'enzyme de digestion 85

Figure 21 - Comparaison de l'effet de digestion enzymatique sur l'ADNg et l'ADNc 86

Figure 22 - Comparaison entre la séquence du variant rare et la séquence de la sonde de détection du variant sauvage 87

Figure 23 - Spécificité de la sonde de détection variant muté 88

Figure 24 - Courbes de corrélation entre fraction mutée attendue et fraction mutée mesurée

(ADNg et ADNc) 89

Figure 25 - Gamme de dilution d'ADNc (sensibilité) 91

Figure 26 - Evolution des marqueurs WT1 et NPM1, exemple d'un patient 99

Figure 27 - Suivi longitudinal d'un patient pour le marqueur NPM1 déterminé par dPCR 100

Figure 28 A - Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et ddPCR, patient 1 102

Figure 28 B - Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et ddPCR, patient 2 103

Figure 28 C - Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et ddPCR, patient 3 104

Liste des abréviations

ABL : ABELSON

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ADNg : Acide désoxyribonucléique génomique

CSH : Cellule souche hématopoïétique

ddPCR : Droplet digital polymerase chain reaction

dPCR : Digital polymerase chain reaction

ELN : European leukemia net

FAB : French-American-British

ITK : Inhibiteur de Tyrosine kinase

LAM : leucémie aiguë myéloïde

LAM CBF : LAM “Core binding factors”

LAM CN : LAM à caryotype normal

LAM MRC : LAM "Myelodysplasia related changes"

LAM NOS : LAM "Not otherwise specified"

MPAL : Mixed phenotype acute leukemia

MRD : Minimal residual disease

NGS : Next generation sequencing

NPM1 : Nucléophosmine 1

OMS : Organisation mondiale de la santé

RT-qPCR : Real time quantitative polymerase chain reaction

SMD : Syndrome myélodysplasique

SMP : Syndrome myéloprolifératif

t-MNs : Néoplasie myéloïdes liées aux traitements

WT1 : Wilms tumor 1 gene

INTRODUCTION

La mutation du gène *NPM1* (Nucleophosmine1) représente l'une des mutations acquises les plus fréquemment observées dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), en particulier parmi les LAM à caryotype normal (CN), au sein desquelles elle est observée dans 45-64% des cas [10].

Les mutations de NPM1 sont dans la très grande majorité des cas localisées au niveau de l'exon 12, dans sa partie N-Terminale, générant un signal d'exportation [11]. En conséquence, les mutations de NPM1 aboutissent à une délocalisation aberrante du mutant du nucléole vers le cytoplasme. Parmi les nombreux types de mutants NPM1, la mutation de type A, représente 80% des mutants NPM1 [11].

L'expression du mutant NPM1 constitue un marqueur moléculaire fiable et robuste de la présence de cellules leucémiques résiduelles [12]. De ce fait, le suivi de ce marqueur moléculaire est indiqué en routine dans la prise en charge des LAM. Ce suivi permet de détecter la rechute précoce de l'hémopathie et d'adapter rapidement la stratégie thérapeutique.

Le suivi de la maladie résiduelle s'appuie actuellement sur la quantification des transcrits NPM1 mutés par PCR quantitative en temps réel (RT-qPCR). Les résultats sont exprimés en ratio « muté/normal » de mutant NPM1 par rapport à un gène de référence (ABL1).

La PCR digitale (dPCR) permet la quantification d'un évènement génétique rare. Elle repose sur le principe de micro-compartimentation de l'échantillon, par une méthode de dilution de l'échantillon, suivi par une PCR classique en point final. L'une de ces approches consiste en création des microgouttelettes (ddPCR). Le marquage fluorescent des deux fragments, muté et sauvage par deux sondes différentes, permet de détecter, après la phase de PCR, la fraction mutée ou sauvage dans chaque microgouttelette et d'estimer précisément la proportion de mutants. La référence utilisée pour l'expression du ratio « muté/normal » est donc le gène sauvage cible. Les avantages de la PCR digitale sont multiples : gène de référence identique à

la cible recherchée, sensibilité quasi-identique à la RT-qPCR, absence d'utilisation de gamme plasmidique (indispensable en RT-qPCR).

Dans la première partie, sera présentée une revue des connaissances réactualisées concernant les LAM (classification, critères diagnostiques et pronostiques, intérêt de la maladie résiduelle, méthodes moléculaires pour le suivi de la maladie résiduelle, marqueurs de la maladie résiduelle …), suivie par les données récentes de la littérature concernant le gène *NPM1*. A la fin de cette partie sera abordé le principe de la PCR digitale et ses applications. Dans les parties suivantes les résultats de notre projet seront présentés et discutés.

Partie 1 : Rappels Bibliographiques

1) Généralités sur les leucémies aiguës myéloïdes

1.1) Définition

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une pathologie clonale, caractérisée par l'accumulation d'altérations génétiques qui constituent les bases physiopathologiques de cette pathologie [13]. Ces altérations aboutissent à une expansion clonale des précurseurs myéloïdes (blastes) dans la moelle osseuse, le sang et éventuellement d'autres organes avec un blocage à un stade précoce de leur différenciation ayant pour conséquence une défaillance de la moelle ainsi q'une hématopoïèse inefficace [14]. Ces aberrations génomiques, dont les rôles importants dans la pathogénèse de cette hémopathie ont été démontrés, sont étudiées depuis plus de trois décennies. Pour certaines de ces anomalies, leur implication comme marqueur diagnostique et pronostique est bien établie. Au cours des 15 dernières années, les progrès réalisés dans les domaines techniques notamment ceux du *« micro-array et next-generation sequencing (NGS) »* ont considérablement augmenté nos connaissances sur l'hétérogénéité moléculaire des LAM. Ce n'est que récemment que ces progrès ont été pris en compte afin de mieux décrire la classification de la pathologie et d'améliorer la prise en charge des patients par de nouvelles approches thérapeutiques notamment les thérapies ciblées [15].

1.2) Epidémiologie

Les LAM répresentent environ 80% des leucémies aiguës de l'adulte. L'incidence des LAM est estimée à 19520 nouveaux cas aux Etats-unies entre 2014 et 2018 avec un taux de mortalité estimé à 10670 patients depuis 2015 [16]. En France on estime à 2791 le nombre de nouveaux cas de LAM en 2012. Le taux d'incidence standardisé sur la population mondiale est de 2,6

pour 100 000 chez l'homme et de 2,3 pour 100 000 chez la femme soit un rapport hommes/femmes de 1,1. L'incidence est relativement faible chez les sujets de moins de 40 ans puis augmente lentement jusqu'à 60 ans, avant de croitre plus rapidement après 60 ans. Il s'agit en effet d'une pathologie touchant essentiellement le sujet âgé avec un taux d'incidence supérieur à 30 pour 100 000 chez l'homme de plus de 85 ans, et de plus de 19 pour 100 000 chez la femme de plus de 85 ans. L'âge médian de survenue de ces pathologies est de 71 ans chez l'homme et chez la femme [17].

1.3) Classification

Depuis 2001, l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) propose une classification des hémopathies, et en particulier des LAM, en prenant en compte les données cytogénétiques et moléculaires des blastes. Cette classification qui n'est plus simplement morphologique, permet de définir des entités distinctes dont la valeur pronostique, en termes d'évolution et de réponse au traitement, est mieux définie. La révision 2016 de la classification de l'OMS apporte quelques changements par rapport à la dernière version (2008) avec notamment l'apparition d'une nouvelle catégorie « *myeloid neoplasms with germ line predisposition* » (**Tableau 1**) [18].

Tableau 1 : Classification de l'OMS 2016 des LAM : Extrait de Estey et *al*. [1]

AML and related neoplasms	AML and related neoplasms (cont'd)
AML with recurrent genetic abnormalities	Acute myelomonocytic leukemia
AML with t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*	Acute monoblastic/monocytic leukemia
AML with inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*	Pure erythroid leukemia#
Acute promyelocytic leukemia with *PML-RARA**	Acute megakaryoblastic leukemia
AML with t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*†	Acute basophilic leukemia
AML with t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*	Acute panmyelosis with myelofibrosis
AML with inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2,MECOM(EVI1)*	Myeloid sarcoma
AML (megakaryoblastic) with t(1;22)(p13.3;q13.3); *RBM15-MKL1*‡	Myeloid proliferations related to Down syndrome
Provisional entity: AML with *BCR-ABL1*	Transient abnormal myelopoiesis
AML with mutated *NPM1*§	Myeloid leukemia associated with Down syndrome
AML with biallelic mutations of *CEBPA*§	Blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm
Provisional entity: AML with mutated *RUNX1*	**Acute leukemias of ambiguous lineage**
AML with myelodysplasia-related changes‖	Acute undifferentiated leukemia
Therapy-related myeloid neoplasms¶	MPAL with t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1***
AML, NOS	MPAL with t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged
AML with minimal differentiation	MPAL, B/myeloid, NOS
AML without maturation	MPAL, T/myeloid, NOS
AML with maturation	

*Les autres translocations récurrentes impliquant *RARA* doivent être rapportées dans cette catégorie

† Les autres translocations impliquant KMT2A (*MLL*) doivent être rapportées dans cette catégorie

‡ Leucémie rare, souvent chez les enfants

§ Diagnostic établi sans tenir compte de la présence ou de l'absence de dysplasie multi-lignées

‖ Au moins 20% des blastes dans le sang et/ou la moelle et la présence d'un syndrome myélodysplasique connu ou la présence des anomalies chromosomiques caractéristiques (tableau 3)

¶ Les cas doivent être classés selon l'anomalie génétique associée au moment du diagnostic

L'ancien sous-groupe de la leucémie érythroïde aiguë, de type érythroïde/myéloïde a été supprimé

** Leucémie avec BCR-ABL détectable dans les MPAL, traitement par ITK recommandé

1.3.1) LAM avec anomalies génétiques récurrentes

La première catégorie de la classification de l'OMS 2016 regroupe les LAM avec anomalies génétiques récurrentes. Elle comprend les réarrangements issus de remaniements chromosomiques récurrents : t(8;21)(q22;q22.1), *RUNX1-RUNX1T1*, inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22), *CBFB/MYH11*, t(15;17)(q24.1;q21.2), *PML-RARA*, *t*(9;11)(p21.3;q23.3), *MLL/MLLT3*, *t(6;9)(p23;q34.1*), *DEK/NUP214*, inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2), *GATA2/MECOM* et *t(1;22)(p13.3;q13.1*), *RBM15/MKL1*. La base moléculaire de LAM avec inv(3)(q21.3q26.2*)* ou t(3;3)(q21.3;q26.2) a été réanalysée, et montre que l'anomalie chromosomique aboutit à un repositionnement d'un enhancer du gène *GATA2* qui conduit à une surexpression du gène *MECOM* (*EVI1*) et à l'haploinsuffisance de *GATA2* [19]. Une nouvelle entité « LAM avec réarrangement *BCR/ABL* » a été introduite pour signaler l'importance d'un traitement par un inhibiteur de tyrosine kinase chez les patients porteurs de cette anomalie [20]. Les LAM avec les mutations *NPM1* et *CEBPA* sont devenues des entités à part entière, la dernière ne concerne que les patients avec une mutation bi-allélique, étant donné que seules ces formes (avec *CEBPA* double muté) sont associées à un pronostic favorable [21] . Finalement une nouvelle entité provisoire « LAM avec mutation *RUNX1* » a été ajoutée. Elle définit un groupe de patients avec des caractéristiques clinico-biologiques distinctes et de pronostic moins favorable [22].

1.3.2) LAM-MRC (*with myelodysplasia-related changes*)

La catégorie de LAM-MRC est affinée dans la nouvelle classification. La présence de la dysplasie multilignée seule, ne permet pas de retenir ce cas dans cette catégorie lorsque la mutation *NPM1* et/ou *CEBPA* bi-allélique est présente [23]. En l'absence de ces deux mutations, la LAM-MRC se définit par une blastose médullaire ≥ à 20% et par la présence d'un diagnostic préexistant d'un syndrome myélodysplasique (SMD) ; et/ou de dysplasie

multilignée définie par au moins 50% de cellules médullaires dysplasiques sur au moins 2 lignées ; et/ou d'anomalies cytogénétiques associées aux SMD (**Tableau 3**). La délétion 9q a été retirée de la liste des anomalies cytogénétiques liées aux SMD car, en plus de son association avec la t(8,21), elle est fréquemment observée dans les LAM avec les mutations *NPM1* ou avec mutation *CEBPA* bi-allélique [24,25].

1.3.3) LAM secondaires aux traitements

Les pathologies myéloïdes associées au traitement (t-MNs) demeurent une catégorie distincte dans la classification 2016 de l'OMS pour les patients qui développent des néoplasies myéloïdes à la suite d'un traitement cytotoxique. Les t-MNs peuvent être subdivisés en SMD ou LAM liés à la thérapie (t-MDS ou t-LAM). La détermination de l'anomalie cytogénétique associée peut s'avérer très importante pour la décision thérapeutique. Un certain nombre de ces patients t-MNs pourrait être porteur des mutations germinales au niveau des gènes de prédispositon aux cancers [26].

1.3.4) LAM NOS *« Not otherwise specified »*

Cette catégorie comprend les LAM non définies par les anomalies citées précédemment. De plus, l'ancien sous-groupe de la leucémie érythroïde aiguë, forme érythroïde/myéloïde (précurseurs érythroïdes de la moelle osseuse à 50% et myéloblastes à 20% parmi les cellules non érythroïdes) a été retiré . Les myéloblastes sont désormais comptés en pourcentage sur l'ensemble des cellules de la moelle. La sous-catégorie restante LAM NOS pure érythroïde nécessite la présence de plus de 80% des précurseurs érythroïdes immatures avec des proérythroblastes ≥ à 30% . La sous-classification FAB (French-American-British) ne semble pas fournir d'informations pronostiques pour les cas « LAM-NOS » lorsque les données sur les mutations *NPM1* et *CEBPA* sont disponibles [27].

1.3.5) Sarcome Myéloïde

Le sarcome myéloïde qui se caractérise par une présentation extramédullaire des néoplasies myéloïdes et plus particulièrement la LAM, reste défini dans la classification comme une entité unique pouvant être présente dans tous les sous-types de LAM. Il peut y avoir une présentation *de novo* avec l'atteinte sanguine et/ou médullaire, il peut aussi se manifester au moment de la rechute de LAM ou suite à une progression d'un SMD, SMP ou SMD/SMP [28].

1.3.6) Proliférations myéloïdes liées au syndrome de Down

Les proliférations myéloïdes du syndrome de Down comprennent la réaction leucémoïde transitoire (RLT) ou TAM « *transient abnormal myelopoiesis* » et la leucémie aiguë myéloïde associée au syndrome de Down [29]. Les deux formes sont généralement de présentation mégacaryoblastique, la RLT se manifeste autour de la naissance et évolue favorablement avec une résolution spontanée dans les 2 mois qui suivent, alors que la leucémie aiguë myéloïde se déclare plus tardivement au cours des 3 premières années de vie avec ou sans RLT préexistante. La RLT peut ainsi persister en l'absence de traitement. Les deux entités liées au syndrome de Down se caractérisent par les mutations de *GATA1* et les mutations des gènes impliqués dans les voies de signalisation *JAK-STAT* [30].

1.3.7) LAM de lignée ambiguë (MPAL)

La LAM de lignée ambiguë ou "*Mixed-phenotype acute leukemia*" , MPAL, désigne les rares cas de LAM pour lesquels l'assignation unique de l'origine des cellules blastiques n'est pas possible en raison de l'expression des antigènes spécifiques des deux lignées myéloïdes et lymphoïdes. Aucune nouvelle entité n'a été définie dans ce sous-groupe de leucémies aigües. Cependant, plusieurs études publiées depuis la classification 2008 ont confirmé la pertinence clinique de ses entités et leur sub-division en sous-groupes génétiques [31,32]. Bien

que les données soient encore préliminaires, il semble que la LAM *MPAL* avec translocation t(9;22) peut répondre favorablement au traitement par ITK [33].

2) Démarche diagnostique

2.1) Morphologie

Le diagnostic de LAM repose avant tout sur les critères cytologiques et cytochimiques des blastes selon la classification FAB [34]. Au moins 200 cellules leucocytaires sur le frottis sanguin et 500 éléments nucléés sur le frottis médullaire doivent être comptés. Un taux de blastose médullaire ou sanguin ≥ à 20% est requis pour poser le diagnostic de LAM, sauf pour les cas avec les anomalies cytogénétiques suivantes : translocations : t(15;17), t(8;21), inversion : inv(16) ou t(16;16) qui sont d'emblée classés en LAM quelque soit le pourcentage de blastes.

2.2) Immunophénotypage

L'Immunophénotypage est un outil de diagnostic majeur en raison de sa précision et de sa rapidité. Les biomarqueurs cellulaires détectés grâce à l'immunophénotypage permettent de définir avec une précision élevée la lignée et le stade de différenciation des cellules blastiques [35]. Le **Tableau 2** fournit une liste de marqueurs utiles pour établir le diagnostic de LAM et pour définir ceux spécifiques les lignées LAM-MPAL [18].

Tableau 2 : Expression des marqueurs de surface cellulaire et des marqueurs cytoplasmiques pour le diagnostic de LAM et MPAL ; Extrait de Estey et *al*. [1]

Expression of cell-surface and cytoplasmic markers	
Diagnosis of AML*	
Precursors†	CD34, CD117, CD33, CD13, HLA-DR
Granulocytic markers‡	CD65, cytoplasmic MPO
Monocytic markers§	CD14, CD36, CD64
Megakaryocytic markers‖	CD41 (glycoprotein IIb/IIIa), CD61 (glycoprotein IIIa)
Erythroid markers	CD235a (glycophorin A), CD36
Diagnosis of MPAL¶	
Myeloid lineage	MPO (flow cytometry, immunohistochemistry, or cytochemistry) or monocytic differentiation (at least 2 of the following: nonspecific esterase cytochemistry, CD11c, CD14, CD64, lysozyme)
T-lineage	Strong# cytoplasmic CD3 (with antibodies to CD3 ε chain) or surface CD3
B-lineage**	Strong# CD19 with at least 1 of the following strongly expressed: cytoplasmic CD79a, cCD22, or CD10 or weak CD19 with at least 2 of the following strongly expressed: CD79a, cCD22, or CD10

* Les marqueurs représentés dans le tableau sont issus des recommandations de l'ELN

† CD38, CD123 et CD133 peuvent être ajoutés pour identifier les cellules souches leucémiques, mais ils ne contribuent pas au diagnostic

‡ Les cellules impliquées dans la maturation granulocytaire conserveront l'expression de CD13 et CD33 avec différents niveaux de fluorescence. La recherche de l'expression de CD15 et CD11b peux fournir des informations supplémentaires. Le CD16 est seulement présent sur les granulocytes matures et normaux. L'absence de MPO en présence des marqueurs myéloïdes définit la LAM avec différenciation minime ce qui est différent avec la LAM indifférenciée

§ Les cellules impliquées dans la maturation monocytaire conserveront l'expression de CD13 et CD33. La recherche pour du CD64 et du CD11b peut fournir des informations supplémentaires notamment pour les promonocytes

‖ CD42 peut être aussi utilisé

¶ La catégorie MPAL inclut les leucémies avec l'expression des antigènes de plus d'une lignée. Elle contient des populations distinctes de différentes lignées, ou une population de blastes avec l'expression d'antigènes de différentes lignées sur les mêmes cellules ou une combinaison

** D'autres marqueurs peuvent être aussi utilisés

2.3) Cytogénétique

L'analyse cytogénétique reste indispensable dans le bilan initial de diagnostic des LAM. Huit translocations et inversions équilibrées et leurs variants ont été incluses dans la classification de l'OMS dans le groupe " *AML with recurrent genetic abnormalities* " (**Tableau 1).** Neuf translocations équilibrées et de plusieurs anomalies déséquilibrées suffisent à préciser la catégorie "*AML with myelodysplasia-related changes*" (**Tableau 3)** [18].

Tableau 3 : Anomalies cytogénétiques suffisantes pour classer une LAM en LAM-MRC selon la classification de l'OMS 2016 ; Extrait de Estey et *al*. [1]

Anomalies non équilibrées	Anomalies équilibrées
del(7q) ou -7	t(11;16)(q23.3;p13.3)
del(5q) ou -5	t(3;21)(q26.2;q22.1)
i(17q) ou t(17p)	t(1;3)(p36.3;q21.2)
del(13q) ou -13	t(2;11)(p21;q23.3)
del(11q)	t(5;12)(q32;p13.2)
del(12p) ou t(12p)	t(5;7)(q32;q11.2)
idic(X)(q13)	t(5;17)(q32;p13.2)
	t(5;10)(q32;q21)
	t(3;5)(q25.3;q35.1)

D'autres anomalies cytogénétiques ont été identifées avec une fréquence plus rare. Bien qu'elles soient considérées comme évènement initial dans la leucémogenèse, elles ne définissent pas une catégorie particulière dans la classification ; il s'agit, par exemple des anomalies impliquant les gènes codant pour des facteurs épigénétiques (*CREBBP, NSD1*) ou pour les complexes des pores nucléaires *(NUP98, NUP214)* [1].

La méthode de FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) peut compléter l'analyse cytogénétique pour la détection des réarrangements des gènes de fusion tels que : *RUNX1-RUNX1T1*, *CBFB-MYH11* , *KMT2A (MLL)* et *MECOM (EVI1*) .

2.4) Analyses moléculaires

Le bilan initial au diagnostic doit comprendre les tests de "screening" moléculaire a) pour les mutations de *NPM1*, *CEBPA* qui définissent les différentes catégories de patients et b) mutations de *FLT3–ITD* avec sa fréquence allélique et FLT3-TKD, la recherche de ces mutations a non seulement un impact pronostique mais aussi un intêrét dans la mise en route d'un traitement ciblé par les inhibiteurs de FLT3 [36] , et c) mutations de *TP53* et *ASXL1* qui sont associées à un pronostic défavorable [37,38].

L'avènement des techniques de séquençage à haut débit a permis d'élargir nos connaissances sur les bases moléculaires des LAM. Il s'agit d'une pathologie complexe et dynamique caractérisée par la présence simultanée de multiples mutations somatiques acquises dites « *Driver* », la coexistence de plusieurs clones et la mise en évidence d'une évolution clonale au cours du temps. Le projet « *The cancer Genome Atlas* » a exploré le profil mutationnel de 200 patients LAM *de novo* par séquençage du génome entier (50) ou de l'exome entier (150) [2]. Vingt trois gènes ont été identifiés comme étant mutés de façon récurrente, et 237 autres gènes sont mutés dans deux cas ou plus. La coexistence et/ou le caractère mutuellement exclusif de ces mutations n'est pas aléatoire.

Les anomalies cytogénétiques et moléculaires sont actuellement classées dans l'une des neuf catégories fonctionnelles suivantes : gènes de fusion impliquant des facteurs de transcription, mutation du gène *NPM1*, mutation de gènes suppresseurs des tumeurs, mutation de gènes liés à la méthylation de l'ADN, mutation de gènes responsables de

l'activation du signal intracellulaire, mutation et translocation de gènes modifiant la chromatine, mutation de gènes codant pour des facteurs de transcription myéloïde, mutation de gènes du complexe de cohésine et mutation de gènes du complexe de splicéosomes. Les détails de cette classification fonctionnelle ainsi que l'évolution de ces différents groupes au cours du temps sont résumés dans le **Tableau 4.**

Tableau 4 : Groupes fonctionnels des altérations génétiques dans les LAM. Extrait de Voign et *al* .[2]

<table>
<tr><th>Période</th><th>Avant 2008</th><th>2008-2010</th><th>Depuis 2013</th></tr>
<tr><td>Analyse</td><td>Cytogénétique analyse moléculaire</td><td>Séquençage à haut débit</td><td>Projet
« The cancer genome Atlas »</td></tr>
<tr><td rowspan="9">Groupe fonctionnel</td><td rowspan="3">Classe 1 :
Activation des voies de la signalisation: FLT3, KIT, RAS</td><td rowspan="3">Classe 1 :
Activation des voies de la signalisation : FLT3 ,KIT, RAS</td><td>Classe1 :
fusion de facteurs de transcription, t(8;21), inv(16), t(15,17)</td></tr>
<tr><td>Classe2 :
Nucléophosmine1(NPM1)</td></tr>
<tr><td>Classe 3 :
Gènes suppresseurs de tumeurs : TP53, PHF6</td></tr>
<tr><td rowspan="6">Classe 2 :
Facteurs de transcription et différenciation :
t(8;21), inv(16), t(15;17) et CEBPA</td><td rowspan="4">Classe 2 :
Facteurs de transcription et différenciation :
t(8;21) ,inv(16), t(15;17) et CEBPA</td><td>Classe 4 :
Méthylation de l'ADN :
TET2, IDH1, IDH2 et DNMT3A</td></tr>
<tr><td>Classe 5 :
Activation des voies de la signalisation :
FLT3, KIT, RAS</td></tr>
<tr><td>Classe 6 :
Modificateurs de la chromatine :
ASXL1, EZH2 et réarrangement KMT2A</td></tr>
<tr><td rowspan="3">Classe 3
Facteurs épigénétiques :
TET2, DNMT3A, ASXL1</td><td>Facteurs de transcription myéloïde : CEBPA, RUNX1</td></tr>
<tr><td>Classe 8 :
Gènes du complexe de cohésine :
STAG2, RAD21, SMC1,SMC2</td></tr>
<tr><td>Classe 9 :
Gènes du complexe de splicéosome :
SRSF2, U2AF1, ZRSR2</td></tr>
</table>

Parmi les anomalies moléculaires les plus fréquemment identifées au cours des LAM on peut citer les mutations suivantes :

- ***Nucleophosmin 1(NPM1)***: cette mutation va être détaillée dans le chapitre dédié (4).

- ***Fms-like tyrosine Kinase 3 (FLT3)*** : FLT3 est un récepteur à activité tyrosine kinase de classe III. Il est fortement exprimé dans les cellules souches hématopoïétiques avec des rôles importants dans la prolifération et la survie cellulaire [39]. Les mutations de ce gène sont parmi les anomalies moléculaires les plus fréquentes dans les LAM avec deux formes bien distinctes : a) Les duplications en tandem interne (*ITD*) survenant dans le domaine juxtamembranaire (*JD),* ont été identifiées chez approximativement 20% des patients LAM et chez 28-34% des patients LAM avec caryotype normal (CN) [40]. Elle a un impact pronostique défavorable dans ce dernier groupe [41]. L'impact pronostique de la *FLT3-ITD* est modulé par le ratio des allèles mutés par rapport aux allèles sauvages avec un pronostic défavorable en présence d'une charge allélique élevée (≥ 0.5). En outre, cette mutation est associée à un risque accru de rechute, alors que la pertinence pronostique de la mutation *FLT3-TKD* (deuxième forme) est controversée [42]. Les ITD activent constitutivement le récepteur à activité tyrosine kinase en bloquant la fonction auto-inhibitrice du domaine *JD* conduisant à une signalisation *RAS*, *MAPK* et *STAT5* [43]. b) dans 28% des cas, ces mutations surviennent dans le domaine de tyrosine kinase (*TKD*) et sont également à l'origine d'une activation constitutive des voies de signalisation favorisant la prolifération des blastes [43].

- ***Isocitrate dehydrogenase (IDH)*** : les mutations des gènes *IDH1* et *IDH2* sont des mutations qui altèrent la fonction enzymatique physiologique et créent une nouvelle capacité enzymatique qui aboutit à la conversion de l'alpha-cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate (2-HG). L'augmentation intracellulaire de ce dernier métabolite inhibe l'activité de l'enzyme *TET2* et cause l'arrêt de la maturation des myéloblastes [44]. Les mutations récurrentes affectant le résidu arginine (R), hautement conservé, au niveau du codon 132 (R132) de *IDH1* et des codons R142 et R170 de *IDH2* ont été identifiées chez 15-20% des patients LAM et 25-30% des LAM-CN [45].

- DNA methyltransferase 3A (DNMT3A) : cette mutation s'observe dans 18-22% des cas de LAM et dans environ 35% des cas de LAM-CN [46]. La mutation faux-sens touchant l'arginine codon 882 (*R882-DNMT3A*) est plus fréquente que celles affectant d'autres codons (*non-R822-DNMT3A*) ; ces deux sous-groupes provoquent une anomalie dans la méthylation de l'ADN et une perturbation de l'hématopoïèse normale [46'47]. Cette mutation a été reconnue comme un évènement pré-leucémique, apparaissant tôt dans l'évolution de la LAM et persistant en période de rémission [48].

- ***Tet methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)*** : la mutation *TET2* est observée chez environ 10% des patients avec LAM [49]. L'enzyme *TET2* est une enzyme impliquée dans la conversion de la 5-méthylcytosine (*5mC*) en 5-hydroxyméthyle cytosine (*5hmC*) qui jouerait un rôle dans la déméthylation de l'ADN [50]. En général, c'est une mutation impliquant une perte de fonction. Malgré plusieurs études, sa valeur pronostique reste incertaine.

- Runt-related transcription factor (RUNX1) : le gène *RUNX1* fait partie du gène de fusion de la translocation t(8;21) dans les LAM CBF (*Core binding factor*), et est également touché

par des mutations génétiques récurrentes dans la LAM. Le gène *RUNX1* code pour un facteur de transcription qui est essentiel pour le déroulement normal de l'hématopoïèse. Sa fréquence est assez variable entre 5% des LAM. Cette mutation est associée à un pronostic défavorable en contraste avec le pronostic favorable du gène de fusion impliquant *RUNX1* dans les LAM-CBF [51,52].

- ***CCAAT enhancer binding protein α (CEBPA)*** : les mutations de ce gène sont observées dans 6-10% des LAM et entre 15-19% des LAM-CN. Elle sont parfois associées à la délétion 9q [4]. Le gène *CEBPA* code pour un facteur de transcription important qui contrôle l'expression de plusieurs gènes durant l'hématopoïèse [53]. La fréquence de mutations bi-alléliques est de l'orde de 4-5% des LAM [15,54].

- Additional sex comb-like (ASXL1) : les mutations d'*ASXL1* sont les mutations de perte de fonction qui surviennent dans 5-11% des cas de LAM [55]. La fonction de la protéine *ASXL1* n'est pas entièrement élucidée, mais elle serait impliquée dans la régulation épigénétique [39]. Cette mutation est associée à un taux réduit de rémission et de survie globale [56].

- ***Lysine methyltransferase 2A (KMT2A***) : le gène *KMT2A* précédemment nommé *MLL* pour *mixed lineage leukaemia*, situé sur le chromosome 11 code une protéine à activité méthyltransférase qui coordonne les modifications de la chromatine au sein d'un complexe régulateur [57]. Les anomalies du gène *KMT2A* conduisent à une leucémie aiguë lymphoblastique ou myéloblastique dont la présentation est aggressive avec un pronostic péjoratif.

- ***Tumour protein p53 (TP53)*** : les mutations du gène suppresseur de tumeur *TP53* sont essentiellement associées à des LAM avec caryotype complexe ; elles sont rares chez les patients n'ayant pas de perte chromosomique [38]. Elles sont identifiées chez 8-14% des cas de LAM, et confèrent un pronostic très défavorable avec une chimiorésistance prouvée chez les patients porteurs de cette mutation [58].

- Wilms tumor1 (WT1) : le gène WT1 est un gène supresseur de tumeur. Sa fréquence dans les LAM est estimée à 1-5% [59]. Les études ont montré que les LAM-CN avec surexpression du gène *WT1* sont plus à risque de rechute [59,60].

-NRAS et ***KRAS*** : ce sont les gènes de la voie de signalisation RAS GTPase. Les mutations du gène *NRAS* sont présentes chez 8-13% des LAM alors que les mutations du gène *KRAS* sont observées chez 2% des LAM de l'adulte et 9% des LAM pédiatriques [45,61,62]. La présence de ces mutations n'a pas d'impact sur la survie globale [63].

