



HAL
open science

Mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type a au CHU de La Réunion. Évaluation du kit Ipsogen® NPM1 mutA mutaQuant.

Pierre-Louis Prairat

► To cite this version:

Pierre-Louis Prairat. Mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type a au CHU de La Réunion. Évaluation du kit Ipsogen® NPM1 mutA mutaQuant.. Sciences du Vivant [q-bio]. 2021. dumas-03543406

HAL Id: dumas-03543406

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-03543406>

Submitted on 26 Jan 2022

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

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

**UNIVERSITE DE LA REUNION
UFR SANTE**

Année 2021

N° :

THESE POUR LE DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN MEDECINE

MISE EN PLACE DE LA QUANTIFICATION DE LA MUTATION NPM1
DE TYPE A AU CHU DE LA REUNION. EVALUATION DU KIT
IPSOGEN® NPM1 MUTA MUTAQUANT.

Présentée et soutenue publiquement le 18 octobre 2021 à 18h à La
Réunion

Par Pierre-Louis Prairat

JURY

Président :

Madame la Professeure Bérénice Doray

Assesseurs :

Monsieur le Docteur Guillaume Miltgen

Monsieur le Docteur Quentin Cabrera

Madame le Docteur Loria Zalmäi

Directeur de Thèse :

Monsieur le Docteur Aguirre Mimoun

Liste des universitaires 2020/2021

AH-PINE Franck	Anatomie et cytologie pathologiques	CCU-AH	franck.ahpine@gmail.com
BENOIT de COIGNAC Capucine	Médecine Générale	CCU-MG	c.benoitdecoignac@gmail.com
BERTOLOTTI Antoine	Dermato-Vénérologie	MCU-PH	antoine.bertolotti@chu-reunion.fr
BOUKERROU Malik	Gynécologie obstétrique	PU-PH	malik.boukerrou@chu-reunion.fr
BRAUNBERGER Eric	Chirurgie thoracique et cardio-vasculaire	PU-PH	eric.braunberger@chu-reunion.fr
CHEYMOL Lucas	Médecine Générale	CCU-MG	cheymol.lucas@gmail.com
DESMARCHELIER Philippe	Médecine générale	PA-MG	philippe.desmarchelier@univ-reunion.fr
DI ASCIA Ludovic	Néphrologie	CCA	ludidias@hotmail.fr
DORAY Bérénice	Génétique	PU-PH	berenice.doray@chu-reunion.fr
DUMEZ Jessica	Médecine générale	CCU-MG	jessica.dumez@univ-reunion.fr
FRANCO Jean Marc	Médecine générale	PU-MG	jean-marc.franco@univ-reunion.fr
GAILLARD Patrick	Médecine générale	PA-MG	patrick.gaillard@univ-reunion.fr
GASQUE Philippe	Immunologie	PHU	philippe.gasque@univ-reunion.fr
GIGANTE Marc	Urologie	PU-PH	marc.gigante@chu-reunion.fr
GOMARD Philippe	Médecine générale	MCA-MG	philippe.gomard@univ-reunion.fr
GOUYON Jean-Bernard	Pédiatrie	PU	jean-bernard.gouyon@chu-reunion.fr
GUIHARD Bertrand	Médecine d'urgence	PA-PH	bertrand.guihard@chu-reunion.fr
IACOBELLI Silvia	Pédiatrie	PU-PH	silvia.iacobelli@chu-reunion.fr
LEGRAND Florian	Médecine générale	CCU-MG	florian.legrand49@gmail.com
LERUSTE Sébastien	Médecine générale	MCU-MG	sebastien.leruste@univ-reunion.fr
MARIMOUTOU Catherine	Santé Publique	PA-PH	catherine.marimoutou@chu-reunion.fr
MILTGEN Guillaume	Biologie médicale	PHU	guillaume.miltgen@chu-reunion.fr
NOBECOURT Estelle	Endocrinologie - Nutrition	PU-PH	estelle.nobecourt@chu-reunion.fr
PAGANIN Fabrice	Pneumologie	PA	fabrice.paganin@chu-reunion.fr