- ***KIT*** : il s'agit d'un récepteur à activité tyrosine kinase qui joue un rôle important au cours de l'hématopoïèse [64]. Cette mutation est rare dans les LAM (<5%) mais elle survient approximativement chez 22-29% des patients présentant des LAM-CBF. La présence de la mutation *KIT* et plus particulièrement la mutation du codon *D816,* est associée à une survie réduite chez les patients avec translocation t(8;21)(q22;q22) [65], alors que sa présence ne semble pas modifier la survie des patients avec inversion inv(16)(p13.1q22) [66].

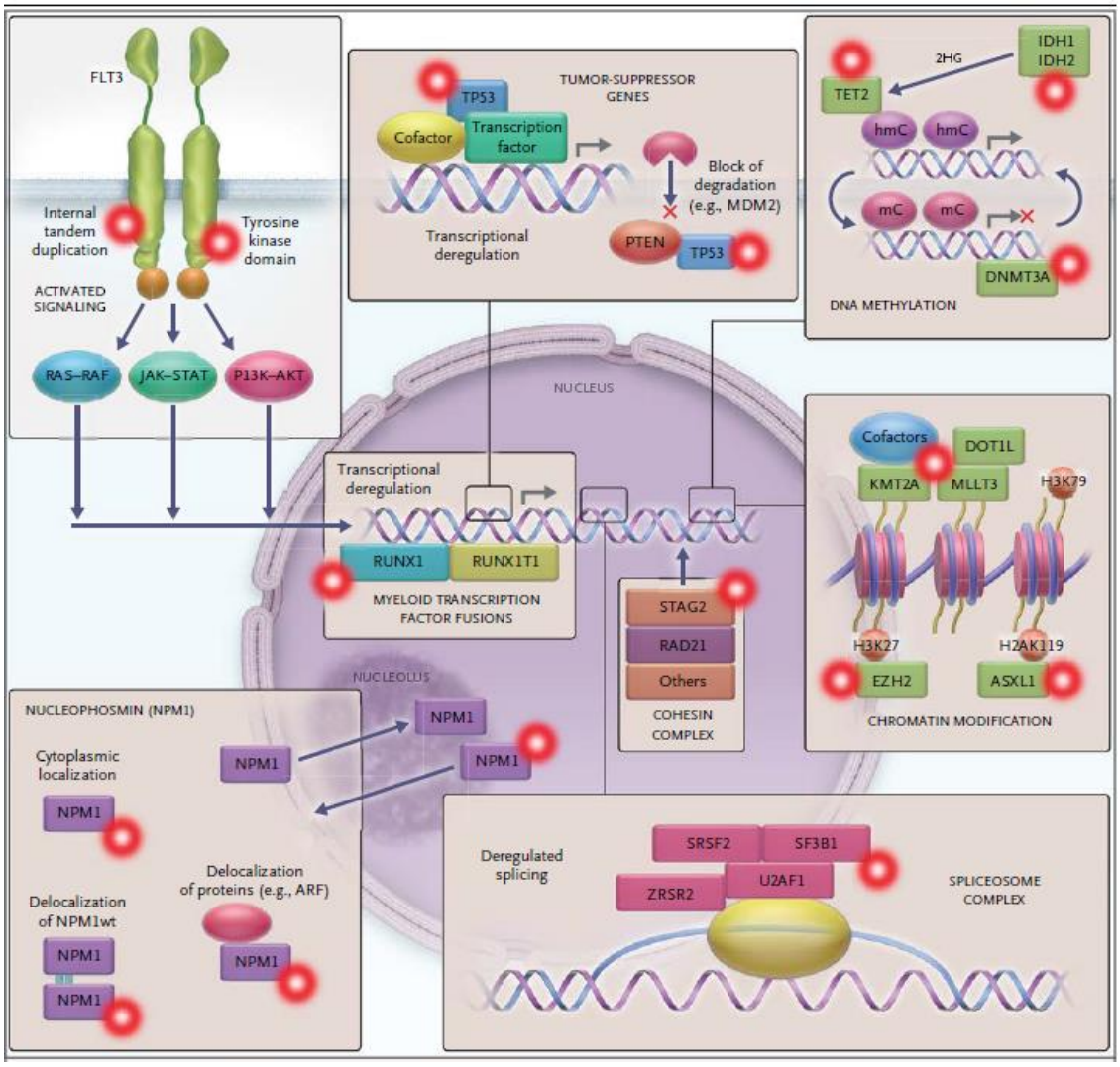
- ***Enhancer of zeste 2 (EZH2***) : EZH2 est un composant catalytique du complexe répressif de polycomb qui joue un rôle important dans le développement des cellules souches. La présence de cette mutation est estimée à 2% des patients LAM et 3-13% des patients ayant

un syndrome myéloprolifératif [67]. L'impact pronostique de cette mutation dans les LAM n'est pas établi.

- ***Splicing factor gene and cohesion complex members mutations*** : les mutations des facteurs de l'épissage sont souvent associées à des conditions préleucémiques comme par exemple les syndromes myélodysplasiques. Les gènes les plus souvent rapportés sont : *SF3B1*, *U2AF1, SRSF2* et *ZRSR2* [68]. Les mutations du complexe de cohésine impliquent les gènes *STAG2*, *TAD21* et *SMC3*. Ces gènes jouent un rôle important dans la régulation de l'expression d'autres gènes et dans la formation des repliements de d'ADN. La présence de ces mutations est associée à un pronostic défavorable [69].

La **Figure 1** résume les différentes catégories de mutations fréquemment observées au cours des LAM et leurs rôles potentiels dans la leucémogenèse.

Figure 1 : Gènes les plus couramment mutés dans les LAM, Extrait de Donher et *al* [4].



Les mutations du gène *FLT3* confèrent un avantage prolifératif via les voies de signalisations RAS-RAF, JAK-STAT et PI3K-AKT. Les mutations du gène *RUNX1* et la translocation t(8;21)(q22;q22) avec le transcrit RUNX1-RUNX1T1 conduisent à la dérégulation de la différentiation cellulaire. Les mutations du gène *NPM1* aboutissent à la délocalisation cytoplasmique aberrante de la protéine NPM1 et à la perturbation de ses interactions avec d'autres protéines. Les mutations des gènes d'épissage (*SRSF2*, *SF3B1*, *ZRSR2* et *U2AF1*) aboutissent à la dérégulation de l'épissage de l'ARN. Les mutations du gène de complexe de cohésine (*STAG2* et *RAD21*) pourraient perturber la ségrégation des chromosomes. Les mutations des gènes impliqués dans l'épigénétique (*ASXL1*, *EZH2*, *DNMT3A*, *IDH1*, *IDH2* et *TET2*) mènent à la dérégulation de la modification de la chromatine et la méthylation de l'ADN. Les mutations au niveau du gène supresseur de tumeurs comme *TP53* peuvent déréguler le processus de la transcription et inhiber la dégradation de MDM2 (*Mouse double minute 2 homologue*) et PTEN (*Phosphatase ane tensin homologue*).

3) Facteurs pronostiques

3.1) Facteurs avant traitement

Les anomalies génétiques permettent de contribuer pour les deux tiers à la prédiction de la survie sans évènement (*Event free survival, EFS*) et la survie globale (Overall Survival, OS), alors que l'autre tiers est dû aux facteurs démographiques, cliniques et thérapeutiques [14,45,70,71]. Les anomalies génétiques sont des facteurs pronostiques puissants [14,45,72,40]. Les résultats de la cytogénétique et le statut mutationnel de *NPM1*, *FLT3* et *CEBPA* sont actuellement intégrés dans la pratique de routine selon les recommandations de l'ELN (*European leukemia net*) 2017. Les données récentes ont conduit à ces changements de classification (**Tableau 5**) [18]. Bien que la mutation *RUNX1* soit fréquemment associée à des facteurs comme l'âge avancé, elle définit une catégorie de patients avec un mauvais pronostic [22,73,51]. A l'instar de la mutation *RUNXI*, la mutation *ASXL1* est de fréquence plus élevée chez les sujets âgés et aboutit à une survie globale inférieure [14,37,45,74]. La mutation *TP53* est d'une importance particulière. Cette mutation est associée à un très mauvais pronostic [14,38]. L'impact pronostique de certains de ces marqueurs dépend de la combinaison potentielle de certains d'entre eux [14], par exemple la mutation *NPM1* est considérée comme un pronostic favorable si elle n'est pas associée à la mutation *FLT3-ITD* ou si la fréquence allélique de *FLT3-ITD* est faible [42,75]**.** Dans les LAM-CBF et notamment la LAM avec la t(8;21), la présence de la mutation c-KIT semble être associée à un pronostic défavorable [76]. Cependant la présence de cette mutation ne doit pas assigner les patients à une autre catégorie pronostique. Elle doit plutôt être considérée comme un que marqueur de la maladie résiduelle [77]. Il est à noter que même si les deux types de LAM -CBF présentent souvent d'autres mutations partenaires notamment celles impliquant les voies de signalisation (*NRAS, KRAS, KIT, FLT3*,…), ils ne présentent pas le même profil mutationnel. Par exemple la LAM avec t(8;21), *RUNX1-RUNX1T1* est plus souvent associée à des mutations des gènes

régulateurs de la chromatine comme *ASXL2* et ceux qui codent la formation de complexe de cohésine alors qu'ils sont presque absents dans la LAM avec inv(16) ou t(16;16), *CBFB-MYH11* [78,79,80].

Tableau 5 : Stratification du risque selon les recommandations ELN 2017 extrait d'Estey et *al* [1]

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); *RUNX1-RUNX1T1*
	inv(16)(p13.1q22) or t(16;16)(p13.1;q22); *CBFB-MYH11*
	Mutated *NPM1* without *FLT3*-ITD or with *FLT3*-ITD^{low}†
	Biallelic mutated *CEBPA*
Intermediate	Mutated *NPM1* and *FLT3*-ITD^{high}†
	Wild-type *NPM1* without *FLT3*-ITD or with *FLT3*-ITD^{low}† (without adverse-risk genetic lesions)
	t(9;11)(p21.3;q23.3); *MLLT3-KMT2A*‡
	Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); *DEK-NUP214*
	t(v;11q23.3); *KMT2A* rearranged
	t(9;22)(q34.1;q11.2); *BCR-ABL1*
	inv(3)(q21.3q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); *GATA2,MECOM(EVI1)*
	−5 or del(5q); −7; −17/abn(17p)
	Complex karyotype,§ monosomal karyotypeǁ
	Wild-type *NPM1* and *FLT3*-ITD^{high}†
	Mutated *RUNX1*¶
	Mutated *ASXL1*¶
	Mutated *TP53*#

† Fréquence allélique faible (<0.5) ; Fréquence allélique élevée (≥ 0.5).

‡ La présence de la translocation t(9;11)(p21.3;q23.3) prévaut sur les mutations génétiques

§Présence de ≥3 anomalies chromosomiques hors des translocations, inversions et réarrangements recurrents suivants :t(8;21), inv(16) ou t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3)ou t(3;3) et horsLAM avec BCR-ABL1.

ǁ Présence d'une monosomie unique (excluant la perte de l'X ou du Y) en association avec une monosomie supplémentaire ou une anomalie structurelle chromosomique (exclut les LAM CBF).

¶ Ces marqueurs ne doivent pat être utilisés comme marqueurs pronostiques négatifs s'il sont associés à des sous-groupes de LAM à risque favorable.

Les mutations du gène *TP53* sont significativement associées aux LAM avec un caryotype complexe et monosomal.

3.2) Facteurs liés au patient

L'âge avancé est indépendemment associé à un pronostic défavorable. L'état de performance status (PS), la santé générale et les comorbidités modulent l'effet de l'âge sur la tolérance de la chimiothérapie ; malgré son importance pronostique, il ne doit pas être le seul déterminant dans les décisions thérapeutiques.

3.3) Facteur après traitement : Monitoring de la maladie résiduelle (MRD)

3.3.1) Définition de la MRD

La capacité de détection de la maladie résiduelle par les nouvelles méthodes cytométriques ou moléculaires, bien en dessous du seuil de 5% de la morphologie cellulaire, est un outil puissant pour mieux stratifier les patients à risque de rechute [81]. La maladie résiduelle minimale ou, de façon plus appropriée, maladie résiduelle mesurable, dénote la présence des cellules leucémiques jusqu'à des niveaux de $1:10^4$ à $1:10^6$ cellules. La MRD n'est pas applicable en cytologie ou en cytogénétique, ces techniques présentant un niveau de sensibilité à 1:20, en raison de leur technique analytique d'évaluation, strictement morphologique [82].

La MRD peut être évaluée 1) lors de la prise en charge initiale, par exemple, suite à l'induction ou la consolidation afin d'apprécier l'état de rémission des patients et la cinétique de la réponse ou 2) de manière séquentielle, après la consolidation pour détecter une rechute moléculaire. Plusieurs raisons amènent à utiliser les techniques de détection de la MRD dans les LAM : 1) établir un statut de rémission plus profond (rémission moléculaire), 2) affiner la prédiction du pronostic et guider le choix de traitement postrémission, 3) identifier précocement les rechutes afin d'intervenir plus rapidement, 4) avoir plus de robustesse pour la surveillance post greffe.

3.3.2) Techniques de détection de la MRD

Compte tenu de la diversité moléculaire des LAM, différentes plateformes de détection de la MRD sont disponibles. Deux méthodes sont actuellement largement appliquées : la cytométrie en flux et la PCR quantitative en temps réel. De nouvelles technologies comme la PCR digitale et le séquencage à haut débit émergent. Chaque méthodologie diffère dans la proportion des patients pour laquelle elle est appliquable et dans sa sensibilité de détection. Les techniques moléculaires sont détaillées dans le chapitre 5.

3.3.3) Marqueurs moléculaires de la MRD

La présence persistante de la mutation de NPM1 et des transcrits de fusion des gènes *RUNX1-RUNX1T, CBFB-MYH11* et *PML-RARA* suite à la thérapie est un facteur prédictif de rechute. Les patients porteurs de ces anomalies devraient bénéficier d'une évaluation moléculaire de la MRD, dont le niveau de sensibilité peut apporter des informations importantes pour la prise en charge thérapeutique des patients (sensibilité 10^{-4} à 10^{-5}) [82].

Dans les LAM promyélocytaires : la négativité de la RT-qPCR pour la recherche du transcrit *PML-RARA* après le traitement de consolidation constitue le point le plus important dans le suivi de la MRD ; cette négativité est associée à un risque de rechute moins élevé et une survie globale améliorée [83]. A la fin du traitement, une détection du transcrit *PML-RARA* par RT-qPCR, sur un prélèvement sanguin ou médullaire, confirmée par un deuxième échantillon, est un marqueur de rechute imminente de la LAM promyélocytaire [84].

Dans les LAM avec transcrit *RUNX1-RUNXIT1* : l'évaluation de la MRD pendant la phase de traitement est importante pour établir les taux de transcrits de base, mais les données concernant l'impact pronostique de la négativité de MRD chez ces patients sont contradictoires. Une diminution du transcrit au niveau médullaire de plus de 3 log entre le moment du diagnostic et la fin du traitement d'induction ou de consolidation est associée à

une différence significative en terme du risque de rechute. Cette réduction de 3 log est associée à une survie globale plus longue, en analyse multivariée [85]. Les patients n'ayant pas obtenu 3 log de réduction ont un pronostic plus défavorable, mais il est difficile de savoir si cela peut être amélioré avec une transplantation de cellules souches allogéniques.

Dans les LAM avec transcrit CBFB-MYH11 : malgré la valeur pronostique de la détection de la MRD en terme de prédiction de rechute, aucun effet n'a été noté sur la survie globale de ces patients dans les analyses multivariées probablement en raison d'un taux plus élevé de réponse au traitement de rattrapage chez cette catégorie de patients [86].

Dans les LAM qui ne présentent pas de marqueur spécifique de suivi, et cela concerne à peu près la moitié des patients, une approche alternative est la détection de la surexpression du gène *WT1,* qui reflète la présence de cellules blastiques. Le gène *WT1* est localisé sur le chromosome 11 et code pour un facteur de transcription appartenant à la famille des protéines "en doigt de zinc". Ce gène a été initialement décrit pour son implication dans la pathogenèse de la tumeur de Wilms. Il a été montré que ce gène est surexprimé dans plusieurs pathologies hématologiques y compris les LAM [87,88]. Même si les mécanismes de cette surexpression ne sont pas élucidés, ce phénomène peut être exploité comme un marqueur de la persistance ou de récidive de la LAM essentiellement chez les patients qui n'ont pas d'autres marqueurs de suivi.

4) Mutations *NPM1* dans les LAM

4.1) Généralités

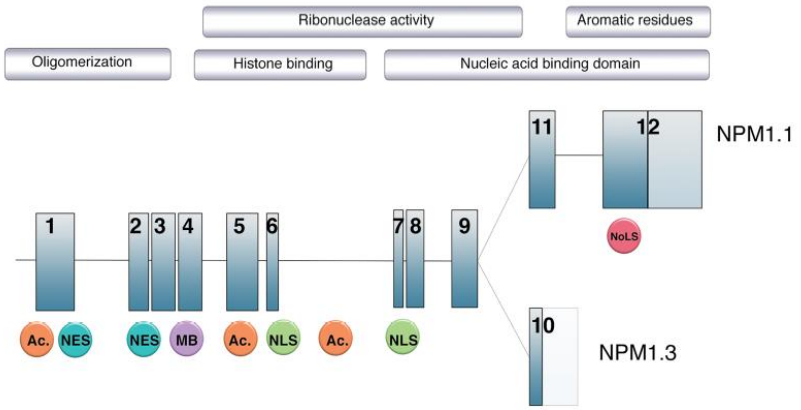
Le gène *NPM1* est l'un des plus fréquemment mutés dans les LAM, La mutation est présente dans environ 30% des cas [11]. Les mutations de *NPM1* représentent une entité à part dans la nouvelle classification de l'OMS 2016 [89]. Bien que la mutation ait été découverte il y a plus de

10 ans, les mécanismes précis par lesquels elle contribue à la leucémogenèse restent toujours non établis.

4.1.1) Structure du gène et de la protéine *NPM1*

NPM1 est le gène codant pour la nucléophosmine qui appartient à la famille nucléophosmine /nucléoplasmine [90]. Il est situé sur le chromosome 5 (5q35), contient 12 exons et code pour la protéine NPM*1,* phosphoprotéine exprimée de façon ubiquitaire dans l'organisme. Les activités biologiques de *NPM1* sont largement liées à sa structure [90] (**Figure 2**). L'extrémité N-terminale de la protéine est hydrophobe et contient deux signaux d'exportations nucléaires, ces motifs favorisant la translocation de la protéine du noyau vers le cytoplasme par interaction avec la protéine d'exportation *CRM1 (chromosome region maintenance 1)* [91'92]. L'extrémité N-terminale est responsable de l'auto-oligomérisation et de l'activité chaperone de *NPM1* et intervient dans l'interaction avec un certain nombre de protéines [90].

La région centrale de *NPM1* est composée de deux domaines acides qui jouent un rôle dans la liaison aux histones [93]. Cette région contient également un domaine de signal de localisation nucléaire (NLS) contribuant à la navette de *NPM1* du cytoplasme vers le noyau [94]. La région C-terminale est spécifique à la protéine NPM1 en comparaison avec d'autres protéines de la famille nucléophosmine/nucléoplasmine [90]. Ce domaine est responsable de la localisation au niveau du nucléole qui repose en grande partie sur le repliement de la protéine [94]. Ainsi la région aromatique de ce domaine est hautement conservée, notamment au niveau des acides aminés Tryptophane 288 et 290 qui assurent cette fonction de signal de localisation nucléolaire (NoLS) [11'95].



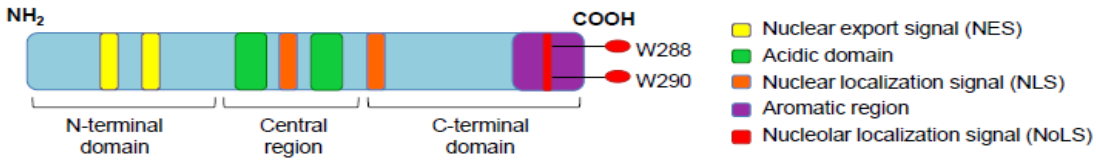


Figure 2 : Structure du gène et de la protéine NPM1 Extrait de Box et *al* [5], Heath et *al* [6]

4.1.2) Fonctions de NPM1

Bien que NPM1 possède les domaines permettant une localisation cytoplasmique, ou nucléaire, la protéine réside physiologiquement et principalement dans le nucléole (noyau). Elle peut être exportée vers le cytoplasme pour effectuer certaines fonctions via la liaison de CRM1 à des motifs NES [91]. Cependant dans des conditions physiologiques, l'importation nucléaire prédomine par rapport à l'exportation, et *NPM1* est localisée au niveau du nucléole pour assurer ses fonctions [96]. A ce jour, les fonctions les mieux connues de *NPM1* sont les suivantes : (**Figure 3**).

1) Biogenèse des ribosomes : grâce à sa capacité de fixation aux acides nucléiques, son activité ribonucléasique via notamment la région C-terminale [94] et sa fonction de navette facilitant le mouvement entre les sites de transcription de l'ARNr et l'assemblage

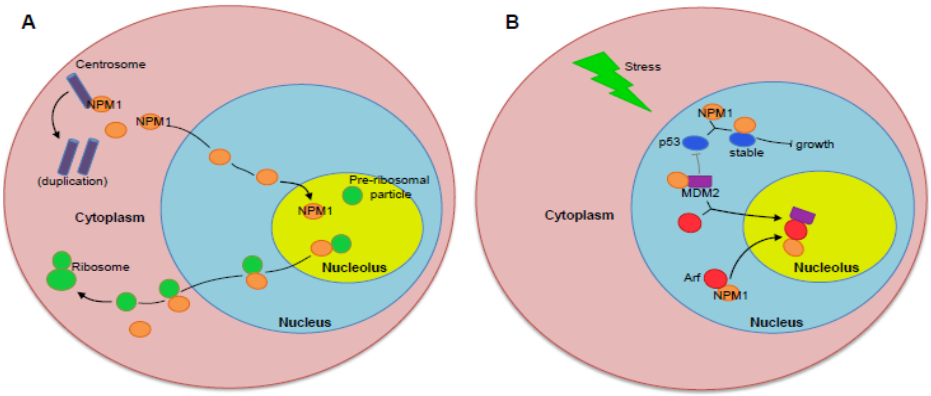
ribosomique, NPM1 participe à l'assemblage d'un grand nombre de protéines nécessaires à la biogenèse de ribosome.

2) Maintien de la stabilité génomique : pour maintenir la stabilité génomique, NPM1 aide à réguler la duplication du centrosome pendant le cycle cellulaire. Pendant l'interphase, NPM1 se lie aux centrosomes non dupliqués dans le cytoplasme pour éviter leur duplication. Au fur et à mesure que la cellule progresse vers la fin de la phase G1, NPM1 se dissocie du centrosome, aboutissant à une duplication de ce dernier. Elle reste non liée jusqu'à la fin de la mitose, puis elle se réassocie aux centrosomes, de sorte que chaque cellule fille reçoive un seul centrosome suite à la cytokinèse [97].

3) Réponse au stress : NPM1 joue un rôle essentiel dans la régulation du cycle cellulaire et de l'apoptose en potentialisant l'effet de la protéine p53 en réponse au stress ; il est à noter qu'il existe un lien fonctionnel entre l'intégrité nucléolaire et la stabilité de p53. Lors d'un stress, NPM1 se redistribue dans le cytoplasme où elle interagit directement avec p53, la rendant plus stable. Cet effet favorise l'arrêt du cycle cellulaire [98]. De plus, NPM1 stabilise indirectement la protéine p53 en inhibant MDM2 (*Mous double minute 2 homologue*), une E3-ubiquitne ligase qui provoque la dégradation protéolytique de p53 [99].

4) Modulation de l'apoptose : NPM1 agit également sur les voies apoptotiques via notamment ses interactions avec la protéine Arf *(Alternate reading frame*), une protéine suppresseur de tumeur, qui exerce ses effets soit en association soit indépendamment de p53 pour inhiber la prolifération cellulaire [100,101].

Figure 3 : Principaux rôles et fonctions cellulaires de NPM1. Extrait Heath et *al* [6]**.**



A) NPM1 se fixe sur les centrosomes non dupliqués pour éviter leur duplication, et se dissocie afin de permettre leur duplication, elle assure également le transport nucléaire des protéines pré-ribosomiques pour la biosynthèse de ribosome.

B) NPM1 module la réponse au stress via l'arrêt du cycle cellulaire en liant et stabilisant la protéine P53 dans le cytoplasme, et en inhibant la protéine MDM2. D'autre part, NPM1 se lie, stabilise et entraine la protéine Arf au niveau du nucléole. Celle-ci interagit avec la protéine MDM2 qui est également localisée à ce niveau, et empêche davantage l'inhibition de p53.

4.1.3) Mutation de *NPM1* : types et fréquence (**Figure 4)**

Les mutations de *NPM1* sont dans la très grande majorité des cas limitées à l'exon 12 [11]. A ce jour, plus de 55 mutations sporadiques ont été identifiées au niveau de l'exon 12 [102,103,104]. La plupart de ces mutations consistent en une insertion de 4 paires de bases survenant entre les nucléotides 861 et 894 ou à moins de 10 nucléotides en amont ou en aval [11]. La mutation la plus fréquente est appelée type A. Elle représente environ 80% des cas. Elle se caractérise par une duplication **TCTG** créant une insertion au niveau des nucléoitides 863-864 [105]. Les mutations de type B (insertion **CATG**) et D (insertion **CCTG**) représentent respectivement 9% et 3% des autres mutations. Les autres types de mutation sont rares (<1%). La fréquence des mutations non exon 12 n'est pas connue étant donné que la plupart des grandes études restreignent leur analyse à l'exon 12 [106]. Il est à noter que les mutations NPM1 sont toujours hétérozygotes [107] .

Type of Mutation	GenBank Accession No.	Sequence	Predicted Protein
None (wild type)	NM_002520	GATCTCTG....GCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQWRKSL
Mutation A	AY740634	GATCTCTGTCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutation B	AY740635	GATCTCTGCATGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCMAVEEVSLRK
Mutation C	AY740636	GATCTCTGCGTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCVAVEEVSLRK
Mutation D	AY740637	GATCTCTGCCTGGCAGT....GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLCLAVEEVSLRK
Mutation E	AY740638	GATCTCTG....GCAGTCTCTTGCCCAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLAQVSLRK
Mutation F	AY740639	GATCTCTG....GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTTAAGAAAATAG	-DLWQSLEKVSLRK

Figure 4 : Types, séquences d'acides nucléiques et séquences d'acides aminés de différentes formes de mutations NPM1 (variants A-F). Extrait de Falini et *al* [7]

4.1.4) Conséquence fonctionnelle des mutations *NPM1*

Quel que soit le type de mutation, tous les variants de l'exon 12 résultent en un décalage du cadre de lecture au niveau de la zone C-terminale ayant pour effet le remplacement des 7 acides aminés terminaux (WQWRKSL) par des séquences de composition différente en acides aminés. Ces séquences ont un motif C-terminal commun, constitué de cinq acides aminés (VSLRK), avec perte des deux acides aminés tryptophane situés au niveau de l'extrémité C-terminale (W288 et W290). Cette mutation crée un nouveau motif NES [11] et aboutit à un signal d'export nucléaire fonctionnellement plus fort que le signal d'import, contrairement au variant sauvage de NPM1 [96,108]. Par conséquent, il se produit une délocalisation aberrante cytoplasmique de la protéine [102,108]. La formation du nouveau motif NES à l'extrémité C-terminale et la perte des résidus de tryptophane en position 288 et/ou 290 sont tous les deux nécessaires à la délocalisation cytoplasmique de NPM1 mutant (NPM1c)[109]. (**Figure 5)**

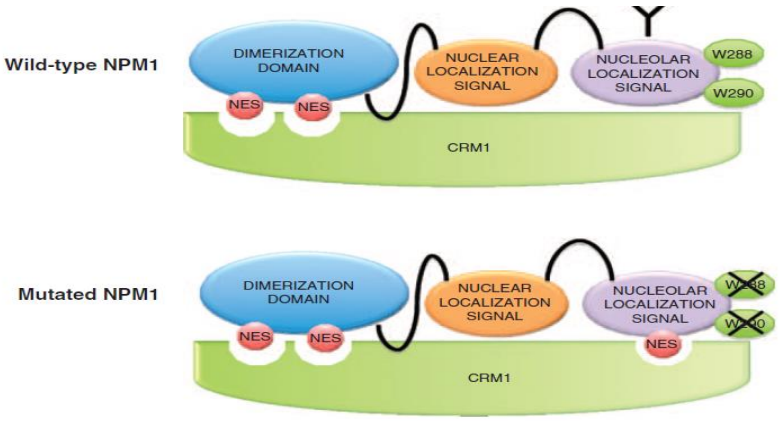


Figure 5 : Protéines NPM1 mutée et sauvage : la protèine mutée diffère du variant sauvage par l'absence des deux acides aminés Trytophane et la présence d'un nouveau motif NES à l'extrémité C-terminale de la protéine. La protéine CRM1, qui se lie spécifiquement aux protéines NPM1 à travers les motifs NES favorise la décolisation de NPM1 mutée vers le noyau. Extrait de Falini et *al* [7].

4.1.5) NPM1c et leucémogenèse

La délocalisation aberrante cytoplasmique est une caractéristique commune de toutes les mutations NPM1 et est probablement critique pour son rôle dans la leucémogenèse. Cependant les mécanismes exacts de la leucémogenèse n'ont pas été complètement élucidés.

Les données venant de l'expérimentation animale montrent que l'haploinsuffisance de NPM1 cause une duplication incontrôlée du centrosome, entraînant des centrosomes surnuméraires et l'aneuploïdie [107,110]. Cela suggère que la perturbation du rôle de NPM1 dans la stabilité génomique contribuerait au développement de la leucémie. De plus l'activité anti-tumorale de la protéine Arf dépend de l'interaction avec NPM1. Bien que le complexe NPM1-Arf soit formé dans les cellules mutantes, NPM1c est incapable de stabiliser Arf dans le cytoplasme ce qui entraîne une réduction de la demi-vie d'Arf [108,111]. La protéine NPM1c conserve la capacité d'interagir et d'inhiber l'activité protéolytique des caspases 6 et 8 clivées [112], ainsi l'accumulation de NPM1c peut perturber le flux de signal médié par les caspases et donc induire une perturbation dans les voies apoptiques. Bien que certains modèles animaux soient en faveur du rôle "*driver*" de NPM1c (évènement précoce et promoteur dans le développement des pathologies myéloïdes), la présence de NPM1c seule est insuffisante pour générer la leucémie. Cela suggère la nécessité d'un évènement coopératif pour la progression vers une transformation leucémique [107].

De récentes découvertes ont permis de classer les patients LAM porteurs de mutation *NPM1,* dans une entité à part entière dans la nouvelle classification de l'OMS de 2016, alors qu'ils étaient classés dans une entité provisoire dans la même classification datant de 2008.(**Tableau 1**).

4.2) Conséquences clinico-biologiques des mutations de NMP1

4.2.1) Morphologie et classification des LAM NPM1

L'analyse des données de la répartition des mutations du gène *NPM1* montre une détection de cette mutation dans les LAM issues de la lignée myéloïde (monocytaire, érythroïde et mégacaryocytaire) [113]. Bien que la mutation *NPM1* montre une association avec la plupart des sous-types de LAM FAB, elle est plus communément observée dans les LAM 4 et 5 chez les adultes et est rarement associée à une LAM 3 [11,103,114] . Les mutations du gène *NPM1* semblent être limitées à la lignée myéloïde, car une délocalisation cytoplasmique aberrante n'a pas été observée dans les nodules lymphoïdes réactifs ou les cellules B et T provenant de biopsie médullaire et/ou du sang périphérique [113,115]. Ces découvertes suggèrent que ces mutations surviennent au moins au niveau de progéniteur myéloïde commun ou qu'elles se produisent au niveau de la cellule souche hématopoïètique (CSH), ne fournissant pas d'avantage prolifératif au cours de la différenciation lymphoïde comme elles le font au cours de la différenciation myéloïde [115]. Ainsi les mutations persistent dans les cellules myéloïdes blastiques. Même si les altérations du gène *NPM1*, y compris les translocations, sont observées dans d'autres pathologies cancéreuses, les mutations *NPM1* avec délocalisation cytoplasmique aberrante de sa protéine sont spécifiques de la LAM [11]. Des mutations du gène *NPM1* ont été rapportées dans quelques cas de leucémie myélomonocytaire chronique (LMMC). Cependant tous les cas ont évolué vers une LAM en quelques mois, suggérant qu'il s'agissait de LMMC en voie de transformation. Ces données sont en faveur du statut muté NPM1 exclusif aux LAM [116].

4.2.2) Fréquence et manifestations cliniques

La fréquence de la mutation *NPM1* dans les LAM est de l'ordre de 30% variant selon les sources entre 25 à 41% [11,104,106], avec des mutations survenant généralement chez les sujets d'âge médian plus élevé (46-58) que les patients non muté pour *NPM1* (39-47) [42,106]. Dans la population adulte, la fréquence de la mutaion NPM1est plus élevée chez les femmes [103,104,114]. Les mutations du gène *NPM1* sont significativement plus fréquentes chez les patients ayant des caryotypes normaux. Ces mutations surviennent dans 45 à 64% des LAM avec caryotype normal [10,117]. Autrement dit, 85% des patients atteints de LAM avec la mutation *NPM1*, présentent un caryotype normal, alors que le reste des patients (15%) présentent des anomalies chromosomiques qui sont probablement des évènements secondaires [25]. En outre, les mutations *NPM1* sont stables au cours de l'évolution de la pathologie, elles disparaissent avec l'obtention de la rémission et réapparaissent avec la rechute, suggérant leur utilité dans la surveillance de la maladie résiduelle [81,117]. La mutation du gène *NPM1* peut ne pas être détectée lors de la rechute ; dans ce cas il est possible que la rechute soit liée à un sous-clone minoritaire non muté pour le gène *NPM1* au moment du diagnostic ou que la rechute soit due à l'acquisition d'une autre mutation (différente de NPM1) survenant dans les cellules préleucémiques [48]. Cette dernière hypothèse suggère qu'une rechute avec perte de mutation du gène *NPM1* peut représenter une LAM sans rapport avec la leucémie d'origine [81,117]. Parmi les autres caractéristiques cliniques associées aux mutations de *NPM1* dans la LAM, on peut citer le taux plus élevé de blastes dans la moelle osseuse [106,117], le taux plus élevé de leucocytes [10,42] , une augmentation de la numération plaquettaire au moment du diagnostic [103,104,117]. Les mutations du gène *NPM1* sont également associées à une expression réduite de CD34 dans les cellules blastiques [117,118] une augmentation de l'expression de CD33 [119] et une atteinte extramédullaire plus fréquente [103].

4.3) Mutations associées à NPM1

Les mutations secondaires sont fréquentes chez les patients LAM avec la mutation du gène *NPM1* .Les mutations les plus fréquemment associées sont essentiellement les mutations des gènes *FLT3* et *DNMT3A* mais d'autres mutations peuvent aussi co-exister avec la mutation du gène *NPM1* comme celles des gènes *IDH1*, *KRAS*, *NRAS* et des gènes de complexe de cohésine. La **Figure 6** illustre les mutations associées à la mutation du gène *NPM1* et leur fréquence d'association chez les patients LAM.

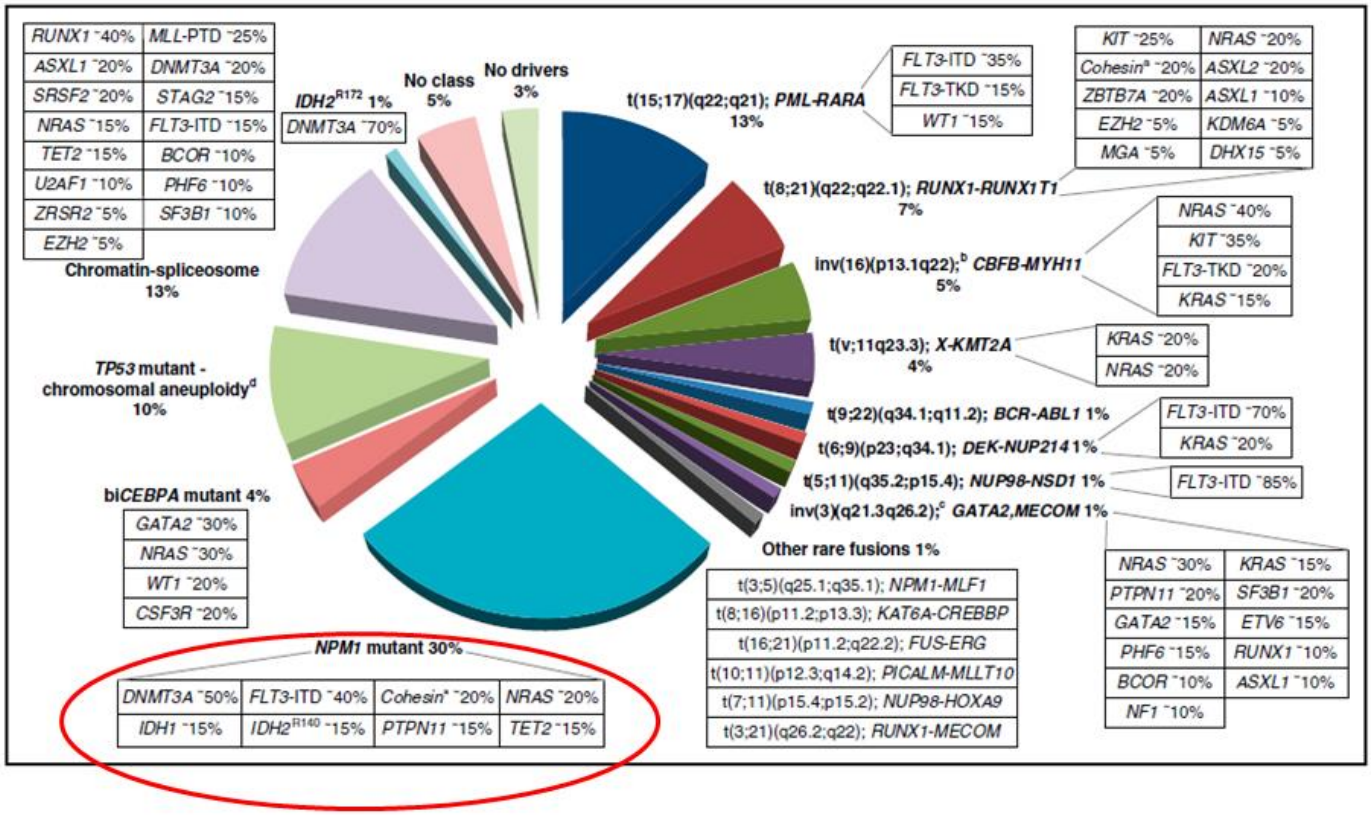


Figure 6 : Différentes classes de LAM : La fréquence des mutations associées à la mutation NPM1 chez 1540 patients LAM. Extrait de Estey et *al* [1]

4.3.1) *NPM1 & FLT3-ITD*

La duplication interne en tandem de *FLT3 (FLT3-ITD)*, est environ deux fois plus fréquente chez les patients avec mutation de *NPM1* que chez les patients non mutés pour *NPM1* [106,117]. Les investigations concernant la chronologie de l'acquisition des mutations ont révélé que la mutation *NPM1* précède probablement celle de *FLT3-ITD,* qui constitue un évènement génétique secondaire au cours de la leucémogenèse [104].

4.3.2) NPM1 & DNMT3A

Comme la mutation *FLT3-ITD,* il existe une association forte entre les mutations *NPM1* et *DNMT3A*. Contrairement à la mutation *FLT3-ITD*, la mutation *DNMT3A* est un évènement qui précède la mutation de *NPM1* [14,48].

4.3.3) NPM1 & Autres mutations

En plus de l'association notable entre les mutations *NPM1* et FLT3-ITD ou DNMT3A, les mutations de *NPM1* sont associées aussi aux mutations des gènes *IDH1*, *IDH2* et *TET2* [14]. Par contre les anomalies cytogénétiques récurrentes y compris *PML-RARA*, *MYH11-CBFB* et les anomalies de fusion du gène *MLL* ne sont presque jamais associées à la mutation du gène *NPM1* [2]. Des preuves récentes montrent que ces associations peuvent être plus complexes qu'on ne le pensait auparavant, et qu'elles peuvent être limitées à des mutations spécifiques. Par exemple, la mutation *NPM1* s'associe préférentiellement a) avec la mutation $NRAS^{G12/13}$ mais pas à la mutation $NRAS^{Q61}$, b) avec IDH^{R140} mais pas avec IDH^{R172} [120] et c) avec *CEBPA* monoallélique mais pas *CEBPA* biallélique [121,122].

4.4) NPM1 : Marqueur pronostique

Dans le contexte de LAM-CN, la présence de la mutation *NPM1* (en l'absence de la mutation *FLT3-ITD*) est associée à un pronostic favorable [103]. Les données ont montré que la mutation isolée de *NPM1* est associée à un taux plus élevé de rémission complète, de survie sans évènement et de survie globale [42,123] . Les patients *NPM1* muté/*FLT3 s*auvage, ont une survie à 5 ans approchant celle des patients avec anomalie cytogénétique de bon pronostic comme les LAM-CBF [103]. De ce fait, les patients mutés pour le gène *NPM1* sans anomalie *FLT3-ITD* ne reçoivent généralement pas de greffe de cellules souches allogéniques en première remission [123]. Les récentes études ont montré que les patients avec la mutation du gène *NPM1* et *FLT3-ITD* avec une fréquence allélique faible (<0.5) ont un pronostic favorable comme les patients ayant la mutation du gène *NPM1* isolée. De ce fait ces patients sont classés dans la catégorie favorable. En revanche, les patients mutés pour le gène *NPM1* et *FLT3-ITD* avec une fréquence allélique élevée (≥0.5) ont un pronostic plus défavorable par rapport aux patients présentant la mutation du gène *NPM1* isolée. Ces patients sont classés dans la catégorie intermédiaire (Tableau 5). La mutation *DNMT3A* pourrait influencer l'impact pronostique de la mutation *NPM1*, bien que ces données restent à confirmer [124].

4.5) NPM1 : Marqueur de la maladie résiduelle

Comme décrit précédement, les mutations de *NPM1* sont stables au cours de l'évolution de la LAM ; elles sont donc des marqueurs moléculaires intéressants pour le suivi de la MRD [12] . La persistance de la MRD suite à des traitements conventionnels (chimiothérapie) peut avoir des impacts thérapeutiques notamment sur la décision d'allogreffe. Des études ont révélé que l'évaluation de la MRD du gène *NPM1* après le traitement d'induction et/ou après la consolidation sont les moments les plus adaptés pour identifier les patients à risque de rechute [125,126,127]. Une étude relativement récente a montré une association entre la persistance du

transcrit *NPM1* muté dans le sang périphérique après le second cycle de chimiothérapie et le risque de rechute. La survie globale est également diminuée chez ces patients [128].

5) Méthodes moléculaires de détection de la MRD

5.1) RT-qPCR

C'est actuellement la méthode la plus utilisée et la mieux standardisée pour la quantification du transcrit *NPM1* dans le suivi de la maladie résiduelle. L'analyse est effectuée sur l'ARN, en réalisant d'abord la transcription inverse (RT) pour générer l'ADN complémentaire (ADNc) avant l'étape de PCR quantitative. Malgré sa sensibilité élevée, l'application de cette méthodologie est limitée par le besoin d'une courbe d'étalonnage et la nécessité d'avoir un gène de référence pour quantifier les résultats. Il s'agit donc d'une quantification relative du transcrit NPM1, sous forme d'un pourcentage de ratio « muté/ normal » par rapport au gène de référence *ABL* [129] .

5.2) Séquencage de nouvelle génération (NGS)

La technologie NGS permet un débit beacoup plus élevé en utilisant soit le "séquençage par la synthèse" soit la chimie "terminaison de chaîne". Le séquençage par la synthèse incorpore des avancées de la technologie fluidique permettant la traduction directe en séquences des acides nucléiques [130]. Le séquençage parallèle à haut débit permet de multiplexer plusieurs cibles de plusieurs échantillons au cours d'une seule expérience, avec une sensibilité élevée. Bien que les études soulignent la valeur et le potentiel du NGS dans le suivi de la MRD, les obstacles techniques persistent. En effet, les procédures de préparation de la bibliothèque, le taux d'erreur inhérent aux algorithmes de lecture des séquences, la complexité d'analyse bio-informatique des résultats et la limite de sensibilité de l'ordre de 1% [131], rendent actuellement cette technologie difficilement applicable et peu adaptée au suivi de la maladie résiduelle.

5.3) PCR Digitale :

5.3.1) Définition, Concept de base

Le concept de PCR digitale a été introduit dans les années 1990, lorsque les investigateurs ont conçu des stratégies de dilution pour répartir une seule réaction de PCR en de nombreuses réactions permettant l'amplification des molécules d'ADN contenues dans les échantillons de manière individuelle sous forme de partitions [132,133] (**Figure 7**). En isolant pas plus d'une molécule d'ADN par partition, la réaction de PCR va être convertie en un mode digital, autrement dit, la sortie du signal va être soit positive soit négative, permettant ainsi une quantification absolue. Les progrès technologiques notamment dans le domaine de nano-fluidique permettent désormais de fractionner les molécules des échantillons en milliers voire en millions de gouttelettes "eau-huile" dans lesquelles la réaction de PCR de la cible va se produire : on parle de droplet digital PCR (ddPCR). En parallèle, les systèmes à base de puce réalisent des réactions en gouttelettes et distribuent les réactions de PCR dans des plateformes fluidiques de l'ordre du nanolitre. Plusieurs plateformes commerciales sont disponibles.

La PCR digitale représente une technique prometteuse, sensible, spécifique et adaptable aux profils particuliers des patients, sur plusieurs types de cancers [134]. Compte tenu de la diversité des mutations somatiques et des aberrations chromosomiques dans la pathogénèse des LAM, la ddPCR est un outil intéressant pour cibler les marqueurs de la MRD, spécifiques de chaque patient. Etant donné que c'est une méthode basée sur la chimie des sondes, elle peut être utilisée dans la détection des régions "*Hot spots*" correspondant à des séquences de type sauvages, mutées et/ou les changements structurels, en concevant des sondes spécifiques pour chaque cible et en prenant en considération les caractéristiques moléculaires du patient [135].

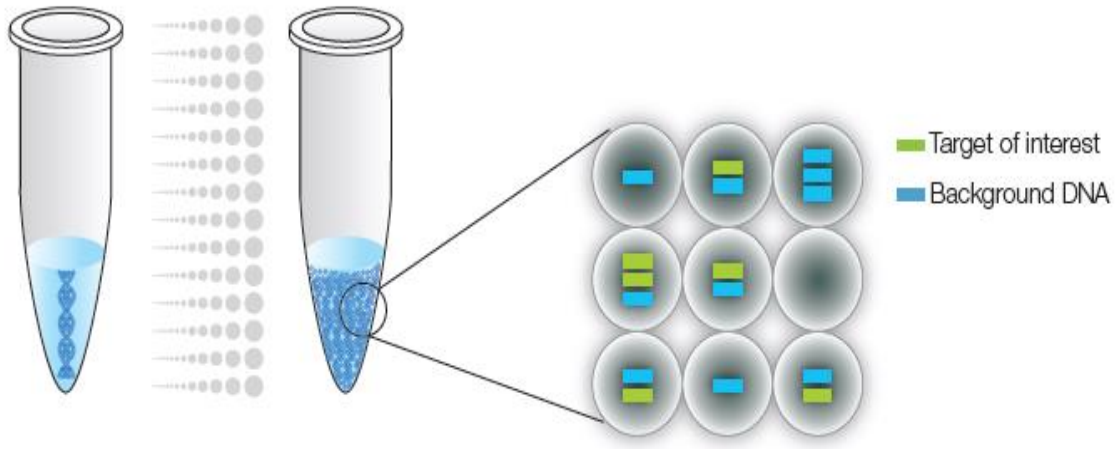


Figure 7: Répartition de molécules cibles dans de nombreuses partitions individuelles ; Extrait du guide d'application ddPCR BIORAD [136].

5.3.2) Déscription générale de la méthode

La dPCR est une technique analytique précise pour quantifier les acides nucléiques sans avoir besoin de réaliser une courbe d'étalonnage. Les recommandations internationales de publication, relatives à l'utilisation de la technique de PCR digitale "*The digital minimum information for publication of quantification digital PCR experiments (dMIQE) equivalent guideline*" ont été publiées pour faciliter la terminologie unifiée pour la dPCR et identifier les paramètres nécessaires pour l'évaluation indépendante des données expérimentales [137]. Les terminologies les plus courantesdans la technique de dPCR sont : les partitions, le facteur Lambda (λ), la loi de distribution de Poisson.

Une partition est l'espace fixe dans lequel se trouve une molécule de cible de PCR. Il peut s'agir d'un petit puits ou d'une gouttelette d'émulsion eau/huile d'un volume de l'ordre du nanolitre ou picolitre. Le facteur Lambda (λ) représente la moyenne des nombres de copies de cible dans chaque partition, il est estimé en applicant la loi de distribution de Poisson en tenant compte du

nombre des partitions positives (K) par réaction sur l'ensemble des partitions (N) selon l'equation suivante :

$$\lambda = -\ln(1-K/N)$$

L'estimation du nombre de copies dans l'échantillon est obtenue en utilisant le facteur λ, N et le volume de réaction. La loi de distribution de Poisson est un cas particulier de la loi de distribution binomiale décrivant la probabilté d'un évènement rare (molécule de cible) dans une partition de taille fixe. L'application de la loi de poisson dans la dPCR présente l'avantage de corriger la possibilité qu'une partition positive contienne plus d'une molécule cible (**Figure 8**). Les critères pour pouvoir appliquer la loi de Poisson sont : 1) une grande population (partition) de taille fixe, 2) un évènement donné, 3) un résultat binaire pour cet évènement et 4) une distribution aléatoire de l'évènement. L'estimation de la quantification dépend du nombre de partitions, du volume d'échantillon interrogé et de la concentration de cible dans l'échantillon [138]. Lorsque le volume de l'échantillon n'est pas limitant, l'augmentation du nombre de partitions augmente la sensibilité. La quantification d'une cible rare nécessite d'un nombre plus élevé de partitions alors que les échantillons dont le nombre de cibles est plus important nécessitent moins de partitions.

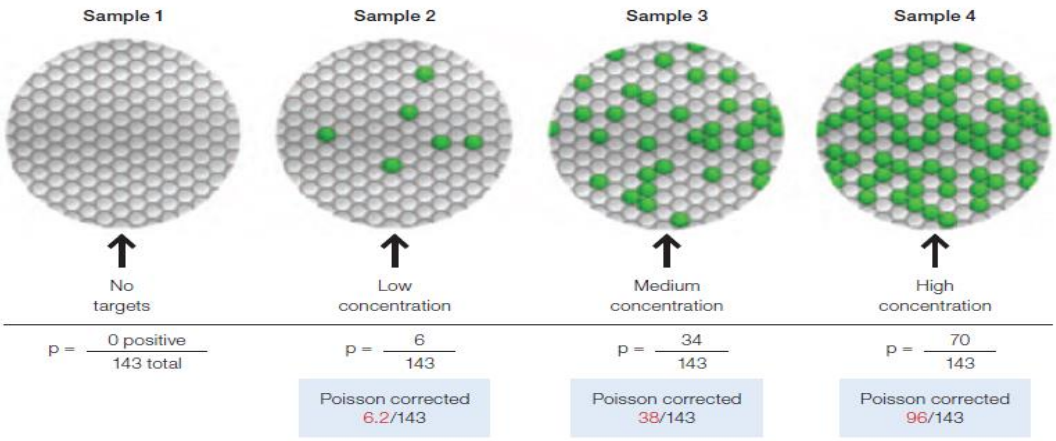


Figure 8 : Application de la loi de poisson permettant de corriger la possibilité qu'une partition posède plus d'une molécule de cible ; Extrait du guide d'application de ddPCR BIORAD.

5.3.3) Principe

Actuellement, il existe plusieurs approches utilisées par les systèmes de dPCR disponibles sur le marché. La première approche utilise les micropuits ou des chambres microfluidiques divisant l'échantillon en centaines de partitions de l'ordre du nanolitre. Les puces microfluidiques simplifient la configuration de la réaction, mais sont difficiles à mettre en oeuvre pour atteindre un débit élevé. La deuxième approche appelée BEAming, est basée sur la PCR en émulsion, procédure durant laquelle les cibles vont être amplifiées en présence de billes. Après la PCR, les billes vont être récupérées et marquées avec les sondes d'hybridation de fluorescence et lues par cytométrie en flux classique. Le système BEAming nécessite des schémas d'analyses hétérogènes et compliqués limitant ainsi ses applications, comme la détection des allèles rares et la méthylation de l'ADN [139]. La troisième méthode est une approche qui utilise les gouttelettes d'eau dans l'huile, qui constitue une avancée technologique prometteuse pour la réalisation de la PCR digitale à haut débit dans un format pratique et économique. C'est cette troisième approche qui a été retenue pour la suite de notre projet. Elle utilise des circuits microfluidiques simples et des agents tensioactifs pour diviser le mélange réactionnel initial constitué de 20µl

d'échantillon et de réactif en à peu près 20000 gouttelettes monodispersées (partitions). Ces gouttelettes sont le support de la réaction de PCR. Celle-ci étant identique à celle d'une PCR en temps réel, avec, par exemple, l'utilisation d'une chimie de type TaqMan. Après la PCR, un cytomètre en flux automatisé réalise la lecture simultanée de la fluorescence des gouttelettes contenant les signaux des variants sauvages et mutés via deux canaux de lecture, à un débit de 32 puits/heure. (**Figure 9**).

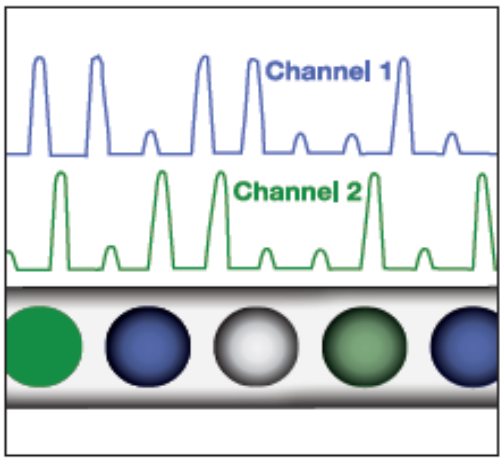


Figure 9 : lecture simultanée de chaque gouttelette à travers deux canaux ; Extrait du guide d'application ddPCR BIORAD.

Des réactions de PCR, comprenant chacune un échantillon, un mix réactionnel de ddPCR et la sonde de TaqMan sont chargées dans des puits individuels d'une cartouche à usage unique. Ensuite l'huile de génération de gouttelettes contenant des agents tensioactifs et stabilisants est chargée dans la cartouche, laquelle va être placée dans le générateur de gouttelettes. En appliquant un vide aux puits de sortie, l'échantillon et l'huile vont être aspirés à travers une jonction focalisant l'écoulement dans laquelle des gouttelettes monodispersées sont générées à raison de 1000 par seconde. Ces gouttelettes stabilisées par un agent tensioactif s'écoulent

vers un puits de collecte où elles se concentrent en raison de la différence entre la densité des phases aqueuse et huileuse, formant un lit tassé au-dessus de l'huile en excès. Les gouttelettes sont ensuite transférées dans une plaque de PCR classique de 96 puits et soumises à un cycle thermique jusqu'au point final, puis la plaque est transférée dans un lecteur de fluorescence des gouttelettes. Les gouttelettes de chaque puits sont alors aspirées et difusées vers le détecteur, lequel en injectant un fluide d'espacement les sépare et les aligne pour une détection simultanée des marqueurs fluorescents. Les tests basés sur la chimie TaqMan fournissent une détection duplex spécifique des gènes cibles et sauvages (références). Toutes les gouttelettes vont être paramétrées en fonction de la largeur du pic du détecteur pour exclure celles dont la dimension est aberrante (doublet, triplets,…). Pour les gouttelettes englobant les cibles, le clivage spécifique des sondes TaqMan génère un fort signal de fluorescence. Sur la base de l'amplitude de fluorescence, un seuil simple affecte chaque gouttelette comme positive ou négative. Comme le volume des gouttelettes est connu, la fraction de gouttelettes positives est utilisée pour calculer la concentration absolue de la séquence cible. Cette étape est assurée par un logiciel informatique qui trace des données de lecture de chaque canal, le canal 1 détectant le variant sauvage (dans l'exemple de la **Figure 10**) et le canal 2 détectant le variant muté. Etant donné que la distribution des molécules cibles à l'interieur des gouttelettes est aléatoire, les gouttelettes vont être tracées en quatre zones de nuages. 1) la zone double négative 2) la zone positive pour le canal 1 mais négative pour le canal 2 (variant sauvage ou muté en fonction de la sonde) 3) la zone positive pour le canal 2 mais négative pour le canal 1 (variant sauvage ou muté en fonction de la sonde) 4) la zone double positive. Le principe de dPCR est illustré dans la **Figure 10**. La notion de groupement des différentes populations des gouttelettes est illustrée dans la **Figure 11**.

Figure 10 : Principe de fonctionnement de ddPCR. Extrait de Perez et *al* [8]

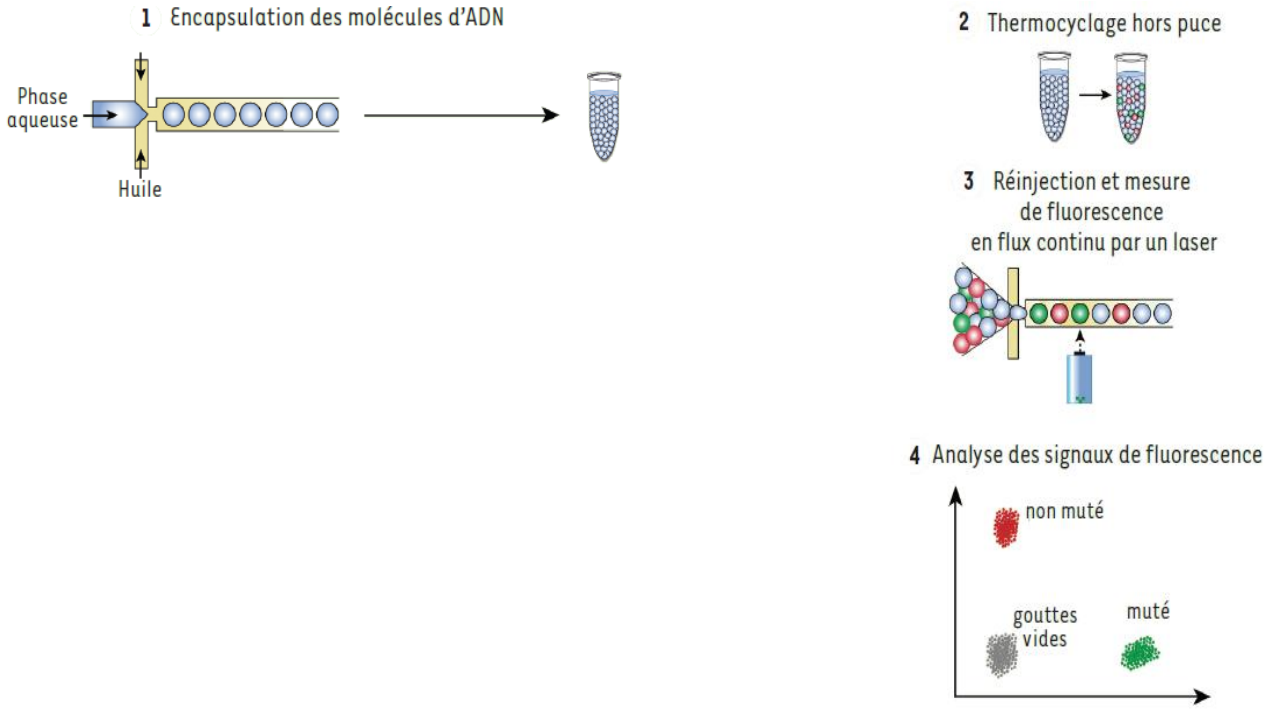
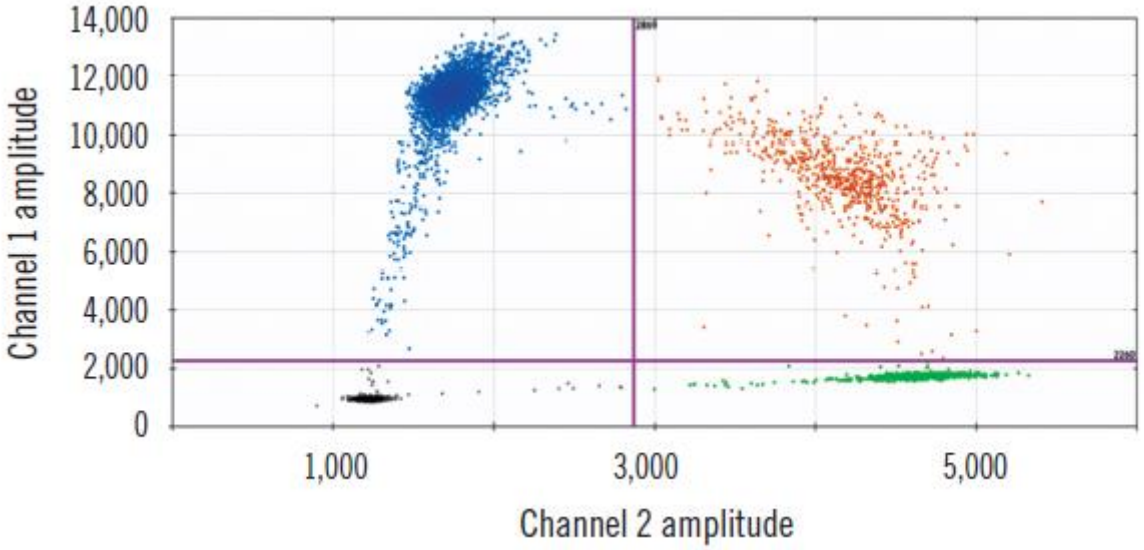


Figure 11 : Illustration de la détection des variants sauvage et muté par les canaux de lecture.Les axes représentent l'intensité de la fluoresence. Les variants mutés et sauvages sont représentés par les nuages bleu et vert respectivement, le nuage orange représente la présence simultanée des deux variants à l'intérieur des gouttelettes. Extrait de Eunyong et *al* [9]



5.3.4) Applications de la dPCR et ses avantages

La dPCR offre plusieurs avantages techniques clés par rapport aux autres formats de PCR dans les applications suivantes :

1) **Mesure de variant rare** : la dPCR a été initialement développée pour étudier la mesure de cibles minoritaires, pour lesquelles des variants rares sont recherchés en présence d'un grand nombre de séquences de type sauvage [132,133] (**Figure 12**).

La détection et la quantification des variants rares peuvent constituer un outil utile dans plusieurs cas de figures tels que le diagnostic et le suivi de la maladie résiduelle. En effectuant le partitionnement des échantillons contenant des variants rares, le fond du signal provenant du génotype sauvage est réduit, augmentant ainsi la probabilité que le variant rare soit détecté dans chaque partition qui le contiendrait. Des fréquences de variants aussi faibles que 1 sur 100 000 ont été mesurées par de telles méthodes [138,140] . A mesure que le nombre de partitions augmente, la sensibilité augmente également, fournissant une alternative rentable pour l'analyse de variants rares.

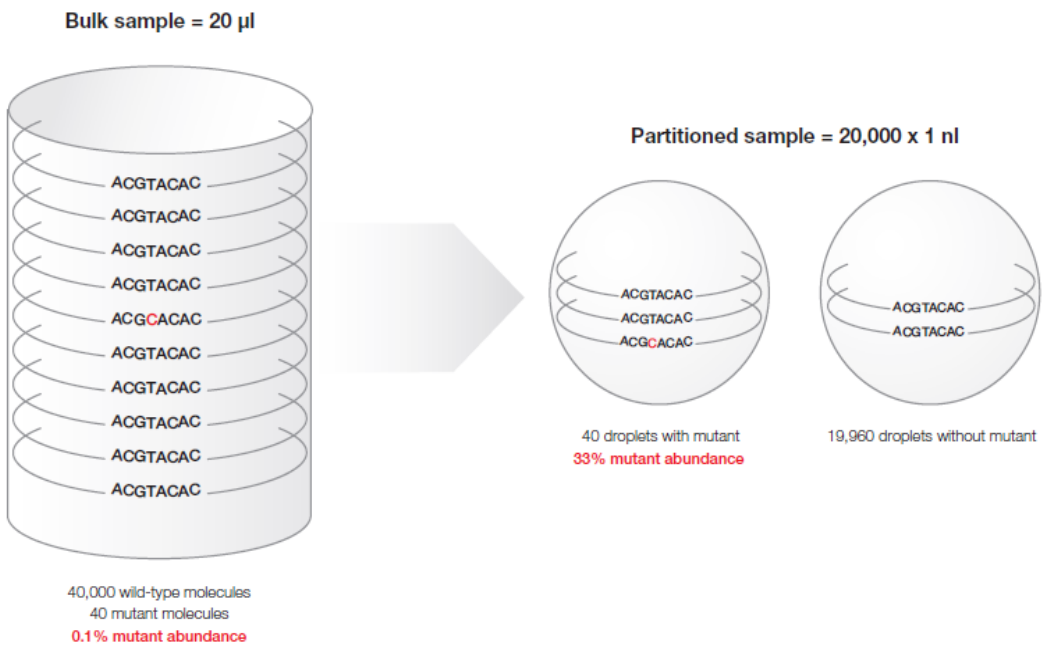


Figure 12 : Détection d'une séquence rare mutée au sein d'un grand nombre de variants sauvages. Le partitionnement augmente les chances de détection du variant rare. Extrait du guide d'application ddPCR BIORAD.

2) **Comptage moléculaire :** contrairement à la RT-qPCR, dans laquelle le cycle de quantification (Cq) dépend de paramètres variables tels que l'instrument, la sonde rapporteur de fluorescence et l'efficacité de l'amplification, la dPCR repose sur un simple comptage du nombre de réactions d'amplifications réussies. Le comptage des partitions positives dans une PCR est définitif et ne nécessite pas de courbe d'étalonnage pour convertir les Cq en nombres de copies, sachant le nombre de partitions et le volume sont suffisants, rendant en théorie la dPCR plus répétable et plus reproductible [137].

3) **Applications nécessitant une grande précision** : ces mesures précises sont souvent nécessaires lorsque les variations en nombre de copies du gène sont associées à une anomalie chromosomique comme par exemple l'aneuploïdie chromosomique fœtale [141]. La dPCR peut être plus précise que la RT-qPCR. Cette précision est applicable même pour de très faibles nombres de copies [142]. Cependant il est nécessaire d'être prudent en exposant cet avantage de la dPCR, car elle est actuellement moins utilisée et moins standardisée que la RT-qPCR. D'autre part la précision dépend aussi du nombre moyen de molécules dans les partitions, conditionné par la concentration de cibles dans l'échantillon et la manière dont il a été préparée (Extraction) [143,144].

Le **Tableau 6** récapitule les données comparatives de dPCR par rapport à la RT-qPCR.

4) **Autres applications** : l'utilisation de la dPCR a été aussi décrite dans la détection de l'ADN tumoral libre circulant, comme par exemple la détection de la mutation de l'oncogène *KRAS* dans les cancers colo-rectaux, la détection de la mutation du gène *EGFR* dans les cancers pulmonaires, et la détection de la surexpression *HER2* dans les cancers du sein [145]. Il existe aussi des applications dans le diagnostic des pathologies virales [146] et le diagnostic prénatal [141].

Tableau 6 : Comparaison des techniques de RT-qPCR et de dPCR. Extrait de Alikian et *al* [3].

RT-qPCR	dPCR
Quantification relative par rapport à un gène de référence et nécessité d'avoir une courbe de standard	Quantification absolue. Pas besoin de gène de référence et de courbe de standard (sauf pour évaluer la qualité de l'échantillon et l'efficacité des étapes pré-PCR, en particulier lors de la quantification de l'ARN)
Sensibilité et précision théoriquement moins bonnes lorsqu'il s'agit d'une quantité faible de molécule cible	Sensibilité augmentée par l'augmentation du nombre de partitions et du volume d'échantillon. Prévision de la précision de mesure grace à l'application de la loi de Poisson. Sensibilité diminuée lorsque les partitions sont saturées avec la meilleur précision pour λ= 0.6-1.6
Dépend de la chimie des sondes, de l'efficacité de l'amplification et de la calibration de l'instrument	Dépend de la chimie des sondes et de la calibration de l'instrument
Amplification compétitive qui masque la détection de cibles d'abondance faible	Amplification d'une seule molécule et détection basée sur le rapport signal/bruit du fond

6) Objectifs de l’étude

Les objectifs de notre projet s’articulent autour de deux axes :

i) Mettre au point et valider la technique de PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) en étudiant sa faisabilité sur l’ADN génomique (ADNg) et l’ADN complémentaire (ADNc), et déterminer les paramètres biologiques de la PCR (validation de la sonde, limite de détection, limite de spécificité…).

ii) Evaluer les performances de cette technique pour la détection et la quantification du biomarqueur *NPM1* type A dans le sang, en évaluant son intérêt pour le suivi de la maladie résiduelle et réaliser une étude observationnelle de concordance avec le biomarqueur WT1 d’une série rétrospective de patients LAM NPM1 muté.

PARTIE 2) Matériels et Méthodes

1) Matériels : lignée, patients, témoins

1.1) Lignée cellulaire

Les expériences ont été réalisées sur la lignée cellulaire OCI/AML3. Cette lignée a été établie à partir du sang périphérique d'un patient ayant eu une LAM-M4 de classification FAB, diagnostiquée en 1987 [147]. L'immunophénotypage montre les marqueurs suivants : CD3−, CD4+, CD13+, CD14−, CD15+, CD19−, cyCD68+ et HLA-DR−.

Le caryotype est hyperdiploïde complexe :

48(45-50)<2>X/XY,+1,+5,+8,der(1),t(1;18)(p11;q11),i(5p),del(13)(q13;q21), dup(17)(q21q25).

Les cellules portent la mutation hétérozygote du gène de *NPM1* type A avec duplication TCTG au niveau de l'exon 12. Une mutation du gène *DNMT3A* sans la mutation du gène *FLT3* est également retrouvée [147]. Pour vérifier la conformité de la lignée, un caryotype en bande R et une méthode de séquençage de Sanger sont réalisés.

1.2) Témoins

Au total, 4 prélèvements médullaires ont été choisis comme échantillons de contrôle. Parmi ces prélèvements, trois cas avaient un diagnostic de leucémie aiguë myéloïde et un cas avait un bilan d'investigation pour une cytopénie. Pour l'ensemble de ces cas la recherche de la mutation du gène *NPM1* type A a été réalisée par la méthode de l'analyse de taille de fragments. Tous les cas étaient négatifs pour la mutation du gène *NPM1*.

Pour l'évaluation de la limite de spécificité des sondes, trois autres cas de LAM ont été étudiés :

- un cas porteur du variant B de la mutation NPM1 (insertion CATG, soit deux nucléotides différents du variant A).

- un cas porteur du variant D (insertion CCTG, soit un seul nucléotide de différence avec le variant A) (**Figure 4**)

- un cas porteur d'un variant rare non-A, non-B et non-D dont la séquence a été analysée par la méthode Sanger, mettant en évidence une insertion de 4 paires de bases en position 867.

Variant rare (résultat après séquençage Sanger) :

NPM1 Sauvage : AGAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAG - - - - TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATA
NPM1 muté : AGAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAG **CGGA** TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATA

1.3) Patients

Quatorze patients avec une LAM NPM1 mutée type A avaient été initialement identifiés. Nous avons focalisé notre étude sur les patients dont le matériel biologique a pu être conservé sur site et en parallèle analysé au CHU de Lille par la technique de référence (RT-qPCR).

Au total, 31 échantillons de sang périphérique et 6 échantillons médullaires de 10 patients ont été sélectionnés. Parmi ces prélèvements, 12 échantillons correspondaient au bilan diagnostic initial et 25 autres échantillons correspondaient au suivi des patients. Chez ces patients, la surexpression du marqueur WT1 au bilan initial a permis de l'utiliser comme marqueur de suivi de la MRD. Les prélèvements médullaires ont été également évalués pour 3 patients parmi l'ensemble des patients pour le marqueur NPM1 dont les résultats étaient disponibles (RT-qPCR réalisé au CHU de Lille). Au final, 37 échantillons ont été étudiés en ADNc et 4 en ADNg.

La **Figure 13** résume la répartition des échantillons de patients analysés dans notre projet

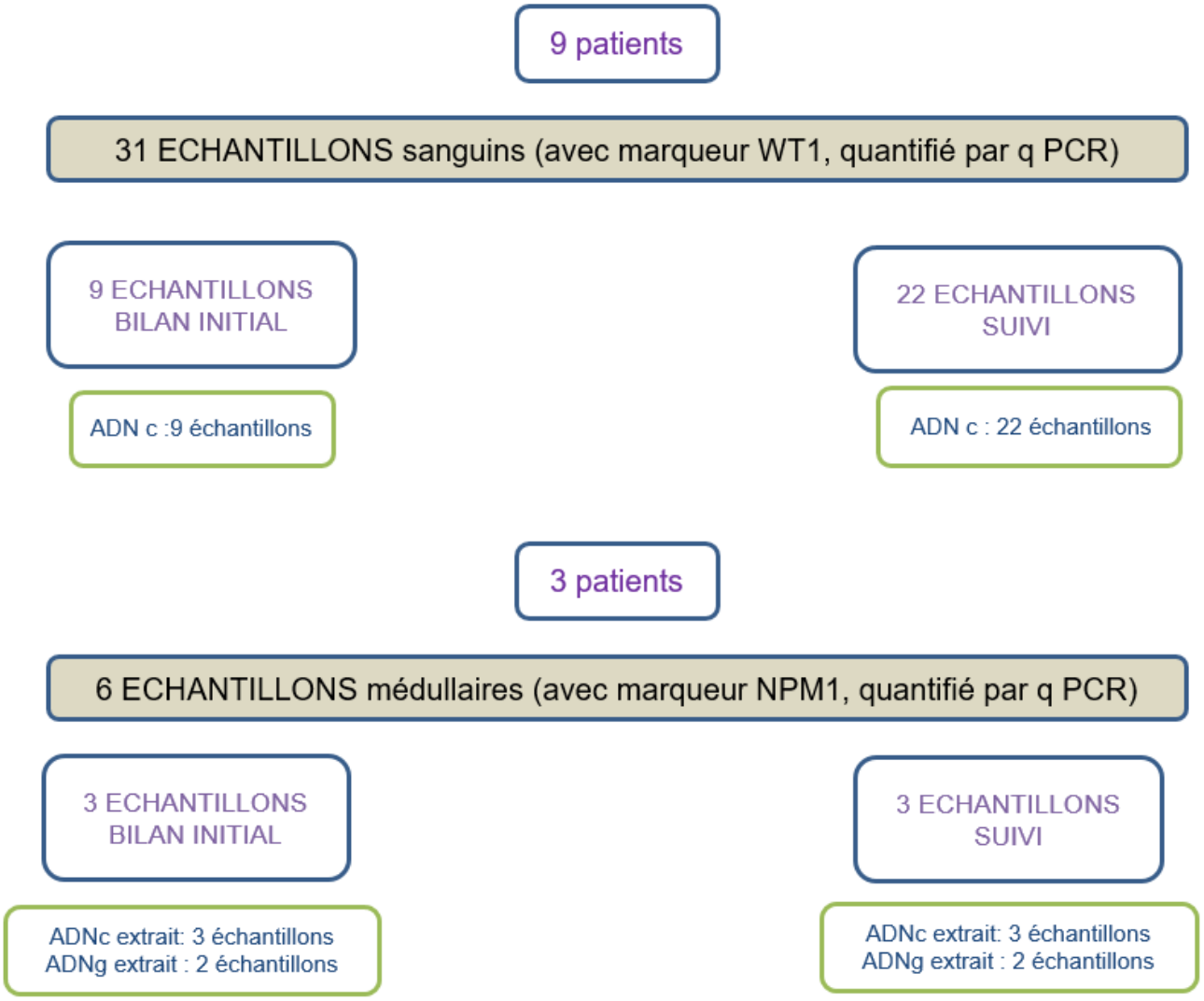


Figure 13 : Patients et échantillons sélectionnés pour la quantification de NPM1 par dPCR

2) Méthode : PCR Digitale

2.1) Amorces et sondes

Le schéma des amorces et sondes pour la détection de la mutation *NPM1* de type A est représenté sur la **Figure 14**.

Les amorces et sondes ont été conçues par BIO-RAD et sont les suivantes :

-Primer sens : F-GGTTCCTTAACCACATTTCT,

-Primer anti-sens : R-GAAATAAGACGGAAAATTTTTTAAC,

-Sonde ciblant le variant sauvage : AGATCTCTGGCAGTGGA couplée au fluorophore HEX (longueur d'onde d'excitation/lecture : 535 nm/556 nm),

-Sonde ciblant le variant muté : CAAGATCTCTGTCTGGCA couplée au fluorophore FAM (longueur d'onde d'excitation/lecture : 494 nm/518 nm). Une seule paire d'amorces est donc couplée à deux sondes selon le principe de la PCR compétitive : une sonde marquée par FAM détecte le variant muté NPM1 type A et entre en compétition avec l'autre sonde, marquée par HEX, qui détecte le variant sauvage.

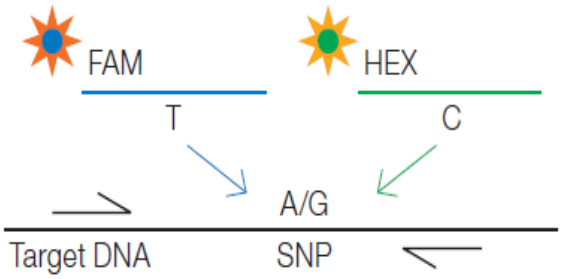


Figure 14 : Extrait du guide d'application de ddPCR, BIO-Rad

2.2) Extraction de l'ADN

L'extraction de l'ADN a été effectuée par le kit d'extraction FlexiGene (Quiagen) selon les recommandations des fournisseurs. Le dosage de la concentration de l'ADN extrait a été réalisé par le système de spectrophotométrie Nanodrop 2000C dont le rapport d'absorbance A260/A280 > 1.7 a été défini comme critère de pureté d'ADN.

2.3) Extraction de l'ARN

Les ARN ont été extraits par la méthode Trizol-Choloroforme selon le protocole du fournisseur. La concentration d'ARN a également été dosée sur Nanodrop 2000 C. Un rapport d'absorbance A260/A280 > 1.7 est considéré comme un critère validant la pureté des acides nucléiques.

2.4) Transcription inverse (*Reverse transcription, RT*)

La RT a été effectuée en utilisant le KIT commercial Super Script III RT. Les ARN extraits et dosés ont été ajoutés dans le mix réactionnel RT. Pour chaque échantillon : 8µ/L de Tampon 5X, 2µ/L de dNTPs, 2µ/L de random primer, 4µ/L de DTT *(Dithiothreitol*) ,1µ/L de RNAse, 1µ/L de l'enzyme Superscript et 2µ/l de H2O, ont été utilisés. Les échantillons ont été ensuite placés dans le Thermocycleur T3000 Biometra avec le programme suivant : 20°C pendant 10 minutes pour l'amorçage, 42°C pendant 50 minutes pour la RT, 70°C pendant 15 minutes pour la ré-hybridation et 4°C pour la température du maintien. Le volume final a été ajusté par de l'eau stérile afin d'obtenir une concentration d'ADN c à 40 ng/µl.

2.5) Digestion Enzymatique

Les tests réalisés sur l'ADN génomique ont été précédés d'une étape de digestion enzymatique par une enzyme de restriction. L'enzyme Hind III-HF (*High fidelity-New England-BioLabs*) a été utilisée à cet effet. A partir d'une solution mère ayant une concentration d'enzyme à 20 UI /µl, une solution de dilution dans le tampon spécifique de l'enzyme (*Cut Smart^{TM}-New England-BioLabs*) a été préparée extemporanément afin d'obtenir une activité enzymatique à 4UI pour chaque échantillon, afin de respecter la procédure du fournisseur. Le mélange d'ADNg et l'enzyme de restriction ont ensuite été

incubés à 37°C pendant 3 heures. La vérification de la digestion enzymatique a été contrôlée par une PCR classique en point final avec migration sur gel d'agarose.

2.6) dd PCR

Nous avons utilisé le système *QX200 Droplet Digital PCR (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA*). Le mix réactionnel était préparé de façon suivante : 11µl de mix de ddPCR (*Supermix for Probes with no dUTP*), 1µl de sonde de FAM 250 nmol, 1µl de sonde de HEX 250 nmol avec 5µl d'ADNg ou d'ADNc (40 ng/µl) dans un volume réactionnel total de 22µl. Les gouttelettes ont été générées par *QX200 Droplet generator* à partir du 20µL de mix réactionnel déposé sur un support (barrette à 3 rangées de 8 puits, DG8™ Cartridge Holder-Bio-Rad). Les échantillons ont été ensuite transférés sur une plaque de PCR à 96 puits (ddPCR™ 96-Well PCR Plates : BIO-Rad). La plaque a été scellée par un film aluminium thermosoudable par un système chauffant (PX1™ PCR Plate Sealer Bio-Rad). La PCR en point final a été réalisée par le thermocycleur ProFlex™ (applied biosystems, Life technologies) selon le protocole suivant : 95°C pendant 10 minutes pour l'activation enzymatique et la stabilisation de l'émulsion, 94°C pendant 30 secondes et 55°C pendant 1 minute (40 cycles avec une température de montée de 2.5°C/seconde) suivi par 98°C pendant 10 minutes. La température de maintien après la PCR a été fixée à 10°C. La lecture de fluorescence des produits d'amplification a été réalisée par le Droplet Reader QX200™ (Bio-Rad Laboratories). Les signaux ont été analysés par le logiciel QuantaSoft Software. Les résultats étaient valides si un minimum de 8000 gouttelettes était lu. Deux types de lecture ont été testés : ABS, pour la quantification absolue (nombre de copies/µL par puits) et RED, pour *rare events detection* (détection des mutations, calcul de ratio, du % de mutant). Tous les échantillons ont été analysés en double, avec passage systématique des témoins négatifs, positifs et des contrôles NTC (*Non Template control*).

3) Paramètres analytiques de dPCR

3.1) Limite de charge

Plusieurs échantillons d'ADNg ont été extraits à partir de la lignée cellulaire OCI/AML3 pour obtenir des concentrations de 10 ng/µl, 20 ng/µl et 50 ng/µl. En ajustant le volume d'ADN dans le mix réactionnel, les charges d'ADNg de 20 ng, 40 ng, 80 ng et 100 ng ont été obtenues.

3.2) Spécificité de la réaction PCR

Afin de déterminer la spécificité de la réaction de dPCR, les échantillons d'ADNg de la lignée cellulaire OCI/AML3 et les variants B et D ont été vérifiés en réalisant un gradient de température d'hybridation allant de 54°C à 56°C.

3.3) Limite de spécificité de la sonde du variant muté

Les 3 variants de mutation du gène NPM1 (type B, type D et variant rare) ont été évalués en parallèle de la mutation de type A. Les échantillons d'ADNg et d'ADNc ont été analysés en double.

3.4) Détection pour une fraction mutée élevée

Les séries de dilution d'ADNg et d'ADNc issues de la lignée OCI/AML3 dans l'ADNg et l'ADNc des témoins négatifs ont été effectuées afin d'obtenir des échantillons avec une abondance fractionnelle décroissante de 30%, 20%, 10%, 5% et 1%.

3.5) Limite de détection pour une fraction mutée faible (sensibilité)

La limite de détection pour l'ADNg et l'ADNc a été déterminée en réalisant des dilutions de l'ADNg et l'ADNc de la lignée OCI/AML3 dans les échantillons de témoins négatifs. Les différents niveaux de dilutions étaient de 10%, 1%, 0.1%, 0.02% et 0.01%. Pour évaluer la répétabilité de la limite de détection, les dilutions à 0.02% et 0.01% ont été étudiées en plusieurs passages : 5 et 6 fois pour la dilution d'ADNg à 0.02% et 0.01% et 6 fois pour la dilution d'ADNc à 0.02% et 0.01%.

3.6) Répétabilité

La répétabilité de la quantification de la mutation NMP1 type A a été examinée en analysant la répétition du passage de la lignée cellulaire OCI/AML3. Ces prélèvements ont été sélectionnés parmi plusieurs expérimentations réalisées au cours de notre projet. Les échantillons d'ADNg et d'ADNc ont été passés 18 et 14 fois respectivement.

4) Méthode : Analyse des données

4.1) Analyse des données du logiciel

Les données ont été analysées par le logiciel QuantaSoft (Version 1.7.4, Bio-Rad). La quantification absolue était basée sur la formule suivante :

$$\text{Concentration (copies/µL)} = -\ln(\text{N-neg}/\text{N-total}) / V$$

[N-neg= le nombre total de gouttelettes négatives d'un puits ; N-total=le nombre total de gouttelettes d'un puits ; V : volume d'une gouttelette (0.85nL /fixe)].

Le seuil de positivité de l'amplification a été déterminé sur les résultats de NTC, du contrôle négatif (Variant sauvage/WT) et du contrôle positif pour chaque expérience. L'abondance fractionnelle (FA) a été calculée de la façon suivante :

FA = quantification absolue du variant muté/ quantification absolue du variant muté et sauvage

Pour la détermination de la limite de détection, une méthode statistique basée sur la loi de distribution binomiale, décrite précédemment [148] a été utilisée, permettant de calculer la probabilité d'avoir un nombre de gouttelettes ayant zéro variant muté. Cette probabilité peut être calculée selon l'équation suivante :

$$q = (1-p)^{NR}$$

Où p est la valeur théorique de la proportion du variant mutant, N est le nombre théorique de gouttelettes, et R est le nombre de répétitions de l'essai.

Le paramètre Lambda λ a été déterminé selon l'équation décrite en page 42 pour l'évaluation de la répétabilité de la méthode.

4.2) Analyse statistique

Un Test t de *Student* pour les données appariées est utilisé. Une valeur de *p*-Value < 0.05 est considérée comme une différence statistiquement significative.

3) Résultats

Les résultats seront présentés de manière suivante : 1) paramètres analytiques évalués sur la lignée cellulaire OCI/AML3, 2) étude rétrospective sur 37 échantillons patients (WT1) et étude longitudinale sur 3 patients (NPM1).

1) Paramètres analytiques

1.1) Vérification de la lignée OCI/AML3 :

Le caryotype de la lignée, réalisé au laboratoire, est le suivant :

48,X,-Y,+1,der(1)t(1;7)(p11;q21),+5,i(5)(p10),+8,del(13)(q13q21),dup(17)(q22q25)[20].

Il s'agit d'un caryotype hyperdiploïde à 48 chromosomes, complexe avec trisomie 8, entre autres. Ces résultats sont identiques à ceux décrits [147] .(**Figure 15**) .

En parallèle, la séquence de la lignée est étudiée par la méthode de Sanger, confirmant la présence de la mutation de NPM1 type A (duplication **TCTG** dans l'exon 12).

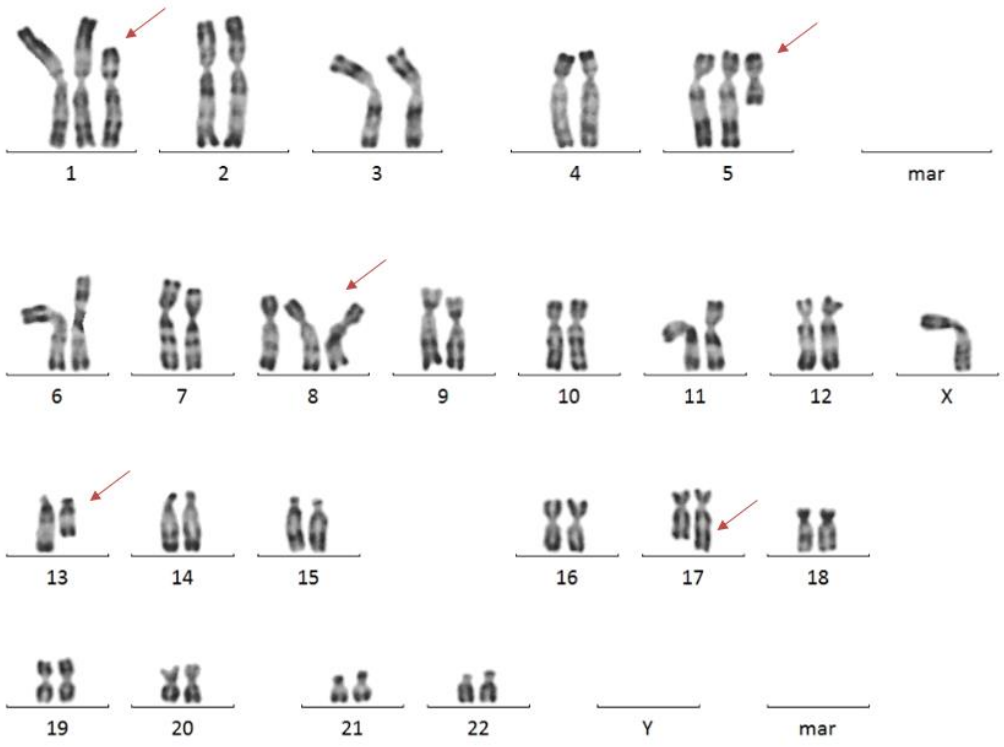


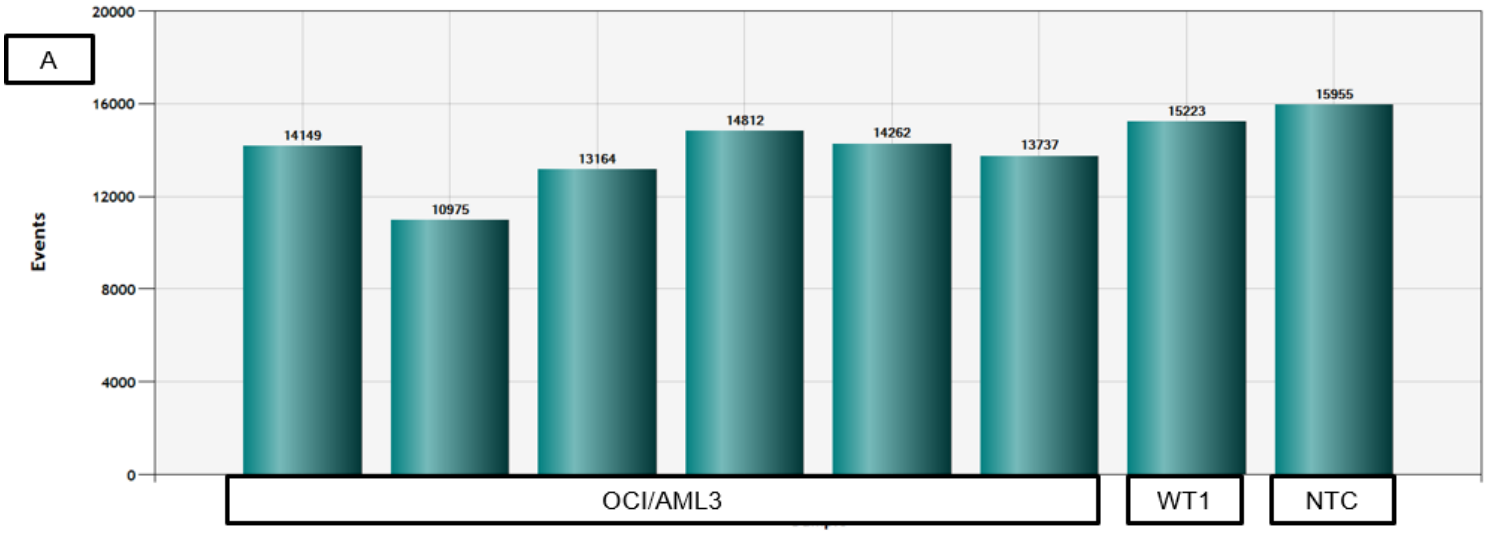
Figure 15 *:* Caryotype de la lignée OCI/AML3. Les anomalies sont représentées par les flèches rouges. On note la présence de trisomie 1, d'un isochromosome du bras court du chromosome 5, d'une trisomie 8, d'une délétion du bras long du chromosome 13 et d'une duplication du bras long du chromosome 17.

1.2) Faisabilité technique et analytique de la PCR digitale, validation des amorces et des sondes :

Afin de vérifier les performances techniques et analytiques de la PCR digitale, les échantillons de la lignée cellulaire OCI/AML3 ont été analysés à la fois pour l'ADNg et l'ADNc (**Figure 16 et 17**).

Le nombre d'évènements analysables pour l'ADNg et l'ADNc de la lignée OCI/AML3 est conforme, avec une moyenne de 14034 et 15733, respectivement.

Pour chaque expérience de PCR digitale réalisée dans le cadre de notre travail, le nombre de gouttelettes analysées pour chaque échantillon s'est avéré conforme. La détection du contrôle positif et l'absence de détection du contrôle négatif étaient observées pour l'ensemble des expériences.



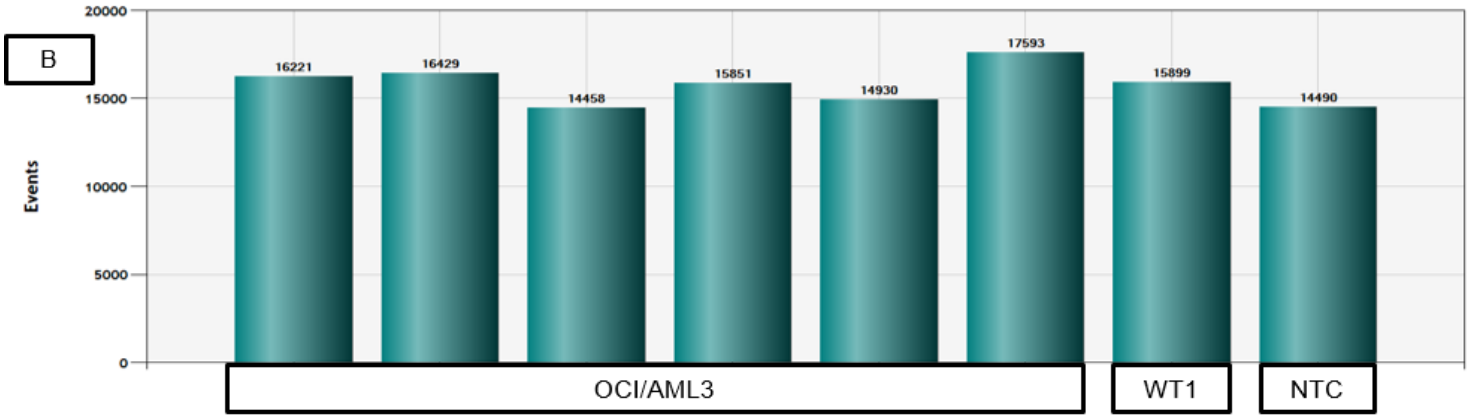


Figure 16 : Validation technique de la PCR digitale A) nombre de gouttelettes analysables pour l'ADNg B) nombre de gouttelettes analysables pour l'ADNc , OCI/AML3 : lignée cellualire , WTI : variant sauvage, NTC : contrôle

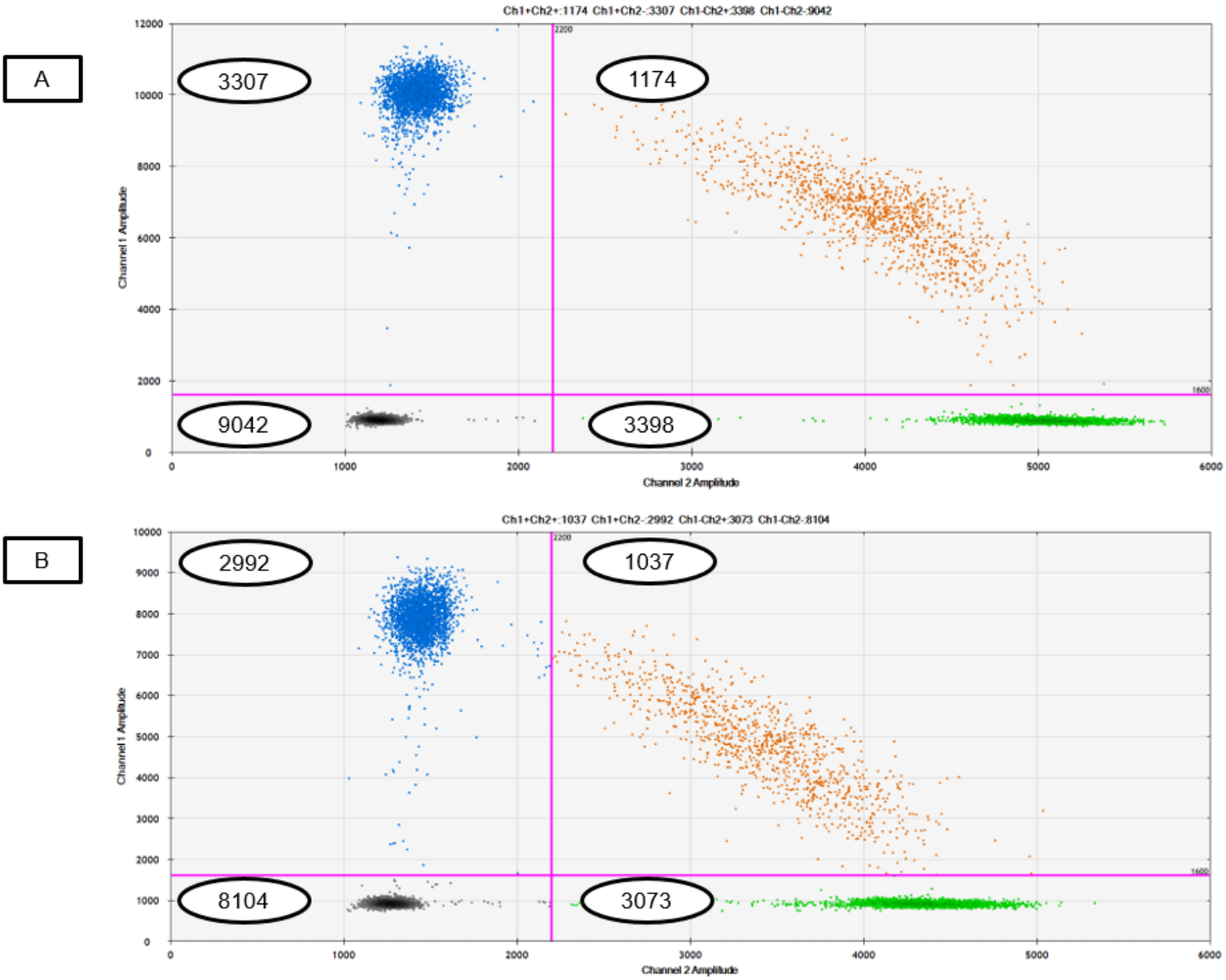


Figure 17 : Validation analytique des amorces et sondes A) détection des allèles mutés d'ADNg B) détection des allèles mutés d'ADNc. Chaque point représente une gouttelette, les axes des abscisses montrent l'intensité du signal fluorescent pour la détection du variant sauvage (HEX), les axes des ordonnées montrent l'intensité du signal fluorescent pour la détection du variant muté (FAM) ; les nuages bleus, verts, oranges et gris représentent respectivement les gouttelettes positives pour le variant muté, les gouttelettes positives pour le variant sauvage, les gouttelettes double positives et les gouttelettes sans molécule d'ADN. Les lignes roses représentent les seuils de distinction entre les différents compartiments et sont positionnées en fonction des témoins négatifs et contrôles lors de chaque expérience. Le nombre de gouttelettes détectées dans chaque compartiment est entouré en noir.

Les amorces et les sondes étaient également conformes concernant la proportion des allèles mutés et sauvages de la lignée cellulaire OCI/AML3 (mutation hétérozygote NPM1).

Les valeurs attendues pour l'abondance fractionnelle et le ratio, tenant compte de l'hétérozygotie de la lignée OCI/AML3, étaient de 50% et 1, respectivement.

Nos résultats montrent, pour l'ADNg, une abondance fractionnelle (rapport pourcentage de "muté/muté sauvage") moyenne à 50.2 (47.3-53.1) et un ratio (muté/sauvage) à 1.01 (0.8-1.10) et pour l'ADNc, une abondance fractionnelle à 49.1 (47.7-50.5) et un ratio à 0.96 (0.91-1.0).

1.3) Limite de charge

Afin de déterminer la charge optimale de l'ADN, plusieurs charges ont été examinées. Les résultats ont montré une bonne répartition des gouttelettes en fonction de la charge d'ADN **(Tableau 7**).

La répartition était proportionnelle à la charge d'ADNg. Comme attendu, l'augmentation de la charge génère une proportion plus importante de gouttelettes doubles positives (**Figure 18**). Les expériences ont été reproduites avec l'ADNc mettant en évidence les mêmes résultats. Ces résultats indiquent aussi qu'une augmentation de quantité de charge en ADN jusqu'à 200 ng n'aboutit pas à une surcharge des gouttelettes. D'autre part, la charge minimale testée retrouve une fraction mutée identique, les gouttelettes étant réparties de façon identique à la répartition observée avec des charges supérieures. Cependant cette charge minimale était associée à une quantité d'évènements positifs insuffisants. De plus, les gouttelettes « double positives » ne disparaissaient pas avec une charge minimale d'ADN. Nous avons donc choisi de travailler avec une charge d'ADN de 200 ng.

Tableau 7 : Données relatives aux différentes quantités d'ADN examinées

Charge d'ADN	**FA (abondance fractionnelle)**	**Nombre de gouttelettes « muté »/ Nombre de gouttelette « total »**
20 ng	49.7	1573/13345
80 ng	49	5695/12858
100 ng	50	8080/13408
200 ng	50.3	14140/16500

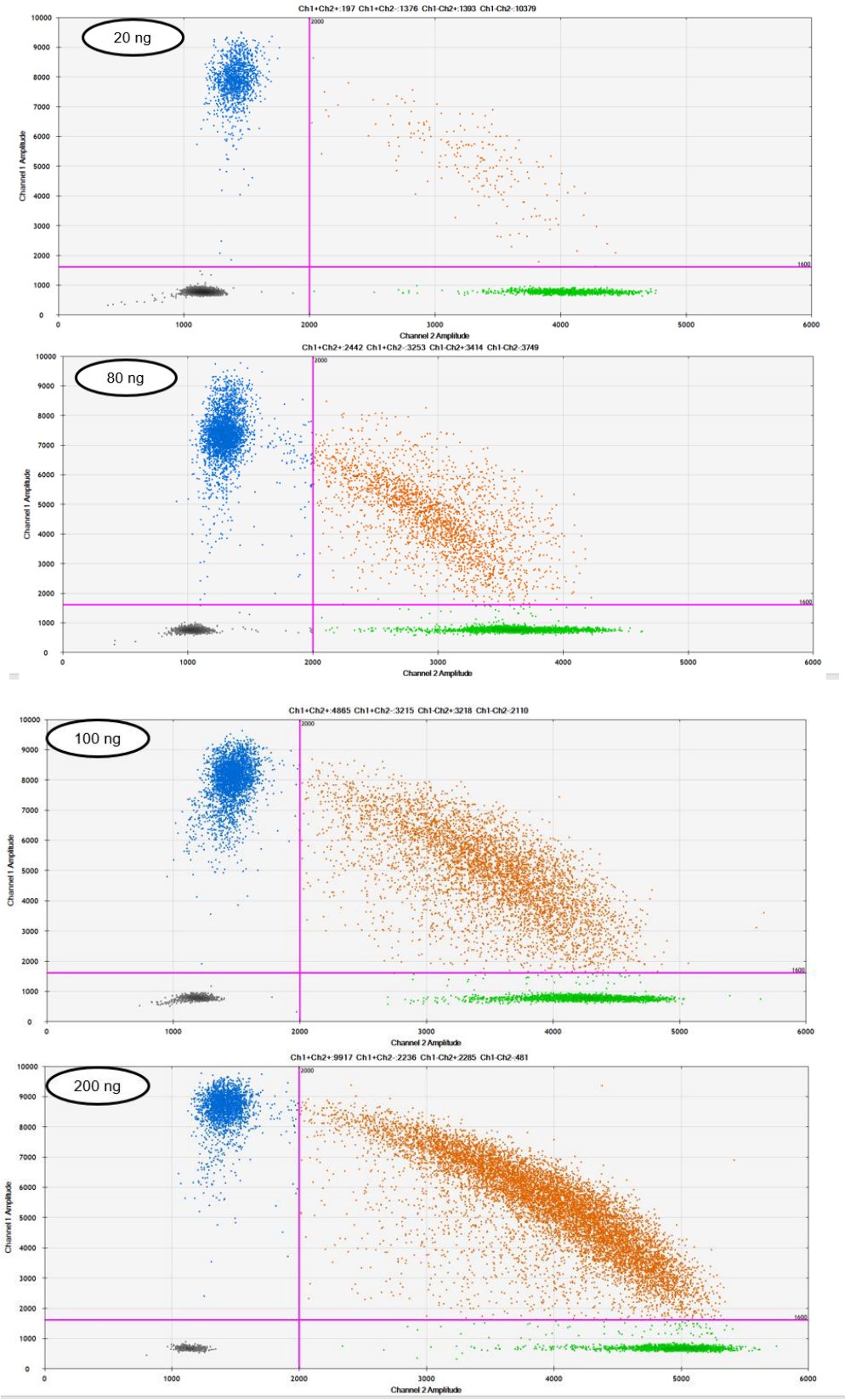


Figure 18 : Effet de la charge d'ADN sur la détection du variant muté de NPM1 type A.

1.4) Spécificité de réaction de PCR

Les données ont montré que la température d'hybridation à 55°C permettait une séparation optimale des différentes populations de gouttelettes. Nous avons également constaté une détection de la mutation de type D (avec la sonde conçue pour la détection de mutation de type A) avec une intensité plus faible de la fluorescence. A l'opposé, le variant B n'était pas détectable avec ces mêmes conditions techniques. Les schémas de ces 3 expérimentations sont représentés sur la **Figure 19.**

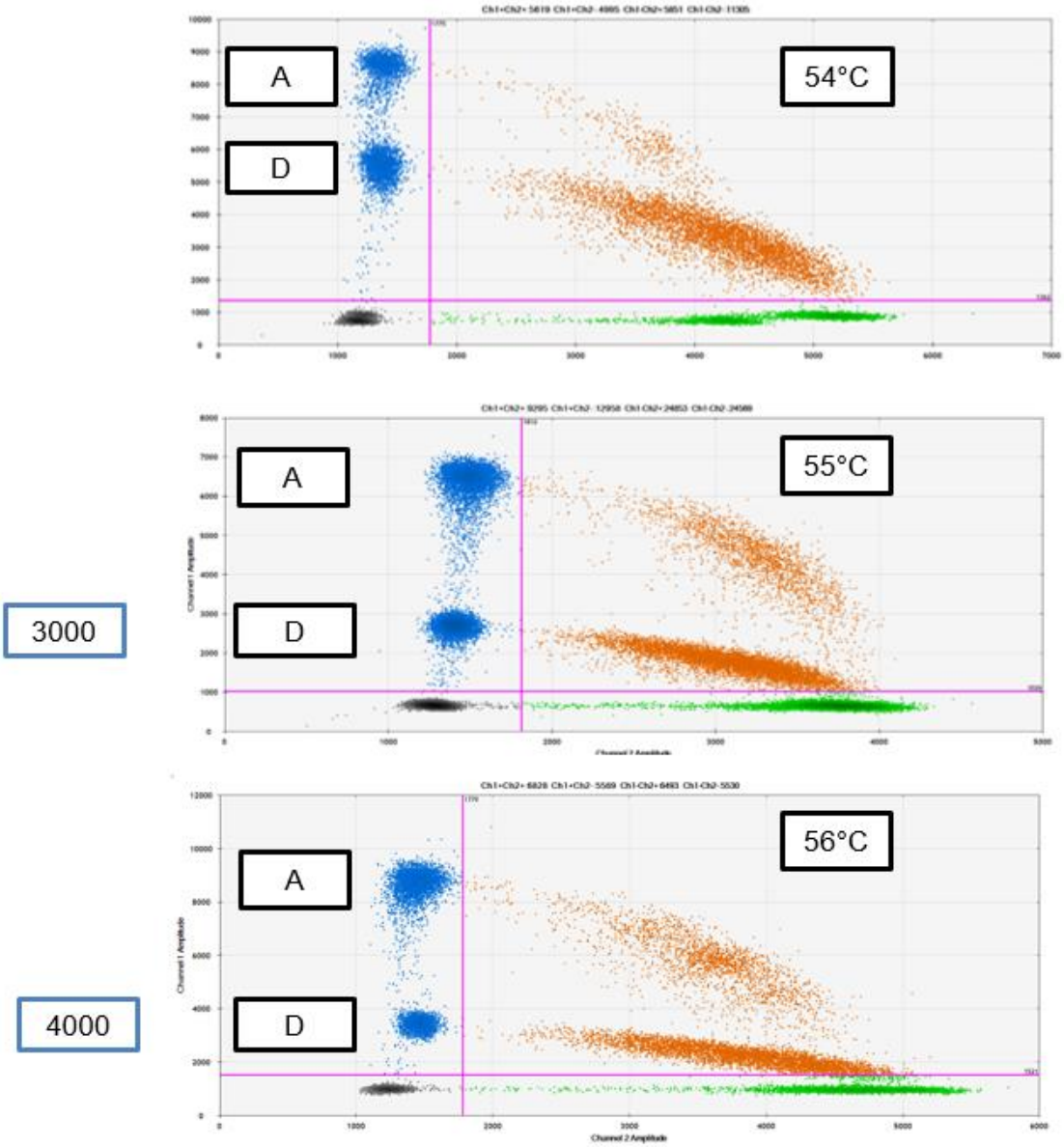


Figure 19 : Représentation de la détection du variant muté A du gène *NPM1* via un gradient de température d'hybridation. On note une détection simultanée du variant D dont l'amplitude de fluorescence est plus faible, de l'ordre de 3000 pour une température de 55°C et de 4000 pour une température de 56°C.

1.5) Intérêt de réalisation d'une étape de digestion

L'application d'une étape préalable de digestion enzymatique permettrait, en théorie, une meilleure séparation des populations des gouttelettes et permettrait de réduire l'effet de "*rain"* ou "*drag*" ou pluie, autrement dit les gouttelettes avec un niveau de fluorescence intermédiaire se trouvant entre les différents compartiments.

Une technique de PCR classique en point final a permis de vérifier l'action de l'enzyme *HINDIII* (**Figure 20).**

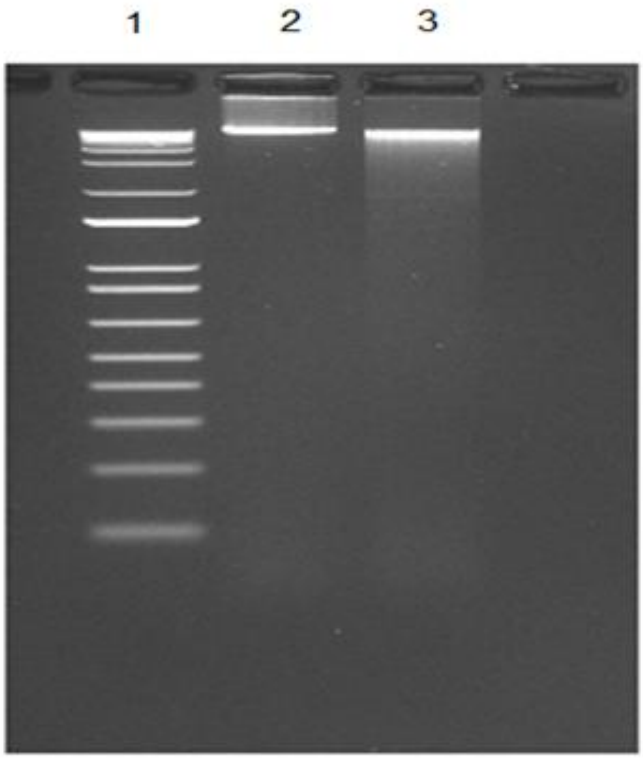


Figure 20 : Migration sur gel du produit de PCR en point final,1) Témoin de poids moléculaire 2) Produit de PCR sans digestion 3) Produit de PCR avec digestion.

L'utilisation de l'enzyme a montré plusieurs intérêts : 1) la séparation a été optimisée avec moins d'effet de pluie « *rain* » dans les gouttelettes contenant l'ADN digéré. 2) la reproductibilité concernant la localisation des nuages est meilleure avec l'étape de digestion 3) on constate une augmentation significative du nombre de gouttelettes analysées avec une moyenne = 13415 contre 16240 pour les ADN non digéré et digéré, respectivement. (*P*-Value < 0.05). (**Figure 21)**

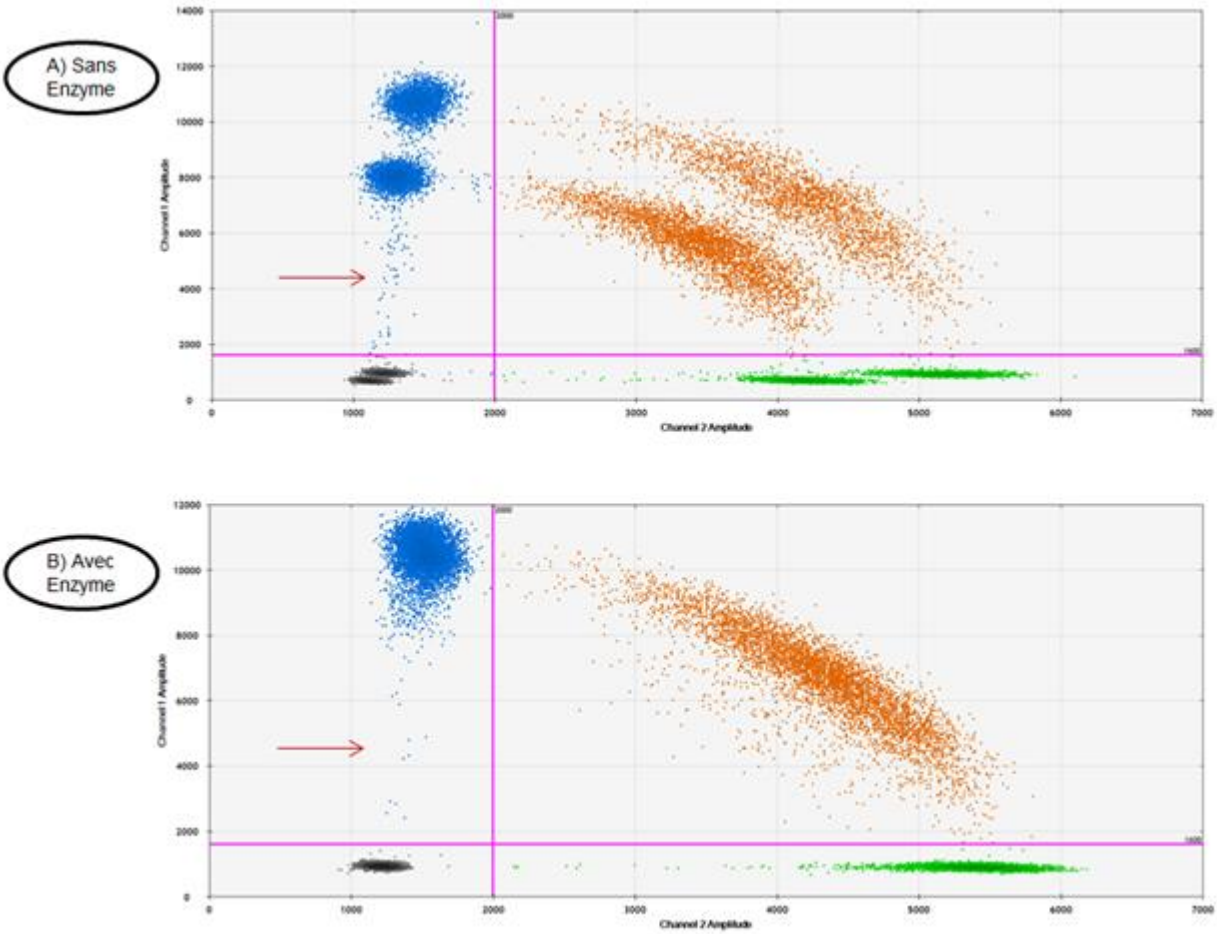


Figure 21 : Comparaison de l'effet de la digestion enzymatique sur l'ADNg de la lignée OCI/AML3 A) Cumul de 2 expériences indépendantes d'ADN non digéré avec l'effet de "*rain*" (flèche rouge) B) Cumul de 2 expériences indépendantes d'ADN digéré avec impact moins prononcé de l'effet de *"rain*" (flèche rouge)

1.6) Limite de spécificité de la sonde du variant muté

Les résultats montrent :

- Une absence de détection du variant B (2 bases de différence, comparé au variant A),
- Une détection partielle du variant D dans la zone de détection pour le variant muté de mutation NPM1 type A (canal FAM). **(Figure 4)**
- Une détection de doubles nuages pour le variant rare dans la zone de détection pour le variant sauvage (canal HEX). Pour rappel, ce variant a été séquencé, une différence d'un seul nucléotide avec la sonde détectrice du variant sauvage a été mise en évidence. (**Figure 22**)

Variant rare	AGAGGCTATTCAAGATCTCTGGCAG CGGA TGGAGGAAGTCTCTTTAAGAAAATA
Sonde (HEX)	AGATCTCTGGCAGTGGA

Figure 22 : Comparaison entre la séquence du variant rare et la séquence de la sonde de détection du variant sauvage (HEX)

Les résultats étaient identiques pour l'ADNc, pour les 3 types de mutants étudiés. (**Figure 23**)

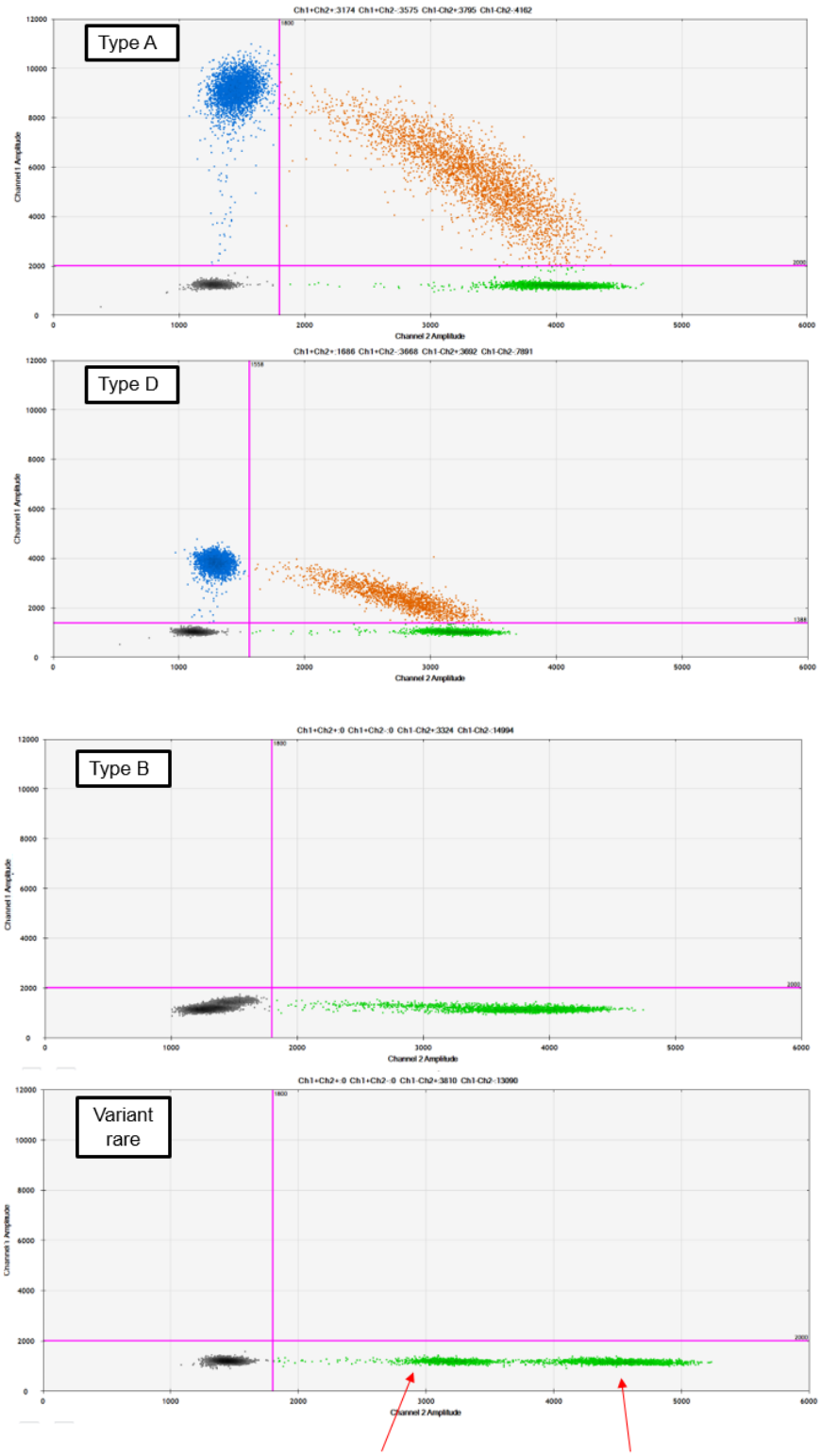
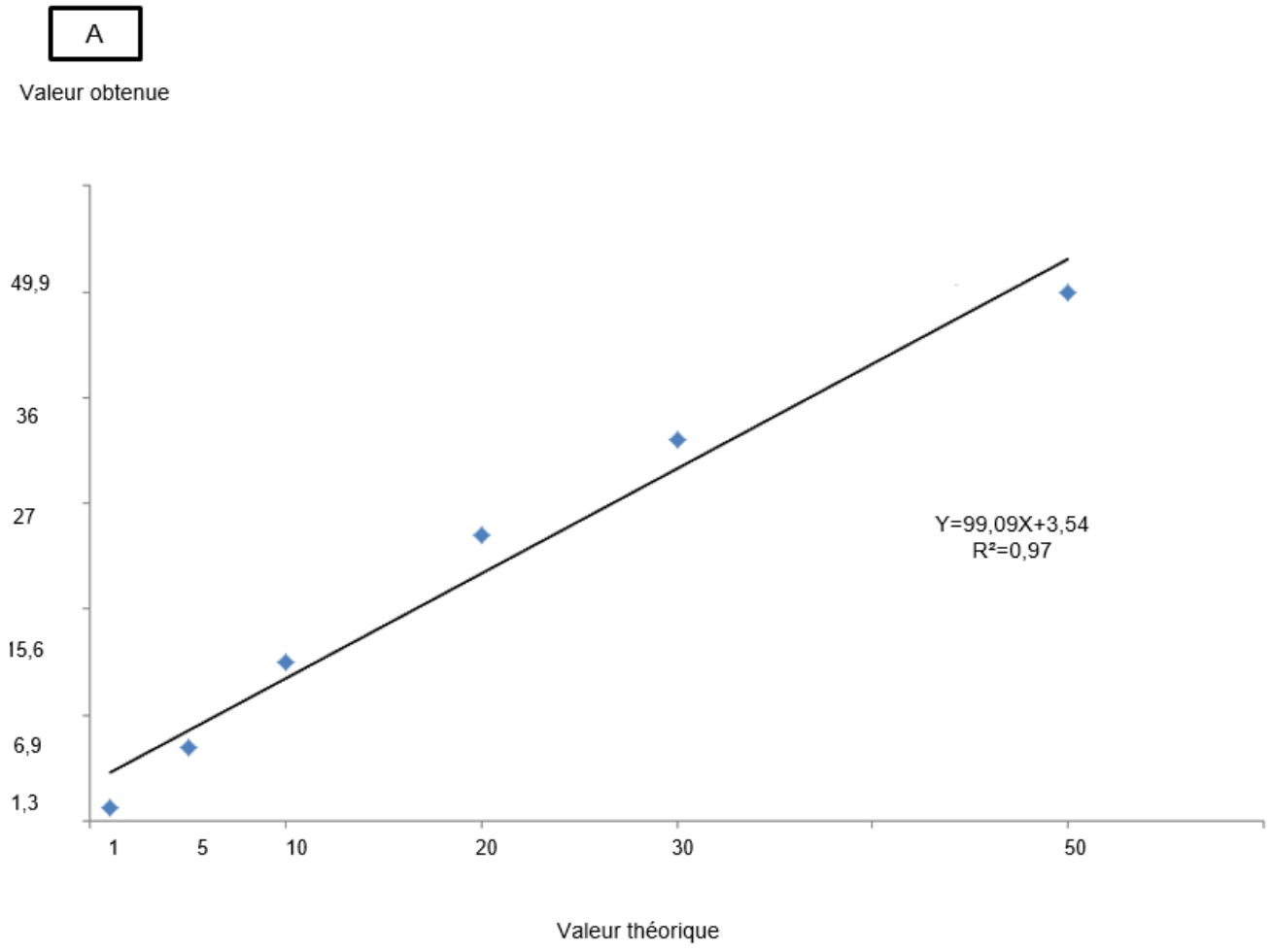


Figure 23 : Spécificité de la sonde de détection du variant muté. Les différents variants sont représentés sur le schéma ; présence de deux nuages pour le variant rare dans la zone de lecture du variant sauvage (flèches rouges).

1.7) Détection de fractions mutées élevées (>1%)

Les résultats obtenus étaient en corrélation avec les valeurs théoriques des dilutions (50%, 30%, 20%, 10%, 5% et 1%). (**Figure 24).** Le coefficient de corrélation R entre valeurs théoriques et observées, était optimal pour l'ADNg, un peu moins pour l'ADNc.



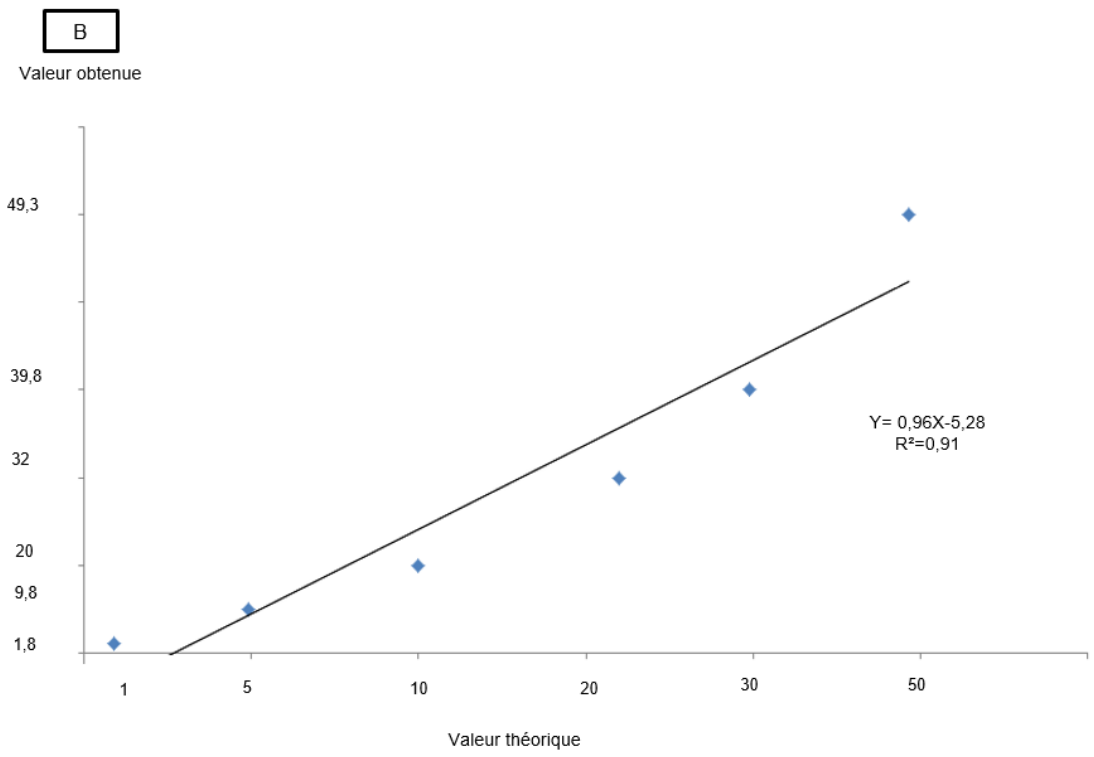


Figure 24 : Courbe de corrélation entre fraction mutée attendue et fraction mutée mesurée pour l'ADNg (A) et l'ADNc (B) ; les axes représentent l'abondance fractionnelle théorique (abscisse) et observée (ordonnée).

1.8) Limite de détection (sensibilité)

La **Figure 25** illustre un exemple d'une série de dilution pour déterminer la limite de détection (sensibilité). Concernant l'ADNg, la fréquence allélique était détectable pour l'ensemble des points de la gamme de dilution et jusqu'à un niveau très faible (0.01%). La limite de détection était « répétable » à ce même niveau de sensibilité (6 repassages). Ce taux de 0.01% ou 10^{-4} est de fait considéré comme la limite de détection. Le **Tableau 8** montre les données relatives à cette phase expérimentale.

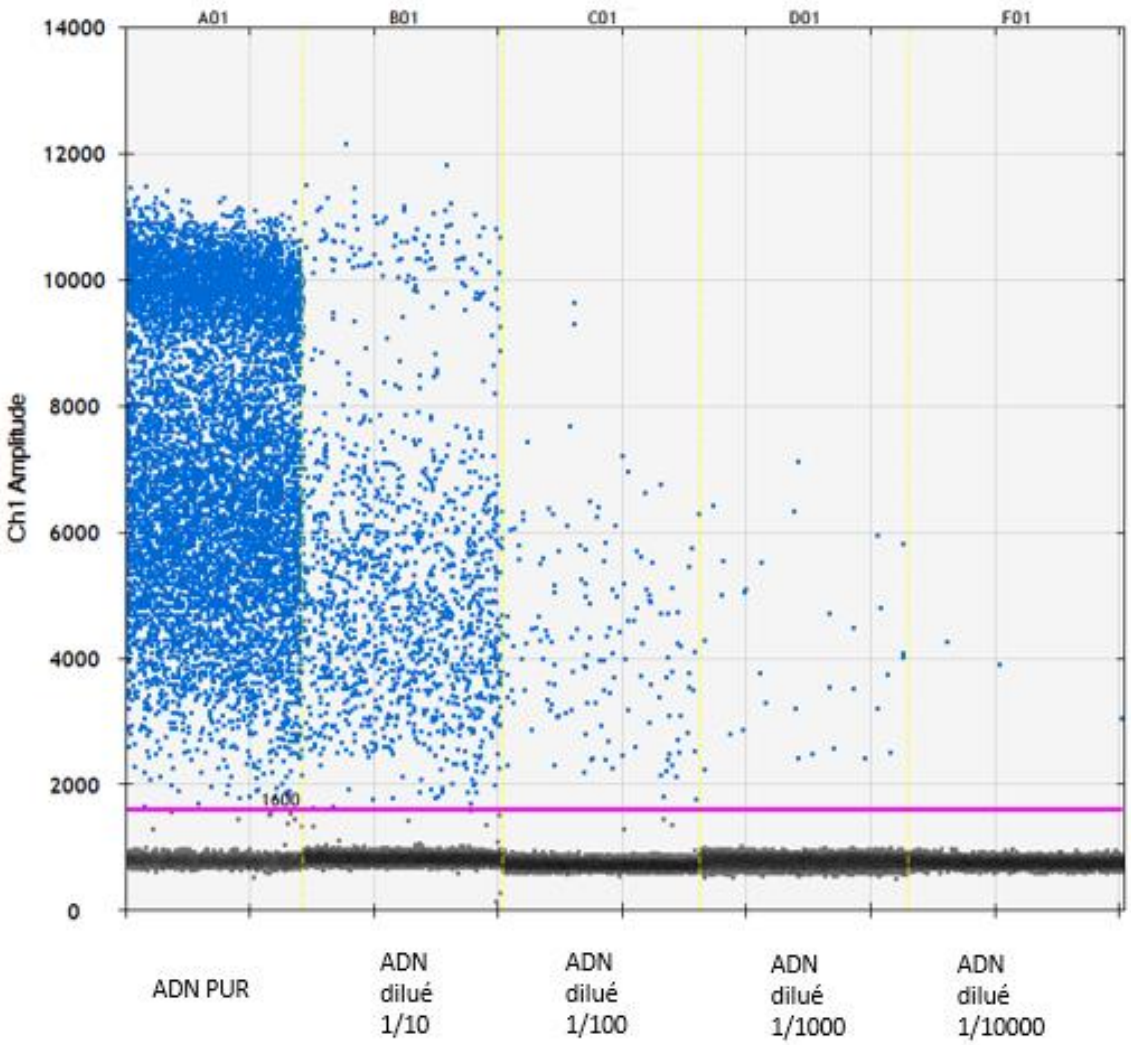


Figure 25 : Gamme de dilution d'ADNc. La représentation choisie est celle du canal détecteur du variant muté (FAM), les barres jaunes séparent les différents échantillons examinés (5 au total). Les points bleus situés au-dessus de la barre rose représentent les gouttelettes positives pour le variant muté. Les points noirs situés sous la barre rose représentent les gouttelettes négatives pour les variants sauvage et muté.

Dilution	Nombre muté (copies/20µL)	Évènement muté	Évènement sauvage	GA	FA (%)	FA intervalle (%)
10%	2020	1322	14440	16101	3,63	3,43-3,84
1%	216	145	15060	15898	0,31	0,26-0,36
0,1%	20	14	16936	17276	0,021	0,01-0,032
0,02%	3	2	15484	15784	0,0032	0-0,0081
0,01%	1,4	1	17084	17158	0,0011	0-0,0036

Détection du variant muté/ Total de réactions	Dilution	Nombre muté (copies/20µL)	Évènement (gouttelettes) muté	Évènement (gouttelettes) sauvage	GA	FA (%)
5/6	0,02%	3,8	16	81725	94344	0,0061
5/5	0,01%	3,7	14	81644	89693	0,0063

Tableau 8 : Abondances fractionnelles pour l'ADNg observées après dilution (gamme allant de 10% à 0.01%). Le tableau du bas montre la répétabilité de la détection des dilutions 0.02 et 0.01%. FA : abondance fractionnelle, GA : gouttelettes acceptées

Les mêmes analyses ont été réalisées pour l'ADNc. Le **Tableau 9** indique les résultats pour l'ADNc. Le variant muté a été détecté aux dilutions à 10, 1, 0.1, 0.02 et 0.01%. Cependant la détection à 0.01% n'a pas été constamment observée pour l'ADNc. La fiabilité de la détection pour des dilutions de 0.02% et 0.01% a été évaluée en appliquant la loi de distribution binomiale (**Tableau 10**). Selon les données de cette loi, la probabilité la moins optimiste d'avoir zéro gouttelette « positive mutée » avec la dilution à 0.02% est de l'ordre de 9% (N=12000, R=1) alors que cette probabilité pour la dilution à 0.01% est de l'ordre de 30%. (N : nombre de gouttelettes analysées, R : nombre d'expérimentations)

De ce fait, tenant compte du caractère aléatoire de la détection à 0.01% et des données de la loi binomiale, le seuil de détection de 0.02% a été retenu comme le seuil de sensibilité (limite de détection) pour l'ADNc.

Dilution	Nombre muté (copies/20µL)	Évènement muté	Évènement sauvage	GA	FA (%)	FA intervalle (%)
10%	920	726	12135	18927	3,68	3,41-3,94
1%	140	107	13394	18114	0,44	0,36-0,52
0,1%	14	12	14371	19137	0,045	0,019-0,071
0,02%	2,6	2	13807	18310	0,008	0-0,002
0,01%	1,4	1	12931	17372	0,004	0-0,0014

Nombre de réaction Positif/Total	Dilution	Nombre muté (copies/20µL)	Évènement muté	Évènement sauvage	GA	FA (%)
6/6	0,02%	10	8	79905	110197	0,005
4/6	0,01%	8,6	6	78960	105687	0,004

Tableau 9 : Abondances fractionnelles d'ADNc détectées par dPCR et résultats de la répétabilité de la détection des dilutions à 0.02 et 0.01%.

		N			
p	R	12000	14000	16000	18000
0,02%	1	9,0	6,0	4,0	2,0
	2	0,8	0,3	0,1	0,0
	3	0,0	0,0	0,0	0,0
	4	0,0	0,0	0,0	0,0
	5	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,0	0,0	0,0	0,0
0,01%	1	30	24	20	16
	2	9,0	6	4,0	2,0
	3	2,0	1,4	0,8	0,4
	4	0,2	0,0	0,0	0,0
	5	0,0	0,0	0,0	0,0
	6	0,0	0,0	0,0	0,0

Tableau 10) Extrait de valeurs selon la loi binomiale. Probabilité d'avoir zéro gouttelettes avec le variant muté selon différents paramètres (p: valeur théorique de dilution, N : nombre de gouttelettes et R : nombre d'expérimentations)

1.9) Répétabilité

Pour chaque expérience de dPCR, les valeurs des ratios et abondances fractionnelles (FA) étaient satisfaisantes. Le **Tableau 11** montre les résultats obtenus pour l'ADNg.

Les moyennes et les intervalles de ratio et FA ont été de 0.98 (0.96-1.04) et 49.8 (49.3-51) pour l'ADNg et de 0.96 (0.95-0.99) et 49.1 (48.6-49.7) pour l'ADNc. Le paramètre λ a été calculé pour l'ensemble de l'expérimentation avec la moyenne et les intervalles : λ=1.1 (0.2-2.6) et λ=0.8 (0.2-1.2) pour l'ADNg et l'ADNc respectivement. Les valeurs de λ permettant d'avoir les meilleures précisions sont comprises entre 0.6-1.6 [137].

Tableau 11 : Evaluation de la répétabilité de l'ADNg

Echantillon	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
RATIO (Muté/WT)	0,96	0,99	0,99	0,99	0,98	0,98	1,01	0,98	0,98	0,98	1,01	1,04	0,97	1,00	0,98	0,97	0,99	0,99
FA (M/M+WT)	49	49,7	50	49,8	49,6	49,7	50,5	49,5	49,5	49,6	50,3	51	49,4	50,2	49,7	49,3	49,9	49,9

2) Expériences réalisées sur les échantillons de patients

2.1) Caractéristiques des patients LAM avec mutation NPM1

Les prélèvements de 10 patients ayant un diagnostic de LAM se décomposent comme suit : LAM *de novo* pour 9 patients et une LAM secondaire, diagnostiquées entre février 2017 et avril 2018. Les caractéristiques des patients sont détaillées dans le tableau de l'annexe 1. Le **Tableau 12** résume les données clinico-biologiques. Il s'agissait de 8 patients de sexe masculin et 2 patients de sexe féminin ; l'âge médian était de 64 ans. La leucocytose au diagnostic était élevée : 3 patients avec plus de 100 G/l, 3 patients entre 21-100 G/L et 4 entre 5-19 G/l. Le taux moyen de blastose médullaire était à 65% (31%-97%). Les LAM2 et LAM4 étaient les sous-catégories les plus fréquentes de la classification FAB. Huit patients sur 10 avaient un caryotype normal. Les anomalies cytogénétiques décrites pour les 2 patients à caryotype anormal, étaient une trisomie 8 et une délétion du chromosome 9. On note une présence simultanée de la mutation *FLT3-ITD* chez 5 patients et également une association à la mutation *DNMT3A* chez 5 patients. Deux cas présentaient la coexistence de ces 2 mutations.

Ces données montrent que les caractéristiques de la population étudiée sont cohérentes avec les particularités cliniques et biologiques attendues chez les patients porteurs d'une LAM avec mutation de NPM1.

Tableau 12 : Principales caractéristiques des patients LAM inclus dans l'étude

	Patients (n=10)	
Sexe	Masculins : 8	Féminins : 2
Age	Médian : 64 (47-69)	
Leucocytose diagnostic	62 (5,4-187) G/L	
Blaste (Moelle)	65 (31-97) %	
Classification (FAB)	LAM1(1), LAM2(4) , LAM4(3), LAM5(2)	
Caryotype	Normaux : 8 Anormaux : 2 (trisomie 8 ,délétion 9)	
FLT3-ITD	Muté(5), non-muté(5)	
DNMT3A	Muté(5), non-muté(5)	

Le nombre de patients pour chaque paramètre est indiqué entre parenthèses.

2.2) Etude rétrospective sur 37 échantillons d'ADNc

Les prélèvements sanguins avec quantifications pour le marqueur WT1 de 9 patients, réalisées à différents moments de l'évolution de la LAM, étaient également testés pour le marqueur NPM1. Les échantillons disponibles pour le suivi étaient de 1 à 4 par patient.

L'ensemble des patients analysés montrent que la cinétique des deux marqueurs WT1 et NPM1 type A entre le diagnostic et les points de suivi post-traitement, présente un profil similaire (**Tableau 13)**. Une abondance fractionnelle élevée pour le marqueur NPM1 était détectée au moment du diagnostic chez tous les patients (60-90%). La fraction NPM1 mutée diminuait de façon considérable, après traitement d'induction et/ou de consolidation, sauf chez un patient (cas numéro 3). Ce patient était en échec thérapeutique et a présenté deux rechutes post-greffe. En effet pour ce patient, les deux marqueurs ont montré des résultats concordants, des taux supérieurs à la normale pour le marqueur WT1 et des abondances fractionnelles élevées pour le marqueur NPM1. Pour rappel, le seuil de positivité pour le marqueur WT1 dans le sang est à 0.5%. Pour un patient (cas numéro 6), on a observé une concordance de cinétique des 2 marqueurs, pour les 3 points de suivi, à savoir, un taux inférieur à 0.5% pour le WT1 et une abondance fractionnelle à 0% pour NPM1. Pour 7 des 9 patients, au moins un point de suivi montrait un taux normal pour WT1 alors que la fraction mutée de NPM1 était détectable. Par exemple, le cas numéro 8 présentait 3 des 4 points de suivi ayant les taux normaux de WT1 mais une détection d'une fraction mutée faible de NPM1. Ces données suggèrent que le marqueur NPM1 muté, quantifié par la dPCR est plus informatif que le marqueur WT1, quantifié par qPCR.

La **Figure 26** montre un exemple choisi d'un patient en rémission.

La **Figure 27** illustre le suivi longitudinal d'un patient (cas n°2) avec trois points de suivi. On note l'absence de détection de variant muté de NPM1 au niveau des points de suivi 1 et 3,

alors que le deuxième point de suivi montre la présence des gouttelettes dans la zone de double positive. L'intensité du signal fluorescent de ces gouttelettes est nettement supérieure au seuil.

Tableau 13 : Cinétique d'évolution des marqueurs WT1 et NPM1 pour les patients LAM NPM1c+ sur les prélèvements sanguins. Seuil de positivité pour le transcrit WT1 de 0,5% (sang)

Patient	WT1 (100/ABL)	FA (%)
Cas n°1 diagnostic	86,1	60
Cas n°1 suivi 1	0,07	0,01
Cas n°2 diagnostic	63	90
Cas n°2 suivi 1	0,02	0
Cas n°2 suivi 2	0,02	0,01
Cas n°2 suivi 3	0,01	0
Cas n°3 diagnostic	51	90
Cas n°3 suivi 1	71	50
Cas n°3 suivi 2	53	80
Cas n°4 diagnostic	82	90
Cas n°4 suivi 1	0,08	0,02
Cas n°4 suivi 2	0,09	0,003
Cas n°5 diagnostic	75	70
Cas n°5 suivi 1	0,05	0,01
Cas n°6 diagnostic	68	80
Cas n°6 suivi 1	0,01	0
Cas n°6 suivi 2	0,003	0
Cas n°6 suivi 3	0,014	0
Cas n°7 diagnostic	4	80
Cas n°7 suivi 1	0	0,004
Cas n°7 suivi 2	0,01	0,01
Cas n°8 diagnostic	31	70
Cas n°8 suivi 1	0,04	0,01
Cas n°8 suivi 2	0,07	0,01
Cas n°8 suivi 3	0,07	0,02
Cas n°8 suivi 4	0,004	0
Cas n°9 diagnostic	102	70
Cas n°9 suivi 1	0,1	0
Cas n°9 suivi 2	0,3	0
Cas n°9 suivi 3	0,08	0
Cas n°9 suivi 4	0,04	0,02

FA : abondance fractionnelle

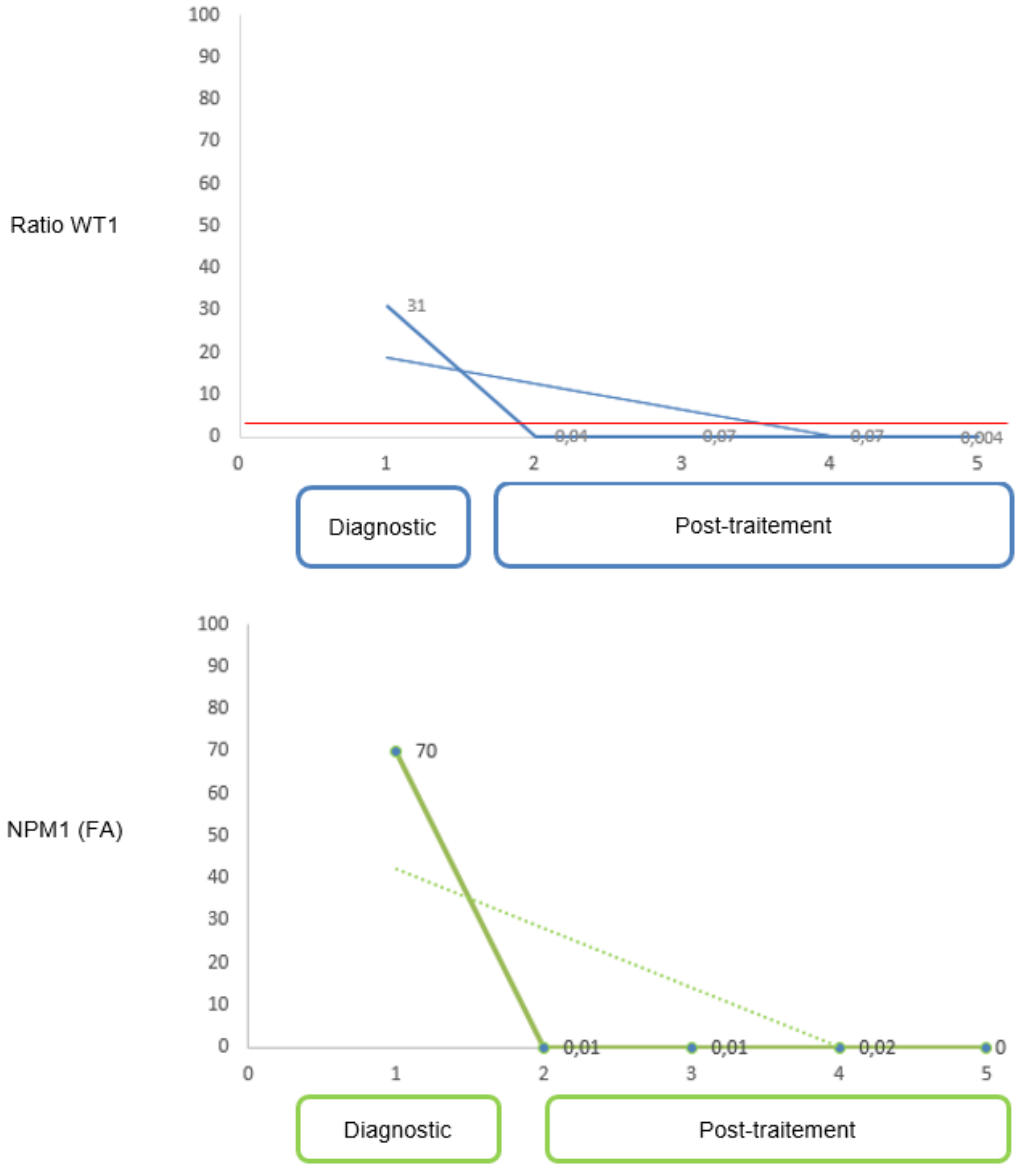


Figure 26 : Similitude dans la cinétique de l'expression des marqueurs WT1 et NPM1. L'axe des abscisses représente les différents moments de l'évaluation du patient, l'axe des ordonnées représente la quantification du marqueur, la ligne rouge pour le marqueur WT1 montre le seuil de positivité sanguin pour ce marqueur (0.5%).

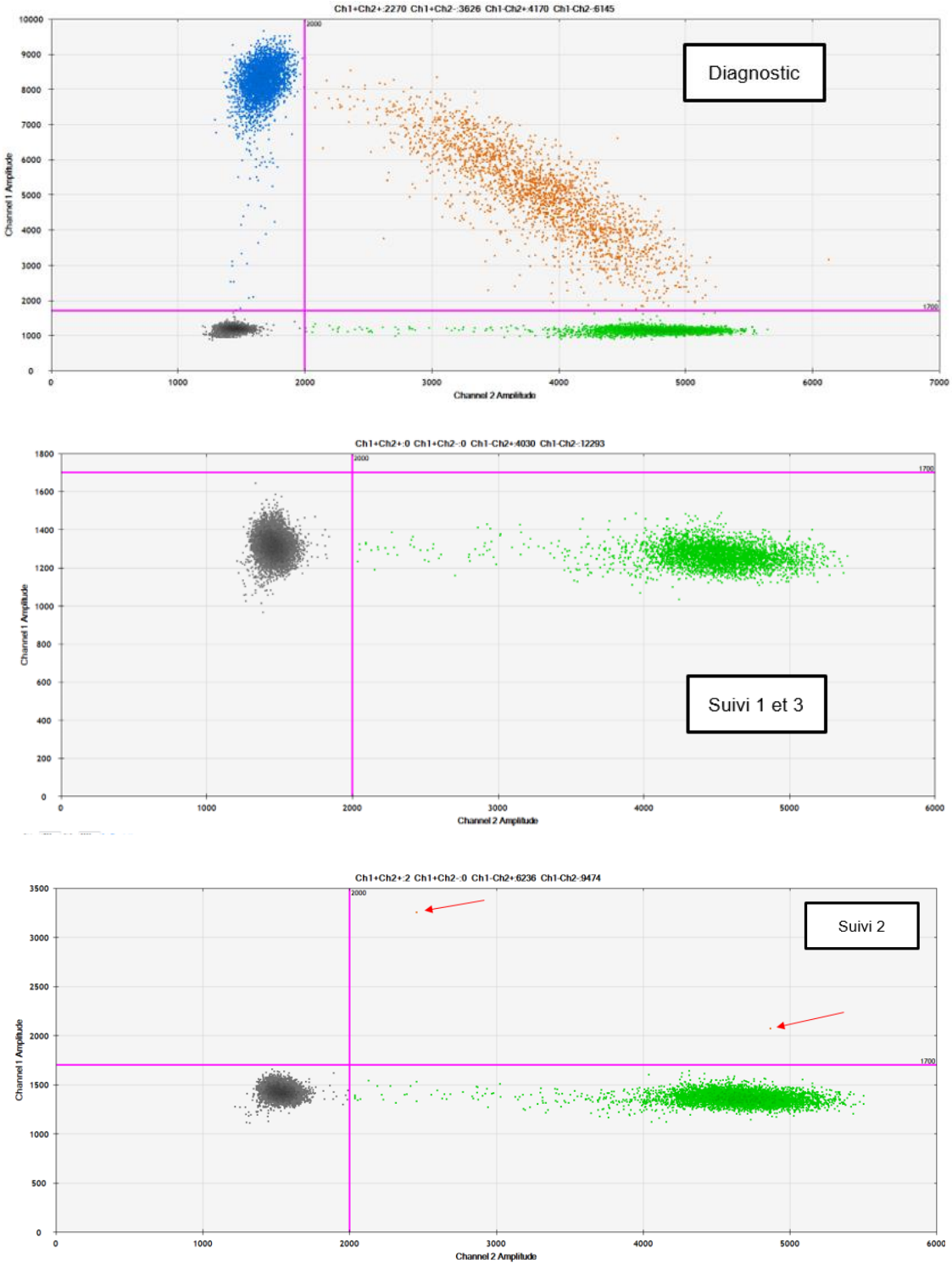


Figure 27 *:* Suivi longituidinal d'un patient : les gouttelettes positives pour le point de suivi n°2, sont identifiées par les flèches rouges. Pour information, l'échelle des ordonnées est différente sur ces 3 suivis. La ligne rose de positivité (fractions mutée et sauvage) est située à une valeur de fluorescence d'environ 1700, valeur identique pour ces 3 points de suivi.

2.3) Suivi moléculaire longitudinal de 3 patients

Pour 3 patients, les prélèvements médullaires ayant des quantifications pour le marqueur NPM1, exploré par la RT-qPCR, étaient également examinés par la dPCR. Les analyses pour ces deux méthodes étaient réalisées sur l'ADNc. Les échantillons disponibles pour le suivi étaient peu nombreux (1 par patient). Les analyses étaient également réalisées sur l'ADNg de 2 de ces patients, soient 4 échantillons disponibles. Les données retrouvées sur ADNg et ADNc étaient identiques et comparables. Seules les données de l'ADNc sont ici représentées.

Les **Figures 28 A, B et C** illustrent les résultats de ce suivi moléculaire longitudinal. Les données représentent l'abondance fractionnelle d'ADNc déterminé par dPCR comparé à une quantification par RT-qPCR, dont les résultats sont exprimés en pourcentage d'un gène de référence (*ABL*).

Les données de cinétique montrent qu'il existe une bonne concordance entre les deux méthodes de quantification de l'expression du transcrit NPM1 muté. Pour les trois patients, la détection par dPCR au diagnostic a montré respectivement une fraction mutée de 40%, de 41% et de 49%.

L'analyse des valeurs des points de suivi de ces 3 patients montre que :

- Pour le point de suivi du premier patient, considéré en rémission cytologique et moléculaire, aucun transcrit n'était détecté par les deux méthodes (**Figure 28A**).
- Concernant le deuxième patient, en échec après traitement d'induction, une très discrète différence entre les deux méthodes était observée**.** En effet, la quantification par la dPCR montre une diminution dans l'expression de l'abondance fractionnelle du variant muté de NPM1 alors que la droite de RT-qPCR a une allure plus stable **(Figure 28 B**).

- Pour le troisième patient, en rechute, les données montraient une surexpression du transcrit NPM1 plus marquée avec la dPCR. Cependant, il n'existe pas de prélèvement de suivi intermédiaire entre le diagnostic et la rechute pour ce patient. (**Figure 28C**).

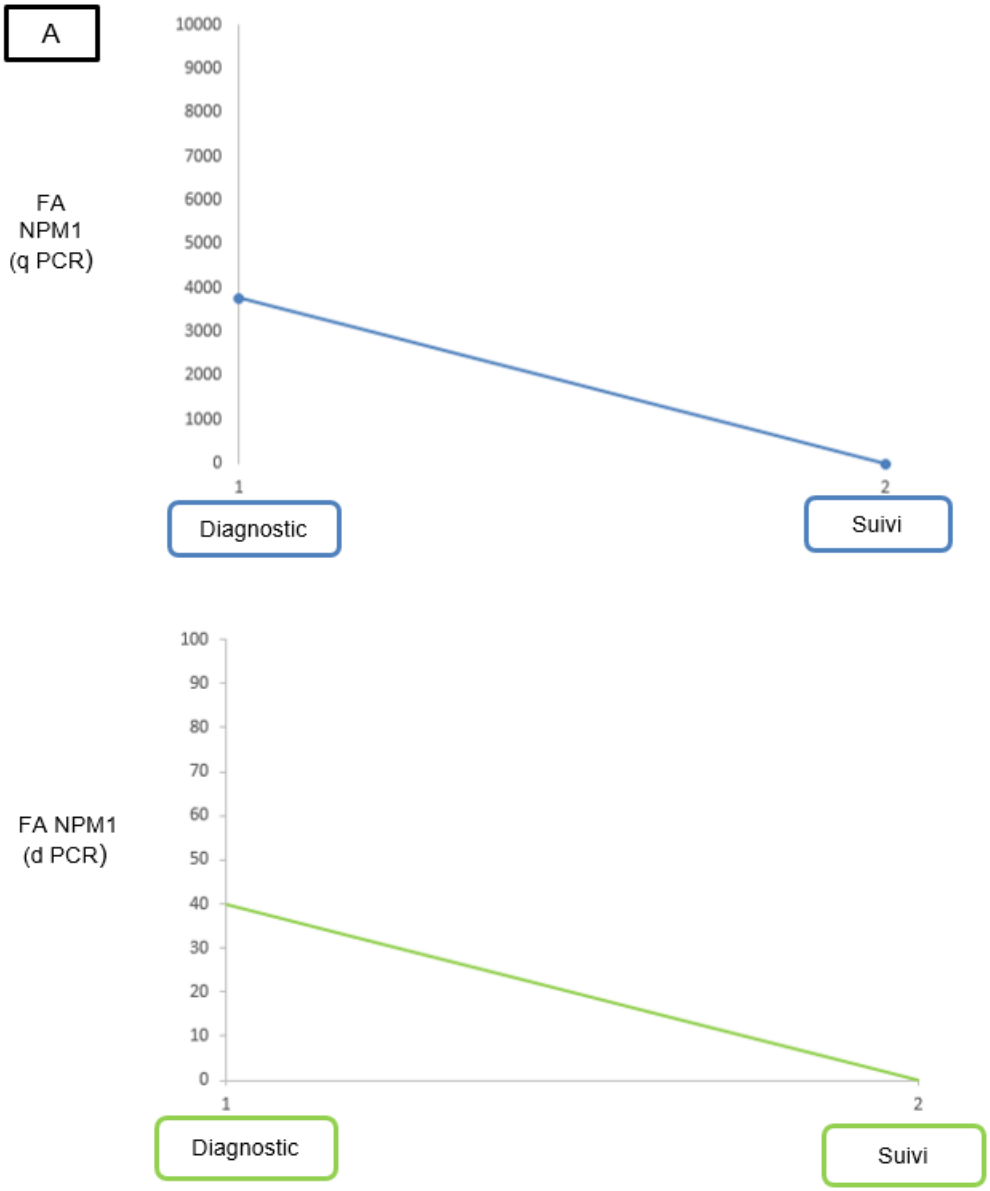


Figure 28 A: Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et dPCR, patient 1, en rémission moléculaire. L'axe des ordonnées représente la quantification du transcrit NPM1 pour chaque méthode.

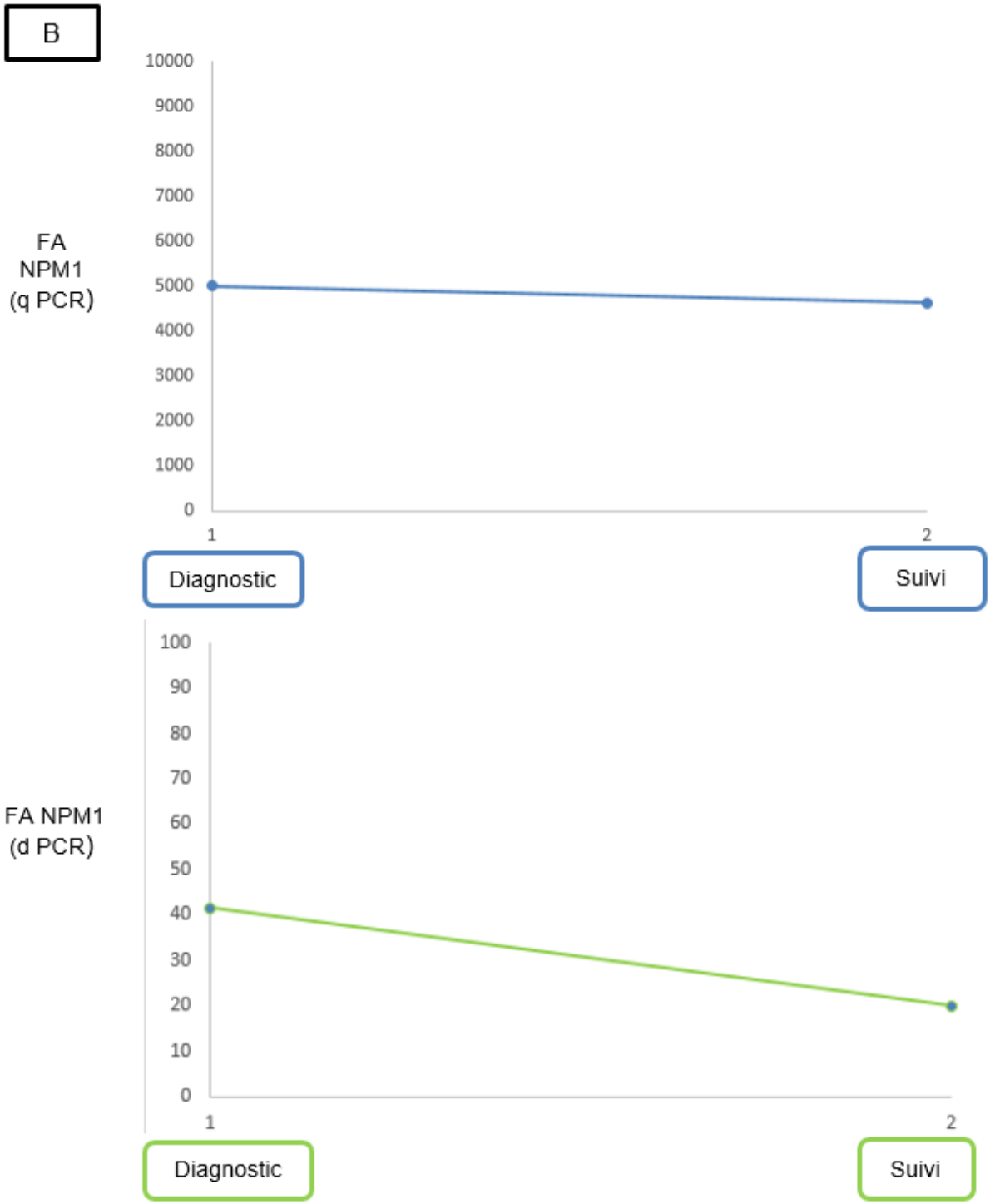


Figure 28 B : Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et dPCR, patient 2, en échec thérapeutique.

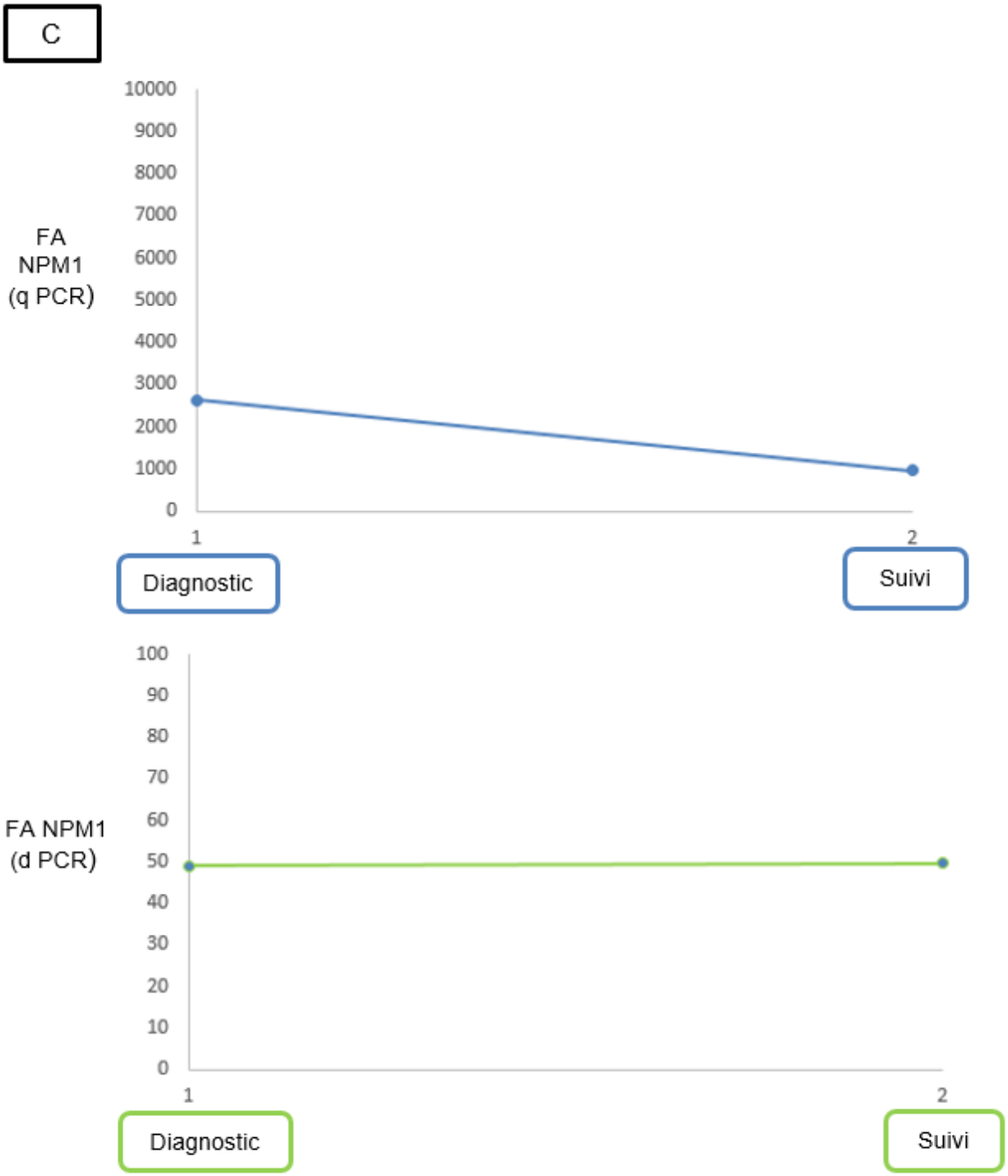


Figure 28 C : Quantification du transcrit NPM1 par RT-qPCR et dPCR, patient 3, en rechute.

NB : il n'y a pas eu de suivi intermédiaire entre ces 2 points [diagnostic ; rechute].

Partie 4) Discussion

L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD), est d'importance majeure dans le suivi des patients LAM en rémission cytologique. Elle permet d'anticiper la rechute cytologique et d'adapter la stratégie thérapeutique [18]. En effet, de récentes études suggèrent une amélioration de survie des patients lorsque le traitement de la LAM est basé sur l'évaluation de la maladie résiduelle permettant une adaptation de la stratégie thérapeutique [149´150]. Les mutations de l'exon 12 du gène *NPM1* constituent une cible idéale pour le suivi de la MRD. En effet, le transcrit NPM1c (muté) est surexprimé dans 30% des prélèvements diagnostiques des patients LAM. La RT-qPCR, en utilisant les amorces et les sondes conçues par Gorello et ses collaborateurs [129] pour la détection des mutation NPM1 type A, est actuellement la méthode de référence dans le suivi de la MRD chez les patients LAM NPM1c. La sensibilité de cette technique est plus élevée quand la détection est effectuée à partir d'ADNc [12].

La PCR digitale constitue une nouvelle technologie permettant une quantification absolue et précise des variants mutés, quantification basée sur le partitionnement du volume de l'échantillon initial et une estimation statistique adaptée (loi de Poisson). Elle représente un outil très sensible, avec une spécificité élevée pour la détection de variants rares [135´151] . Cependant peu d'études sont disponibles pour les applications de la dPCR dans les pathologies hématologiques.

Dans ce projet, nous nous sommes intéressés à évaluer la faisabilité de la dPCR dans le suivi de la MRD des LAM NPM1c en suivant plusieurs axes.

Le premier objectif de notre projet est d'évaluer les paramètres analytiques de la dPCR pour la détection de la mutation du gène *NPM1* type A à partir d'ADNg et d'ADNc de la lignée cellulaire OCI/AML3. Nous avons suivi les recommandations internationales de publication, relatives à l'utilisation de la technique de PCR digitale (*The Digital MIQE Guidelines*) afin de vérifier les paramètres essentiels et/ou souhaitables à mettre au point pour le déploiement de cette technique [137] (Tableau annexe 2).

La conception de nos amorces et sondes permet de détecter la mutation NPM1 sur les deux types d'acide nucléiques. Nos résultats montrent de bonnes performances analytiques concernant la limite de détection (sensibilité) pour l'ADNg, déterminée à 10^{-4} (0.01%) et de façon « répétable », comparable à celle de la RT-qPCR, décrite par Gorello et *al.* En effet, cette équipe a déterminé une limite de détection pour l'ADNg à 10^{-4}. Le seuil de détection de l'ADNg dans notre projet est meilleur, comparé à celui obtenu par Onecha et *al* [152]. Cette autre équipe avait déterminé une limite de détection à 10^{-3} en utilisant un couple d'amorce et une sonde différents de ceux choisis pour notre étude. Ce choix d'amorce et de sonde peut expliquer la différence observée. Les investigations dans d'autres pathologies hématologiques indiquent les mêmes ordres de grandeur pour la limite de détection. Par exemple, Drandi et *al.,* ont montré une limite de détection d'ADNg pour la mutation *MYD88* à 0.035% [153]. Les expérimentations de Minervini et *al*. pour la mutation *NOTCH1* au cours de la Leucémie lymphoïde chronique, ont abouti à une limite de détection à 0.03% [154].

En ce qui concerne l'ADNc, nous avons atteint une limite de détection à 10^{-4} avec une détection systématique du mutant de 10^{-3} (0.02%). Notre seuil de sensibilité est un peu moins profond que celui décrit par Gorello et *al*., pour la RT-qPCR, (10^{-4}). Une explication pour cette différence pourrait être en partie liée au dessin des amorces. Une autre explication serait en rapport avec l'efficacité de la rétrotranscription pour laquelle il est difficile techniquement de vérifier l'efficacité. Dans une étude très récente, Bill et ses collègues [155]

ont étudiés 51 échantillons de patients LAM NPM1 muté, par PCR digitale, et utilisé un autre couple d'amorces. Les amorces de cette étude ont été spécifiquement dessinées pour favoriser une hybridation sur les exons 11 et 12 du gène, favorisant l'analyse sur ADNc. Les auteurs de cet article ont déterminé un seuil de positivité à 0.01% pour l'ADNc. En appliquant ce seuil, ils ont déterminé la fraction mutée de NPM1 avant la greffe chez 6 patients ayant bénéficié d'une quantification par RT-qPCR. Les résultats entre les deux méthodes (RT-qPCR et dPCR) sont concordants chez 5 patients (83%). Un seul patient a une fraction NPM1 quantifiable uniquement par dPCR. Ce patient présente une rechute dans les 6 mois qui suivent la greffe. Dans une autre étude concernant un autre transcrit (*PML-RARA*), Brunetti et *al*. ont déterminé une limite de détection à 0.01% par dPCR, à partir d'ADNc. Cette étude montre que, pour atteindre ce seuil, une quantité plus importante en charge de l'ADN de l'ordre du microgramme est nécessaire [151]. Nos données montrent qu'avec une charge d'ADN moindre, un seuil de détection identique peut être atteint.

Dans notre travail, la limite de spécificité de la sonde, est définie à au moins deux bases de différence. Cette limite est non seulement confirmée par les constatations des populations des nuages pour les variants A et D, mais aussi pour les variants rare et sauvage. Cette double détection pour les variants A et D, à terme pourrait être avantageuse dans la mesure où la différence entre les intensités du signal pour ces deux variants est franche, et permettrait de réaliser le suivi pour un nombre plus important de patients. La limite de spécificité de la sonde (2 bases de différence) correspond aux observations rapportées et recommandées par le fournisseur.

Nos données indiquent également une très bonne répétabilité de la quantification du transcrit NPM1 muté de la lignée OCI/AML3. Ces données sont similaires avec les observations réalisées pour d'autres cibles, dans d'autres hémopathies. Drandi et *al*., ont rapporté les résultats de la répétabilité par dPCR, sur lignées cellulaires, pour les cibles suivantes :

réarrangement de la chaine lourde de l'immunoglobuline (*IGH*) pour le myélome multiple et le lymphome de la zone marginale, réarrangement *IGH/BCL2* pour le lymphome folliculaire. Les auteurs ont obtenu des résultats répétables et comparables à la RT-qPCR [156].

La charge d'ADN qui est normalement utilisée comme la charge d'entrée pour le paramétrage des méthodes de PCR dans le suivi de la MRD est de 500 ng [157] . Selon Velden et *al*., cette charge correspond approximativement à 10^5 cellules permettant d'atteindre une limite de détection de l'ordre de 10^{-5}. Effectivement Drandi et *al*., ont utilisé une charge d'ADNg de 500ng et ont pu atteindre une limite de détection de manière répétable, de l'ordre de 10^{-5}, pour le suivi de la MRD pour les réarrangements spécifiques du réarrangement *IGH* (myélome et lymphome de la zone marginale) et du réarrangement *IGH/BCL2* (lymphome folliculaire). Leurs analyses ne permettaient pas de reproduire le même taux de détection de façon répétable avec une charge d'ADNg à 100 ng [156]. Dans notre projet, nous avons pu atteindre le seuil de détection de 0.01% en chargeant une quantité d'ADN à 200 ng. Ce taux est plus profond à celui obtenu par Mansier et *al*., pour la mutation du gène *CALR* dans le cadre de suivi de la MRD pour les syndromes myéloprolifératifs. En effet, cette équipe a déterminé une limite de détection de l'ordre de 0.02% en utilisant une charge d'ADN variable entre 25 et 250 ng [158]. Nos données suggèrent que la dPCR permettrait d'atteindre un seuil de détection acceptable sans avoir besoin de charger une quantité importante de matériel génétique pour quantifier la mutation NPM1.

Le deuxième objectif de notre travail est d'évaluer, via une étude observationnelle, la cinétique de l'évolution de deux marqueurs de la MRD. Etant donné qu'une proportion non négligeable des patients avec LAM ne présente pas de cible spécifique moléculaire (absence de transcrit de fusion), la surexpression du marqueur WT1 constitue une cible intéressante, fournissant un bon marqueur moléculaire. En effet, une expression physiologique de l'ordre

de 50 et 250 copies par 10^4 copies d'ABL dans les prélèvements sanguins et médullaires de sujets sains, a été retrouvée [159]. Ce phénomène est à l'origine des limites de distinction entre une quantité faible d'un marqueur résiduel et l'expression physiologique faible de ce même marqueur. Il existe également des discordances dans la littérature concernant les résultats basés sur ce marqueur, lorsqu'il est comparé à un marqueur moléculaire spécifique (transcrit de fusion) [12]. Bien que des profils similaires soient observés entre les deux marqueurs WT1 et NPM1, les résultats suggèrent que le marqueur NPM1 serait plus adapté dans le suivi des patients LAM NPM1 muté. En effet nous avons pu détecter une fraction mutée NPM1 chez la plupart des patients alors que le marqueur de WT1 n'était pas surexprimé. Ces données sont en accord avec les résultats de Gorello et *al*. [129]. Dans leur analyse, menée sur 10 patients LAM avec mutation NPM1 de type A, quantifiée par RT-qPCR, l'ensemble des patients a exprimé des taux informatifs de mutant NPM1, dont l'expression est décrite comme plus élevée que la surexpression de WT1. Ces données ont été confirmées par Kristensen et *al*., qui ont rapporté une sensibilité plus élevée de marqueur NPM1 par rapport au marqueur WT1 [160]. L'ensemble de ces données confirment que la mutation NPM1 est spécifique des cellules leucémiques dont l'expression peut disparaitre après le traitement.

Le troisième volet de notre travail reposait sur une comparaison technique (dPCR vs RT-qPCR) pour le marqueur NPM1 sur les prélèvements médullaires. Le faible nombre de points de suivi et d'échantillons de patients ayant des résultats NPM1 déterminés par RT-qPCR a limité notre étude. Seuls trois patients ont pu être étudiés, sur deux points (diagnostic, suivi). Ce nombre insuffisant ne nous permet pas de tirer d'enseignement sur les deux techniques. Cependant, les données de littérature indiquent des résultats intéressants. Par exemple, Starza et *al*., dans une étude sur la comparaison entre dPCR et RT-qPCR, réalisée chez 50 patients atteints de leucémie aiguë lymphoblastique (LAL), pour les réarrangements des

gènes du récepteur d'Immunoglobuline et du récepteur T, ont montré une concordance parfaite lorsque le taux de la MRD est $\geq 10^{-4}$. De plus, lorsque ce taux est $<10^{-4}$ (31 échantillons dans leur étude), 7 échantillons (25%) étaient positifs non quantifiables par la RT-qPCR mais quantifiables par la dPCR [161]. Pour consolider ces résultats, Lacobucci et ses collaborateurs ont réalisé une étude de comparaison entre les deux méthodes pour le suivi des 60 patients avec LAL Philadelphie positive (transcrit *BCR-ABL1*), en obtenant des résultats très comparables entre les deux méthodes. Ils ont conclu que la PCR digitale est une méthode hautement sensible pour le suivi de la MRD, avec une précision meilleure que les autres approches techniques [162]. Les résultats de l'étude de Drandi et *al.,* évaluant les performances de la dPCR et de la RT-qPCR pour le suivi de la MRD dans le cadre du réarrangement *IGH* et du réarrangement *IGH/BCL2* montrent une excellente corrélation entre les 2 techniques. De plus, ils confirment que la dPCR permet de s'affranchir de la courbe standard, permettant ainsi de réduire le coût de l'examen [156]. L'étude de Brunetti et *al*. en analysant l'applicabilité de la dPCR comme un outil de détection de la MRD pour le transcrit *PML-RARA* dans le cadre des leucémies aiguës promyélocytaires, a établi une concordance statistiquement significative entre la dPCR et la RT-qPCR [151] . L'ensemble de ces données bibliographiques suggère que la dPCR est au moins équivalente, voir plus efficiente et moins onéreuse que la RT-qPCR, pour le suivi de marqueurs moléculaires variés, quelle que soit la nature de l'hémopathie.

5) Conclusion et Perspectives

Dans ce travail, nous avons réalisé une étude par PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) pour la détection du variant A de la mutation du gène *NPM1* dans les LAM, en montrant sa faisabilité à la fois sur ADNg et ADNc. Parallèlement, nous avons pu valider l'applicabilité technique de la sonde et des amorces utilisées.

L'implantation de cette technique au laboratoire et ses avantages potentiels nécessitent une mise au point technique fine, basée sur un ensemble de paramètres, détaillés dans notre travail. Notre étude nécessiterait également une confirmation des données obtenues chez les patients, par une étude rétrospective sur un nombre plus important d'échantillons.

La PCR digitale est une technologie récente, commercialisée depuis 2011. Elle est utilisée en routine dans certains laboratoires pour la quantification de la fraction mutée *JAK2 V617F* dans les syndromes myéloprolifératifs.

La ddPCR est décrite comme attractive et techniquement adaptée pour de nombreux marqueurs moléculaires, pour le suivi longitudinal de la MRD. Cette méthode est transposable pour d'autres mutations fréquentes au cours de la LAM comme les mutations « hot spot » des gènes *IDH1* et *IDH2*, au cours de la maladie de Waldenström comme la mutation récurrente *MYD88* L265P, pour le suivi des réarrangements IGH ou TCR et pour l'étude du chimérisme. Elle est également applicable pour la détection et l'analyse d'ADN circulant et de ce fait, serait un outil extrêmement prometteur pour le diagnostic et le suivi non invasif de certains marqueurs génétiques et moléculaires.

THÈSE SOUTENUE PAR : Ahmadreza ARBAB

TITRE : DETERMINATION DE LA FRACTION MUTEE DE NPM1 PAR PCR DIGITALE DAN LES LEUCEMIES AIGUES MYELOIDES

CONCLUSION :

La mutation du gène *NPM1* (*Nucleophosmine*) représente d'une des mutations acquises les plus fréquemment observées dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM), en particulier parmi les LAM à caryotype normal, au sein desquelles elle est détectée dans 45 à 64% des cas.

Parmi les nombreux types de mutants *NPM1*, la mutation de type A, défini par une duplication en tandem de 4 nucléotides (TCTG), représente 80% des mutants. L'expression des mutants *NPM1* constitue un marqueur moléculaire fiable et robuste, signant la présence de cellules leucémiques résiduelles. De ce fait, le suivi de ce marqueur est indiqué en routine dans la prise en charge des LAM. Le suivi de la maladie résiduelle permet donc de détecter précocement toute rechute de l'hémopathie et d'adapter la stratégie thérapeutique.

Le monitoring de la maladie résiduelle s'appuie actuellement sur la quantification des transcrits NPM1 mutés par PCR quantitative en temps réel (RQ-PCR). Les résultats sont exprimés en ratio « muté/normal » de mutants *NPM1,* et nécessite l'utilisation d'un gène de référence.

La PCR digitale, est une technologie récente qui permet la quantification absolue d'un évènement génétique rare. Elle repose sur le principe de micro-compartimentation de l'échantillon, par une méthode de dilution de l'échantillon, suivi d'une PCR classique en point final. L'une de ces approches consiste en la création de milliers de microgouttelettes. Le marquage fluorescent des deux variants muté et sauvage par deux sondes différentes, permet de détecter après PCR, les fractions mutées et sauvages dans chaque microgouttelette et d'estimer précisément la proportion du variant muté. La référence utilisée pour l'expression du ratio « muté/normal » est donc le gène cible sauvage. Les points forts de la PCR digitale sont nombreux : gène de référence identique à la cible recherchée, sensibilité quasi identique à la RQ-PCR, absence d'utilisation de gamme plasmidique (indispensable en RQ-PCR).

L'objectif de ce travail a consisté dans un premier temps à mettre au point la technique de PCR digitale en étudiant sa faisabilité sur ADN génomique (ADNg) et sur ADN complémentaire (ADNc). Dans un deuxième temps, nous avons évalué la performance de cette technique pour le mutant NPM1 type A en tant que marqueur de la maladie résiduelle et estimé la concordance avec le marqueur WT1.

Nous avons montré la faisabilité de réalisation de la PCR digitale sur les ADNg et ADNc. Nous avons pu valider l'application de la sonde dans la détection du variant A de mutation *NPM1*, tout en déterminant les paramètres optimaux de la technique pour cette détection (charge optimale d'ADN, température d'hybridation pour la sonde, conditions de thermocyclage, intérêt de la digestion préalable par une enzyme de restriction). Nous avons déterminé la limite de détection de la mutation NPM1 de type A pour l'ADNg et l'ADNc à 0.01% et 0.02%, respectivement. Nous avons pu également définir une limite de spécificité de la sonde établie pour la détection du variant A, en évaluant d'autres variants (non-A) de la mutation NPM1. Nos données montrent que la mise en évidence de la mutation NPM1 par PCR digitale, est limitée à deux nucléotides de différence avec le variant initialement ciblé. Nous avons prouvé la bonne répétabilité de cette méthode. Finalement, nous avons mis en évidence la concordance entre les résultats obtenus par PCR digitale pour le marqueur NPM1, et ceux obtenus pour le marqueur WT1, réalisés par RQ-PCR, au cours du suivi rétrospectif longitudinal d'une série de 9 patients. Nos données nécessitent d'être confirmées sur un nombre plus important d'échantillons.

En conclusion, la PCR digitale apparait comme un outil pertinent dans le suivi de la maladie résiduelle. Cette technique est relativement rapide et simple à mettre en œuvre, mais nécessite de nombreuses étapes de validation de méthode. C'est une technique transposable pour d'autres cibles dans d'autres pathologies hématologiques.

VU ET PERMIS D'IMPRIMER
Grenoble, le : 19/09/2018

UNIVERSITÉ GRENOBLE ALPES

LE DOYEN
DE L'UFR DE MÉDECINE

Pr. Patrice MORAND

LE PRÉSIDENT DE LA THÈSE
JURY DE MÉDECINE

Pr. Pascal MOSSUZ

Références

1. Dohner H, Estey E, Grimwade D, et al. ELN 2017. *Blood*. 2017;129(4):424-448. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.424
2. Voigt P, Reinberg D. Genomic and Epigenomic Landscapes of Adult De Novo Acute Myeloid Leukemia The Cancer Genome Atlas Research Network. *N Engl J Med*. 2013. doi:10.1056/NEJMoa1301689
3. Alikian M, Gale RP, Apperley JF, Foroni L, Alikian M. Molecular techniques for the personalised management of patients with chronic myeloid leukaemia. *Biomol Detect Quantif*. 2017. doi:10.1016/j.bdq.2017.01.001
4. Döhner H, Weisdorf DJ, Bloomfield CD. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015. doi:10.1056/NEJMra1406184
5. Box JK, Paquet N, Adams MN, et al. Nucleophosmin: From structure and function to disease development. *BMC Mol Biol*. 2016;17(1):1-12. doi:10.1186/s12867-016-0073-9
6. Heath EM, Chan SM, Minden MD, Murphy T, Shlush LI, Schimmer AD. Biological and clinical consequences of NPM1 mutations in AML. *Leukemia*. 2017;31(4):798-807. doi:10.1038/leu.2017.30
7. Falini B, Bolli N, Liso A, et al. Altered nucleophosmin transport in acute myeloid leukaemia with mutated NPM1: Molecular basis and clinical implications. *Leukemia*. 2009. doi:10.1038/leu.2009.124
8. Détection I, Perez-toralla K, Pekin D, et al. PCR digitale en micro- compartiments. 2015;31:84-92.
9. Lee E, Lee KJ, Park H, et al. Clinical Implications of Quantitative *JAK2* V617F Analysis using Droplet Digital PCR in Myeloproliferative Neoplasms. *Ann Lab Med*. 2018;38(2):147. doi:10.3343/alm.2018.38.2.147

10. Boissel N, Renneville A, Biggio V, et al. Prevalence, clinical profile, and prognosis of NPM mutations in AML with normal karyotype. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-05-2174

11. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, et al. Cytoplasmic Nucleophosmin in Acute Myelogenous Leukemia with a Normal Karyotype. *N Engl J Med*. 2005. doi:10.1056/NEJMoa041974

12. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: Which platforms are ready for “prime time”? *Blood*. 2014. doi:10.1182/blood-2014-05-577593

13. Karam A-I, Aziz N. Molecular landscape in acute myeloid leukemia: where do we stand in 2016. *Cancer Biol Med*. 2016;13(4):474. doi:10.20892/j.issn.2095-3941.2016.0061

14. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2016;374(23):2209-2221. doi:10.1056/NEJMoa1516192

15. Bullinger L, Döhner K, Dohner H. Genomics of acute myeloid leukemia diagnosis and pathways. *J Clin Oncol*. 2017;35(9):934-946. doi:10.1200/JCO.2016.71.2208

16. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J Clin*. 2018;68(1):7-30. doi:10.3322/caac.21442

17. Monnereau A, Binder-foucard F, Remontet L, et al. Estimation nationale de l’incidence des cancers en France entre 1980 et 2012_Etude à partir des registres des cancers du réseau Francim. *InVS*. 2013;Partie 2-.

18. Estey E, Grimwade D, Amadori S, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. 2017;129(4):424-448. doi:10.1182/blood-2016-08-733196.424

19. Gröschel S, Sanders MA, Hoogenboezem R, et al. A single oncogenic enhancer rearrangement causes concomitant EVI1 and GATA2 deregulation in Leukemia. *Cell*.

2014;157(2):369-381. doi:10.1016/j.cell.2014.02.019

20. Nacheva EP, Grace CD, Brazma D, et al. Does BCR/ABL1 positive Acute Myeloid Leukaemia Exist? *Br J Haematol*. 2013;161(4):541-550. doi:10.1111/bjh.12301

21. Wouters BJ, Löwenberg B, Erpelinck-Verschueren CAJ, Van Putten WLJ, Valk PJM, Delwel R. Double CEBPA mutations, but not single CEBPA mutations, define a subgroup of acute myeloid leukemia with a distinctive gene expression profile that is uniquely associated with a favorable outcome. *Blood*. 2009;113(13):3088-3091. doi:10.1182/blood-2008-09-179895

22. Gaidzik VI, Teleanu V, Papaemmanuil E, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia are associated with distinct clinico-pathologic and genetic features. *Leukemia*. 2016;30:2282. http://dx.doi.org/10.1038/leu.2016.207.

23. Bacher U, Schnittger S, Macijewski K, et al. Multilineage dysplasia does not influence prognosis in CEBPA-mutated AML, supporting the WHO proposal to classify these patients as a unique entity. *Blood*. 2012;119(20):4719-4722. doi:10.1182/blood-2011-12-395574

24. Schlenk RF, Taskesen E, Van Norden Y, et al. The value of allogeneic and autologous hematopoietic stem cell transplantation in prognostically favorable acute myeloid leukemia with double mutant CEBPA. *Blood*. 2013;122(9):1576-1582. doi:10.1182/blood-2013-05-503847

25. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009;114(14):3024-3032. doi:10.1182/blood-2009-01-197871

26. Medsker B, Forno E, Simhan H, Juan C, Sciences R. HHS Public Access. 2016;70(12):773-779. doi:10.1097/OGX.0000000000000256.Prenatal

27. Walter RB, Othus M, Burnett AK, et al. Signi fi cance of FAB subclassi fi cation of " acute myeloid leukemia , NOS " in the 2008 WHO classi fi cation : analysis of 5848 newly diagnosed patients. *Bloodjournal.org*. 2015;121(13):2424-2432. doi:10.1182/blood-2012-10-462440.Presented

28. Yilmaz AF, Saydam G, Sahin F, Baran Y. Granulocytic sarcoma: a systematic review. *Am J Blood Res*. 2013;3(4):265-270. www.AJBlood.us.

29. Roy A, Roberts I, Vyas P. Biology and management of transient abnormal myelopoiesis (TAM) in children with Down syndrome. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2012. doi:10.1016/j.siny.2012.02.010

30. Yoshida K, Toki T, Okuno Y, et al. The landscape of somatic mutations in Down syndrome-related myeloid disorders. *Nat Genet*. 2013. doi:10.1038/ng.2759

31. Matutes E, Pickl WF, Veer M Van, et al. outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification Mixed-phenotype acute leukemia : clinical and laboratory features and outcome in 100 patients defined according to the WHO 2008 classification. 2014;117(11):3163-3171. doi:10.1182/blood-2010-10-314682

32. Van Den Ancker W, Terwijn M, Westers TM, et al. Acute leukemias of ambiguous lineage: Diagnostic consequences of the WHO2008 classification. *Leukemia*. 2010. doi:10.1038/leu.2010.119

33. Kawajiri C, Tanaka H, Hashimoto S, et al. Successful treatment of Philadelphia chromosome-positive mixed phenotype acute leukemia by appropriate alternation of second-generation tyrosine kinase inhibitors according to BCR-ABL1 mutation status. *Int J Hematol*. 2014. doi:10.1007/s12185-014-1531-0

34. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*. 1976;33(4):451-458.

35. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: A consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. 2011;25(4):567-574. doi:10.1038/leu.2010.312

36. Linch DC, Hills RK, Burnett AK, Khwaja A, Gale RE. Impact of FLT3ITD mutant allele level on relapse risk in intermediate-risk acute myeloid leukemia. *Blood*. 2014;124(2):273-276. doi:10.1182/blood-2014-02-554667

37. Pratcorona M, Abbas S, Sanders MA, et al. Acquired mutations in ASXL1 in acute myeloid leukemia: Prevalence and prognostic value. *Haematologica*. 2012. doi:10.3324/haematol.2011.051532

38. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, et al. TP53 alterations in acute myeloid leukemia with complex karyotype correlate with specific copy number alterations, monosomal karyotype, and dismal outcome. *Blood*. 2012. doi:10.1182/blood-2011-08-375758

39. Saultz J, Garzon R. Acute Myeloid Leukemia: A Concise Review. *J Clin Med*. 2016. doi:10.3390/jcm5030033

40. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 2014. doi:10.1016/S1470-2045(14)70008-7

41. Medinger M, Lengerke C, Passweg J. Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Genomics Proteomics*. 2016. doi:13/5/317 [pii]

42. Gale RE, Green C, Allen C, et al. The impact of FLT3 internal tandem duplication mutant level, number, size, and interaction with NPM1 mutations in a large cohort of young adult patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2008. doi:10.1182/blood-2007-08-109090

43. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, et al. Insertion of FLT3 internal tandem duplication in the tyrosine kinase domain-1 is associated with resistance to chemotherapy and inferior outcome. *Blood*. 2009. doi:10.1182/blood-2009-03-209999

44. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, et al. IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature*. 2012. doi:10.1038/nature10860

45. Patel JP, Gönen M, Figueroa ME, et al. Prognostic relevance of integrated genetic profiling in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2012. doi:10.1056/NEJMoa1112304

46. Ley TJ, Ding L, Walter MJ, et al. DNMT3A mutations in acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2010. doi:10.1056/NEJMoa1005143

47. Garzon R, Volinia S, Papaioannou D, et al. Expression and prognostic impact of lncRNAs in acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014. doi:10.1073/pnas.1422050112

48. Shlush LI, Zandi S, Mitchell A, et al. Identification of pre-leukaemic haematopoietic stem cells in acute leukaemia. *Nature*. 2014. doi:10.1038/nature13038

49. Metzeler KH, Maharry K, Radmacher MD, et al. TET2 mutations improve the new European LeukemiaNet risk classification of acute myeloid leukemia: A cancer and leukemia group B study. *J Clin Oncol*. 2011. doi:10.1200/JCO.2010.32.7742

50. Chou WC, Chou SC, Liu CY, et al. TET2 mutation is an unfavorable prognostic factor in acute myeloid leukemia patients with intermediate-risk cytogenetics. *Blood*. 2011. doi:10.1182/blood-2011-02-339747

51. Tang J, Hou H, Chen C, et al. AML1 / RUNX1 mutations in 470 adult patients with de novo acute myeloid leukemia : prognostic implication and interaction with other gene alterations. *Blood*. 2009;114(26):5352-5361. doi:10.1182/blood-2009-05-223784.

52. Mendler JH, Maharry K, Radmacher MD, et al. RUNX1 mutations are associated with poor outcome in younger and older patients with cytogenetically normal acute myeloid leukemia and with distinct gene and MicroRNA expression signatures. *J Clin Oncol*. 2012. doi:10.1200/JCO.2011.40.6652

53. Koschmieder S, Halmos B, Levantini E, Tenen DG. Dysregulation of the C/EBPalpha

differentiation pathway in human cancer. *J Clin Oncol*. 2009. doi:10.1200/JCO.2008.17.9812

54. Fasan A, Haferlach C, Alpermann T, et al. The role of different genetic subtypes of CEBPA mutated AML. *Leukemia*. 2014. doi:10.1038/leu.2013.273

55. Metzeler KH, Becker H, Maharry K, et al. ASXL1 mutations identify a high-risk subgroup of older patients with primary cytogenetically normal AML within the ELN Favorable genetic category. *Blood*. 2011. doi:10.1182/blood-2011-08-368225

56. Alpermann T, Haferlach C, Eder C, et al. AML with gain of chromosome 8 as the sole chromosomal abnormality (+8sole) is associated with a specific molecular mutation pattern including ASXL1 mutations in 46.8% of the patients. *Leuk Res*. 2015. doi:10.1016/j.leukres.2014.11.026

57. Ernst P, Wang J, Korsmeyer SJ. The role of MLL in hematopoiesis and leukemia. *Curr Opin Hematol*. 2002. doi:10.1097/00062752-200207000-00004

58. Kadia TM, Jain P, Ravandi F, et al. TP53 mutations in newly diagnosed acute myeloid leukemia: Clinicomolecular characteristics, response to therapy, and outcomes. *Cancer*. 2016. doi:10.1002/cncr.30203

59. Yang L, Han Y, Saurez Saiz F, Minden MD. A tumor suppressor and oncogene: The WT1 story. *Leukemia*. 2007. doi:10.1038/sj.leu.2404624

60. Woehlecke C, Wittig S, Arndt C, Gruhn B. Prognostic impact of WT1 expression prior to hematopoietic stem cell transplantation in children with malignant hematological diseases. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2015. doi:10.1007/s00432-014-1832-y

61. Shen Y, Zhu YM, Fan X, et al. Gene mutation patterns and their prognostic impact in a cohort of 1185 patients with acute myeloid leukemia. *Blood*. 2011. doi:10.1182/blood-2011-03-343988

62. Liang DC, Liu HC, Yang CP, et al. Cooperating gene mutations in childhood acute

myeloid leukemia with special reference on mutations of ASXL1, TET2, IDH1, IDH2, and DNMT3A. *Blood*. 2013. doi:10.1182/blood-2012-06-436782

63. Bowen DT, Frew ME, Hills R, et al. RAS mutation in acute myeloid leukemia is associated with distinct cytogenetic subgroups but does not influence outcome in patients younger than 60 years. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-03-0867

64. Sattler M, Salgia R. Targeting c-Kit mutations: Basic science to novel therapies. *Leuk Res*. 2004. doi:10.1016/j.leukres.2003.10.004

65. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, et al. Adverse prognostic significance of KIT mutations in adult acute myeloid leukemia with inv(16) and t(8;21): a Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 2006. doi:10.1200/JCO.2006.06.9500

66. Boissel N, Leroy H, Brethon B, et al. Incidence and prognostic impact of c-Kit, FLT3, and Ras gene mutations in core binding factor acute myeloid leukemia (CBF-AML). *Leukemia*. 2006. doi:10.1038/sj.leu.2404188

67. Lund K, Adams PD, Copland M. EZH2 in normal and malignant hematopoiesis. *Leukemia*. 2014. doi:10.1038/leu.2013.288

68. Lindsley RC, Mar BG, Mazzola E, et al. Acute myeloid leukemia ontogeny is defined by distinct somatic mutations. *Blood*. 2015. doi:10.1182/blood-2014-11-610543

69. Thota S, Viny AD, Makishima H, et al. Genetic alterations of the cohesin complex genes in myeloid malignancies. *Blood*. 2014. doi:10.1182/blood-2014-04-567057

70. Walter RB, Othus M, Borthakur G, et al. Prediction of early death after induction therapy for newly diagnosed acute myeloid leukemia with pretreatment risk scores: A novel paradigm for treatment assignment. *J Clin Oncol*. 2011. doi:10.1200/JCO.2011.35.7525

71. Metzeler KH, Herold T, Rothenberg-Thurley M, et al. Spectrum and prognostic relevance of driver gene mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016.

doi:10.1182/blood-2016-01-693879

72. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood*. 2016. doi:10.1182/blood-2015-07-604496

73. Gaidzik VI, Bullinger L, Schlenk RF, et al. RUNX1 mutations in acute myeloid leukemia: Results from a comprehensive genetic and clinical analysis from the AML study group. *J Clin Oncol*. 2011. doi:10.1200/JCO.2010.30.7926

74. Schnittger S, Eder C, Jeromin S, et al. ASXL1 exon 12 mutations are frequent in AML with intermediate risk karyotype and are independently associated with an adverse outcome. *Leukemia*. 2013. doi:10.1038/leu.2012.262

75. Pratcorona M, Brunet S, Nomdedéu J, et al. Favorable outcome of patients with acute myeloid leukemia harboring a low-allelic burden FLT3-ITD mutation and concomitant NPM1 mutation: Relevance to post-remission therapy. *Blood*. 2013;121(14):2734-2738. doi:10.1182/blood-2012-06-431122

76. Allen C, Hills RK, Lamb K, et al. The importance of relative mutant level for evaluating impact on outcome of KIT, FLT3 and CBL mutations in core-binding factor acute myeloid leukemia. *Leukemia*. 2013. doi:10.1038/leu.2013.186

77. Jourdan E, Boissel N, Chevret S, et al. Prospective evaluation of gene mutations and minimal residual disease in patients with core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013. doi:10.1182/blood-2012-10-462879

78. Paschka P, Du J, Schlenk R, Gaidzik V. Secondary genetic lesions in acute myeloid leukemia with inv (16) or t (16;16): a study of the German-Austrian AML Study Group (AMLSG). *Blood*. 2013;121(1):170-178. doi:10.1182/blood-2012-05-431486.

79. Duployez N, Marceau-Renaut A, Boissel N, et al. Comprehensive mutational profiling of core binding factor acute myeloid leukemia. *Blood*. 2016. doi:10.1182/blood-2015-

12-688705

80. Faber ZJ, Chen X, Gedman AL, et al. The genomic landscape of core-binding factor acute myeloid leukemias. *Nat Genet*. 2016. doi:10.1038/ng.3709

81. Schnittger S, Kern W, Tschulik C, et al. Minimal residual disease levels assessed by NPM1 mutation-specific RQ-PCR provide important prognostic information in AML. *Blood*. 2009;114(11):2220-2231. doi:10.1182/blood-2009-03-213389

82. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: consensus document from ELN MRD Working Party. *Blood*. 2018;131(12):blood-2017-09-801498. doi:10.1182/blood-2017-09-801498

83. Platzbecker U, Avvisati G, Cicconi L, et al. Improved outcomes with retinoic acid and arsenic trioxide compared with retinoic acid and chemotherapy in non-high-risk acute promyelocytic leukemia: Final results of the randomized Italian-German APL0406 trial. *J Clin Oncol*. 2017. doi:10.1200/JCO.2016.67.1982

84. Grimwade D, Jovanovic J V., Hills RK, et al. Prospective minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy. *J Clin Oncol*. 2009. doi:10.1200/JCO.2008.20.1533

85. Willekens C, Blanchet O, Renneville A, et al. Prospective long-term minimal residual disease monitoring using RQ-PCR in RUNX1-RUNX1T1-positive acute myeloid leukemia: Results of the French CBF-2006 trial. *Haematologica*. 2016. doi:10.3324/haematol.2015.131946

86. Liu Yin JA, 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*. 2012. doi:10.1182/blood-2012-06-435669

87. Sugiyama H. Wilms' tumor gene wt1: Its oncogenic function and clinical application. *Int*

J Hematol. 2001;73(2):177-187. doi:10.1007/BF02981935

88. Liu Yin JA, 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*. 2012;120(14):2826-2835. doi:10.1182/blood-2012-06-435669

89. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood*. 2016. doi:10.1182/blood-2016-03-643544

90. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: A tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci*. 2013. doi:10.1002/pro.2240

91. Wang W, Budhu A, Forgues M, Wang XW. Temporal and spatial control of nucleophosmin by the Ran-Crm1 complex in centrosome duplication. *Nat Cell Biol*. 2005. doi:10.1038/ncb1282

92. Yu Y, Maggi LB, Brady SN, et al. Nucleophosmin Is Essential for Ribosomal Protein L5 Nuclear Export. *Mol Cell Biol*. 2006. doi:10.1128/MCB.26.10.3798-3809.2006

93. Chan WY, Liu QR, Borjigin J, et al. Characterization of the cDNA encoding human nucleophosmin and studies of its role in normal and abnormal growth. *Biochemistry*. 1989. doi:10.1021/bi00429a017

94. Hingorani K, Szebeni a, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 2000. doi:10.1074/jbc.M003278200

95. Nishimura Y, Ohkubo T, Furuichi Y, Umekawa H. Tryptophans 286 and 288 in the C-terminal region of protein B23.1 are important for its nucleolar localization. *Biosci Biotechnol Biochem*. 2002. doi:10.1271/bbb.66.2239

96. Bolli N, Nicoletti I, De Marco MF, et al. Born to be exported: COOH-terminal nuclear export signals of different strength ensure cytoplasmic accumulation of nucleophosmin

leukemic mutants. *Cancer Res*. 2007. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-0273

97. Jian Y, Gao Z, Sun J, et al. RNA aptamers interfering with nucleophosmin oligomerization induce apoptosis of cancer cells. *Oncogene*. 2009. doi:10.1038/onc.2009.275

98. Colombo E, Marine JC, Danovi D, Falini B, Pelicci PG. Nucleophosmin regulates the stability and transcriptional activity of p53. *Nat Cell Biol*. 2002. doi:10.1038/ncb814

99. Kurki S, Peltonen K, Latonen L, et al. Nucleolar protein NPM interacts with HDM2 and protects tumor suppressor protein p53 from HDM2-mediated degradation. *Cancer Cell*. 2004. doi:10.1016/S1535-6108(04)00110-2

100. Weber JD, Taylor LJ, Roussel MF, Sherr CJ, Bar-Sagi D. Nucleolar Arf sequesters Mdm2 and activates p53. *Nat Cell Biol*. 1999. doi:10.1038/8991

101. Kuo ML, Den Besten W, Bertwistle D, Roussel MF, Sherr CJ. N-terminal polyubiquitination and degradation of the Arf tumor suppressor. *Genes Dev*. 2004. doi:10.1101/gad.1213904

102. Falini B, Martelli MP, Bolli N, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2006. doi:10.1182/blood-2006-03-007013

103. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: Interaction with other gene mutations. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-05-2164

104. Thiede C, Koch S, Creutzig E, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 2006. doi:10.1182/blood-2005-08-3167

105. Kunchala P, Kuravi S, Jensen R, McGuirk J, Balusu R. When the good go bad: Mutant

NPM1 in acute myeloid leukemia. *Blood Rev*. 2018;32(3):167-183. doi:10.1016/j.blre.2017.11.001

106. Suzuki T, Kiyoi H, Ozeki K, et al. Clinical characteristics and prognostic implications of NPM1 mutations in acute myeloid leukemia. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-04-1733

107. Grisendi S, Bernardi R, Rossi M, et al. Role of nucleophosmin in embryonic development and tumorigenesis. *Nature*. 2005. doi:10.1038/nature03915

108. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res*. 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-2378

109. Falini B, Bolli N, Shan J, et al. Both carboxy-terminus NES motif and mutated tryptophan(s) are crucial for aberrant nuclear export of nucleophosmin leukemic mutants in NPMc+AML. *Blood*. 2006;107(11):4514-4523. doi:10.1182/blood-2005-11-4745

110. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*. 2008. doi:10.1182/blood-2007-06-098251

111. Den Besten W, Kuo ML, Williams RT, Sherr CJ. Myeloid leukemia-associated nucleophosmin mutants perturb p53-dependent and independent activities of the Arf tumor suppressor protein. *Cell Cycle*. 2005. doi:2174 [pii]

112. Leong SM, Tan BX, Ahmad BB, et al. Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood*. 2010;116(17):3286-3296. doi:10.1182/blood-2009-12-256149

113. Pasqualucci L, Liso A, Martelli MP, et al. Mutated nucleophosmin detects clonal multilineage involvement in acute myeloid leukemia: Impact on WHO classification.

Blood. 2006. doi:10.1182/blood-2006-06-026716

114. Schnittger S, Schoch C, Kern W, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-06-2248

115. Martelli MP, Manes N, Pettirossi V, et al. Absence of nucleophosmin leukaemic mutants in B and T cells from AML with NPM1 mutations: Implications for the cell of origin of NPMc+ AML [4]. *Leukemia*. 2008. doi:10.1038/sj.leu.2404857

116. Caudill JSC, Sternberg AJ, Li CY, Tefferi A, Lasho TL, Steensma DP. C-terminal nucleophosmin mutations are uncommon in chronic myeloid disorders. *Br J Haematol*. 2006. doi:10.1111/j.1365-2141.2006.06081.x

117. Chou WC, Tang JL, Lin LI, et al. Nucleophosmin mutations in de novo acute myeloid leukemia: The age-dependent incidences and the stability during disease evolution. *Cancer Res*. 2006. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-4316

118. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, et al. Acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic nucleophosmin (NPMc+AML) shows a distinct gene expression profile characterized by up-regulation of genes involved in stem-cell maintenance. *Blood*. 2005. doi:10.1182/blood-2005-02-0560

119. de Propris MS, Raponi S, Diverio D, et al. High CD33 expression levels in acute myeloid leukemia cells carrying the nucleophosmin (NPM1) mutation. *Haematologica*. 2011. doi:10.3324/haematol.2011.043786

120. Haferlach C, Mecucci C, Schnittger S, et al. AML with mutated NPM1 carrying a normal or aberrant karyotype show overlapping biologic, pathologic, immunophenotypic, and prognostic features. *Blood*. 2009. doi:10.1182/blood-2009-01-197871

121. Dufour A, Schneider F, Metzeler KH, et al. Acute myeloid leukemia with biallelic CEBPA gene mutations and normal karyotype represents a distinct genetic entity

associated with a favorable clinical outcome. *J Clin Oncol*. 2010. doi:10.1200/JCO.2008.21.6010

122. Green CL, Koo KK, Hills RK, Burnett AK, Linch DC, Gale RE. Prognostic significance of CEBPA mutations in a large cohort of younger adult patients with acute myeloid leukemia: Impact of double CEBPA mutations and the interaction with FLT3 and NPM1 mutations. *J Clin Oncol*. 2010. doi:10.1200/JCO.2009.26.2501
123. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*. 2008. doi:10.1056/NEJMoa074306
124. Gale RE, Lamb K, Allen C, et al. Simpson's paradox and the impact of different DNMT3A mutations on outcome in younger adults with acute myeloid leukemia. *J Clin Oncol*. 2015. doi:10.1200/JCO.2014.59.2022
125. Shayegi N, Kramer M, Bornhäuser M, et al. The level of residual disease based on mutant NPM1 is an independent prognostic factor for relapse and survival in AML. *Blood*. 2013. doi:10.1182/blood-2012-10-461749
126. Hubmann M, Köhnke T, Hoster E, et al. Molecular response assessment by quantitative real-time polymerase chain reaction after induction therapy in NPM1-mutated patients identifies those at high risk of relapse. *Haematologica*. 2014. doi:10.3324/haematol.2014.104133
127. Krönke J, Bullinger L, Teleanu V, et al. Clonal evolution in relapsed NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Blood*. 2013. doi:10.1182/blood-2013-01-479188
128. Ivey A, Hills RK, Simpson MA, et al. Assessment of Minimal Residual Disease in Standard-Risk AML. *N Engl J Med*. 2016. doi:10.1056/NEJMoa1507471
129. Gorello P, Cazzaniga G, Alberti F, et al. Quantitative assessment of minimal residual disease in acute myeloid leukemia carrying nucleophosmin (NPM1) gene mutations.

Leukemia. 2006;20(6):1103-1108. doi:10.1038/sj.leu.2404149

130. Quail MA, Smith M, Coupland P, et al. A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics*. 2012. doi:10.1186/1471-2164-13-341

131. Kohlmann A, Nadarajah N, Alpermann T, et al. Monitoring of residual disease by next-generation deep-sequencing of RUNX1 mutations can identify acute myeloid leukemia patients with resistant disease. *Leukemia*. 2014. doi:10.1038/leu.2013.239

132. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *Biotechniques*. 1992.

133. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Genetics*. 1999. doi:10.1073/pnas.96.16.9236

134. Olmedillas-López S, García-Arranz M, García-Olmo D. Current and Emerging Applications of Droplet Digital PCR in Oncology. *Mol Diagn Ther*. 2017. doi:10.1007/s40291-017-0278-8

135. Roloff G, Lai C, Hourigan C, Dillon L. Technical Advances in the Measurement of Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Med*. 2017. doi:10.3390/jcm6090087

136. Digital D. Table of Contents.

137. Huggett JF, Foy CA, Benes V, et al. The digital MIQE guidelines: Minimum information for publication of quantitative digital PCR experiments. *Clin Chem*. 2013. doi:10.1373/clinchem.2013.206375

138. Heyries KA, Tropini C, Vaninsberghe M, et al. Megapixel digital PCR. *Nat Methods*. 2011. doi:10.1038/nmeth.1640

139. Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, et al. High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number. *AnalChem*. 2011;83(1520-6882 (Electronic)):8604-8610.

140. Pekin D, Skhiri Y, Baret JC, et al. Quantitative and sensitive detection of rare mutations using droplet-based microfluidics. *Lab Chip*. 2011. doi:10.1039/c1lc20128j

141. Lo YMD, Lun FMF, Chan KCA, et al. Digital PCR for the molecular detection of fetal chromosomal aneuploidy. *Proc Natl Acad Sci*. 2007. doi:10.1073/pnas.0705765104

142. Sanders R, Huggett JF, Bushell CA, Cowen S, Scott DJ, Foy CA. Evaluation of digital PCR for absolute DNA quantification. *Anal Chem*. 2011. doi:10.1021/ac103230c

143. Dube S, Qin J, Ramakrishnan R. Mathematical analysis of copy number variation in a DNA sample using digital PCR on a nanofluidic device. *PLoS One*. 2008. doi:10.1371/journal.pone.0002876

144. Bhat S, Herrmann J, Armishaw P, Corbisier P, Emslie KR. Single molecule detection in nanofluidic digital array enables accurate measurement of DNA copy number. *Anal Bioanal Chem*. 2009. doi:10.1007/s00216-009-2729-5

145. Apport II, Caen O, Nizard P, et al. PCR digitale en micro- compartiments pour la détection quantitative d ’ADN tumoral circulant. 2015;31.

146. Sedlak RH, Jerome KR. Viral diagnostics in the era of digital polymerase chain reaction. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2013. doi:10.1016/j.diagmicrobio.2012.10.009

147. Quentmeier H, Martelli MP, Dirks WG, et al. Cell line OCI/AML3 bears exon-12 NPM gene mutation-A and cytoplasmic expression of nucleophosmin. *Leukemia*. 2005;19(10):1760-1767. doi:10.1038/sj.leu.2403899

148. Uchiyama Y, Nakashima M, Watanabe S, et al. Ultra-sensitive droplet digital PCR for detecting a low-prevalence somatic GNAQ mutation in Sturge-Weber syndrome. *Sci Rep*. 2016;6. doi:10.1038/srep22985

149. Zhu HH, Zhang XH, Qin YZ, et al. MRD-directed risk stratification treatment may improve outcomes of t(8;21) AML in the first complete remission: Results from the AML05 multicenter trial. *Blood*. 2013;121(20):4056-4062. doi:10.1182/blood-2012-11-

468348

150. Balsat M, Renneville A, Thomas X, et al. Postinduction minimal residual disease predicts outcome and benefit from allogeneic stem cell transplantation in acute myeloid leukemia with NPM1 mutation: A study by the acute leukemia French association group. *J Clin Oncol*. 2017;35(2):185-193. doi:10.1200/JCO.2016.67.1875

151. Brunetti C, Anelli L, Zagaria A, et al. Droplet Digital PCR Is a Reliable Tool for Monitoring Minimal Residual Disease in Acute Promyelocytic Leukemia. *J Mol Diagnostics*. 2017;19(3). doi:10.1016/j.jmoldx.2017.01.004

152. Onecha E, Linares M, Rapado I, et al. Novel deep targeted sequencing method for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2018:haematol.2018.194712. doi:10.3324/haematol.2018.194712

153. Drandi D, Genuardi E, Dogliotti I, et al. Highly sensitive MYD88^{I265p}mutation detection by droplet digital polymerase chain reaction in waldenström macroglobulinemia. *Haematologica*. 2018. doi:10.3324/haematol.2017.186528

154. Minervini A, Francesco Minervini C, Anelli L, et al. Droplet digital PCR analysis of NOTCH1 gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget*. 2016. doi:10.18632/oncotarget.13246

155. Bill M, Grimm J, Jentzsch M, et al. Digital droplet PCR-based absolute quantification of pre-transplant NPM1 mutation burden predicts relapse in acute myeloid leukemia patients. *Ann Hematol*. 2018. doi:10.1007/s00277-018-3373-y

156. Drandi D, Kubiczkova-Besse L, Ferrero S, et al. Minimal Residual Disease Detection by Droplet Digital PCR in Multiple Myeloma, Mantle Cell Lymphoma, and Follicular Lymphoma: A Comparison with Real-Time PCR. *J Mol Diagn*. 2015. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.05.007

157. van der Velden VHJ, Cazzaniga G, Schrauder A, et al. Analysis of minimal residual

disease by Ig/TCR gene rearrangements: Guidelines for interpretation of real-time quantitative PCR data. *Leukemia*. 2007. doi:10.1038/sj.leu.2404586

158. Mansier O, Migeon M, Saint-Lézer A, et al. Quantification of the Mutant CALR Allelic Burden by Digital PCR: Application to Minimal Residual Disease Evaluation after Bone Marrow Transplantation. *J Mol Diagnostics*. 2016. doi:10.1016/j.jmoldx.2015.07.007

159. Cilloni D, Renneville A, Hermitte F, et al. Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol*. 2009. doi:10.1200/JCO.2009.22.4865

160. Kristensen T, Møller MB, Friis L, Bergmann OJ, Preiss B. NPM1 mutation is a stable marker for minimal residual disease monitoring in acute myeloid leukaemia patients with increased sensitivity compared to WT1 expression. *Eur J Haematol*. 2011. doi:10.1111/j.1600-0609.2011.01673.x

161. Della Starza I, Nunes V, Cavalli M, et al. Comparative analysis between RQ-PCR and digital-droplet-PCR of immunoglobulin/T-cell receptor gene rearrangements to monitor minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Haematol*. 2016. doi:10.1111/bjh.14082

162. Iacobucci I, Lonetti A, Venturi C, et al. Use of a high sensitive nanofluidic array for the detection of rare copies of BCR-ABL1 transcript in patients with Philadelphia-positive acute lymphoblastic leukemia in complete response. *Leuk Res*. 2014. doi:10.1016/j.leukres.2014.02.005

Tableau annexe 1: Caractéristiques clinico-biologiques des patients

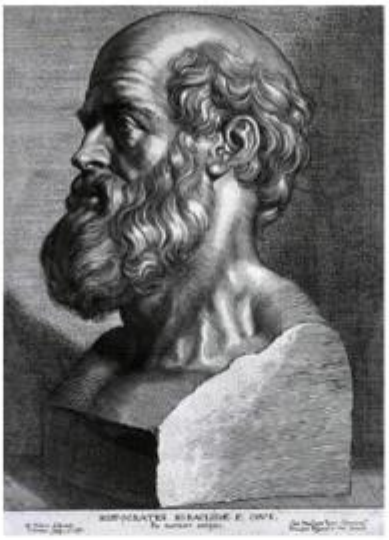
Patient	Age (an)	Statut de LAM	Leucocytose (G/L)	Classification FAB	Caryotype	Pronostic Cytogénétique	FLT3-ITD	DNMT3A
Cas 1	57	De novo	10,5	LAM4	46,XY,del(9)(q12q21)[19]	Intermédiaire	Non-muté	Muté
Cas 2	64	De novo	20,4	LAM2	46,XX[20]	Intermédiaire	Non-muté	Muté
Cas 3	47	De novo	9,7	LAM2	46,XY[20]	Intermédiaire	Muté	Non-muté
Cas 4	57	De novo	35	LAM1	46,XY[20]	Intermédiaire	Muté	Non-muté
Cas 5	68	Secondaire	138	LAM5	47,XY,+8[19]/46,XY[1]	Intermédiaire	Non-muté	Non-muté
Cas 6	69	De novo	151	LAM1	46,XY[20]	Intermédiaire	Muté	Non-muté
Cas 7	58	De novo	17	LAM2	46,XY[20]	Intermédiaire	Muté	Muté
Cas 8	67	De novo	53	LAM4	46,XY[20]	Intermédiaire	Muté	Muté
Cas 9	64	De novo	5,4	LAM4	46,XY[20]	Intermédiaire	Non-muté	Non-muté
Cas 10	65	De novo	187	LAM5	46,XX[20]	Intermédiaire	Non-muté	Muté

Tableau annexe 2 : Liste des paramètres à vérifier selon dMIQE [137]

Paramètre à vérifier	Importance	réalisation
Dessin de l'étude		
Définition du plan d'expérience	E	O
Echantillon		
Volume et/ou masse	E	O
Méthode de congélation	E	O
Condition de stockage	E	O
Extraction d'acide nucléique		
Méthode d'extraction	E	O
Condition de stockage	E	O
Méthode de quantification d'ADN et d'ARN	E	O
	E	O
Traitement du produit dérivé(digestion, chauffage)		
Prévention de la contamination	E	O
RT		
Méthode de RT	E	O
Quantité d'ARN/réaction	E	O
Composants de la RT	E	O
Efficacité de la RT	S	N
Contrôle RT négatif	S	N
Condition de stockage	S	O
Information concernant la cible		
Numéro d'accès « web » de la séquence	E	O
Taille de séquence amplifiée	E	O
alignement des séquences	S	O
localisation de chaque amorce	E	O

Paramètre à vérifier	Importance	réalisation
dPCR oligonucléotides		
Séquences des amorces	E	O
Séquence de la sonde	S	O
dPCR Protocol		
Volume de réaction	E	O
Concentration des composants (amorces, sonde ,Mg,…)	E	O
Identité de la polymérase et concentration	E	O
Catalogue des réactifs	E	O
Catalogue des matériels	S	O
Paramètres de Thermocyclage	E	O
Volume de mix de PCR (préparation)	S	O
Nombre de partitions	E	O
Volume de chaque partition	E	O
Volume total des partitions	E	O
Usage approprié des contrôles	E	O
Guide d'utilisation de l'instrument	E	O
ddPCR Validation		
Optimisation des données de l'expérience	S	O
Spécificité	E	O
Limite de détection	E	O
Analyse des données		
Moyenne des copies (λ)	E	O
logiciel d'analyse	E	O
Résultats de NTC	E	O
Nombre et concordance entre les réplicats	E	O
Répétabilité	E	O
Réproductibilité	S	N

E : Essentiel, S : Souhaitable O : Oui N : Non



SERMENT D'HIPPOCRATE

En présence des Maîtres de cette Faculté, de mes chers condisciples et devant l'effigie d'HIPPOCRATE,

Je promets et je jure d'être fidèle aux lois de l'honneur et de la probité dans l'exercice de la Médecine.

Je donnerai mes soins gratuitement à l'indigent et n'exigerai jamais un salaire au dessus de mon travail. Je ne participerai à aucun partage clandestin d'honoraires.

Admis dans l'intimité des maisons, mes yeux n'y verront pas ce qui s'y passe ; ma langue taira les secrets qui me seront confiés et mon état ne servira pas à corrompre les mœurs, ni à favoriser le crime.

Je ne permettrai pas que des considérations de religion, de nation, de race, de parti ou de classe sociale viennent s'interposer entre mon devoir et mon patient.

Je garderai le respect absolu de la vie humaine.

Même sous la menace, je n'admettrai pas de faire usage de mes connaissances médicales contre les lois de l'humanité.

Respectueux et reconnaissant envers mes Maîtres, je rendrai à leurs enfants l'instruction que j'ai reçue de leurs pères.

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

Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.