RAFFRAY Loïc	Médecine interne	MCU-PH	loic.raffray@chu-reunion.fr
RIQUEL Line	Médecine générale	PA-MG	linerun974@gmail.com
SAUVAT Frédérique	Chirurgie infantile	PU-PH	frederique.sauvat@chu-reunion.fr
SPODENKIEWICZ Michel	Psychiatrie	MCU-PH	michel.spodenkiewicz@chu-reunion.fr
TRAN Phuong Lien	Gynécologie obstétrique	CCA-AHU	phuong_lien_tran@yahoo.com
TREIBER Guillaume	Endocrinologie - Nutrition	CCA-AHU	treiber3389@hotmail.fr
VACHET-COPONAT Henri	Néphrologie	PU-PH	henri.vacher-coponat@chu-reunion.fr
VON THEOBALD Peter	Gynécologie obstétrique	PU-PH	peter.vontheobald@chu-reunion.fr
WANQUET Anne	Hématologie	CCA	anne.wanquet@chu-reunion.fr
WINER Arnaud	Anesthésie réanimation	PA-PH	arnaud.winer@chu-reunion.fr

Table des matières

INTRODUCTION	12
PARTIE I : LEUCEMIE AIGUE MYELOIDE	13
1) Définition et épidémiologie.....	13
2) Etiologies.....	13
3) Physiopathologie des LAM.....	14
a. Hématopoïèse normale	14
b. Leucémogénèse.	15
4) Clinique des LAM.....	17
5) Classifications des LAM.....	18
a. La classification FAB.....	18
b. La classification internationale de l'OMS.	19
6) Prise en charge thérapeutique.	21
a. Patient « fit » : apte à recevoir une chimiothérapie intensive à visée curative.	21
b. Patient « unfit »	22
7) Suivi des LAM et principe de la MRD (Measurable Residual Disease).	22
a. MRD en cytométrie en flux.....	23
b. MRD par biologie moléculaire.....	24
c. MRD par méthodes biochimiques.....	25
PARTIE II : NPM1 : DU GENE A LA PROTEINE.....	27
1) La famille NPM.....	27
2) Structure et expression du gène NPM1.	28
3) Domaines structurels et fonctionnels de NPM1.....	28
a. Extrémité N-terminale.	28
b. Région centrale.....	29
c. Extrémité C-terminale.	29
4) Fonctions de la protéine NPM1.	30
a. Chaperon moléculaire.....	30
b. Biogenèse des ribosomes.....	31
c. Régulation du cycle cellulaire.	33
d. Réparation des dommages à l'ADN.	34
e. Régulation des protéines suppresseurs de tumeur p14Arf et p53.....	35
5) Modifications post-traductionnelles.....	36

a. Phosphorylation.....	36
b. N-acétylation.....	36
c. Ubiquitination.....	37
d. SUMOylation	37
PARTIE III : LAM NPM1.....	38
1) Les mutations de NPM1.....	38
2) Physiopathologie des LAM NPM1.....	38
3) Paysage moléculaire des LAM NPM1.....	40
4) Caractéristiques pronostiques et prise en charge.....	41
5) Caractéristiques cliniques et biologiques.....	43
6) Thérapies ciblées.....	44
PARTIE IV : MISE EN PLACE DE LA QUANTIFICATION DE LA MUTATION NPM1 DE TYPE A AU CHU SUD REUNION. EVALUATION DU KIT IPSOGEN® NPM1 MUTA MUTAQUANT.....	45
1) Introduction.....	45
2) Etat des lieux de la prescription de la biologie moléculaire au CHU de La Réunion... ..	45
3) Matériels et méthodes.....	46
a. Patients.....	46
b. Matériels.....	47
c. Méthodes	49
4) Résultats	52
a. Validation analytique de la RT-qPCR.....	52
b. Résultats des 3 patients obtenus au CHU de La Réunion.....	53
c. Comparaison de nos résultats à l'hôpital Cochin.	58
d. Vérification de méthode du kit NPM1 MutA MutaQuant.....	66
Discussion.....	68
CONCLUSION	70
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :.....	71
ANNEXES :.....	79

Liste des figures :

Figure 1 : Taux d'incidence des LAM en France selon la classe d'âge en 2018.....	page 13
Figure 1: Modèle classique de l'hématopoïèse.....	page 14
Figure 2: Multiples réponses qui affectent le nombre de CSH.....	page 15
Figure 3: le "two-hit model" de leucémogénèse selon Gilliland et Griffin.....	page 16
Figure 4 : Groupes de mutations récurrentes des LAM de novo.....	page 16
Figure 5 : Leucémogénèse "multi-voies, mutli-causes, multi-étapes".....	page 17
Figure 6: Classification FAB des LAM.....	page 18
Figure 8 : Impact pronostic des anomalies cytogénétiques.....	page 19
Figure 9 : Progrès dans la définition du paysage moléculaire de la LAM.....	page 20
Figure 10 : Détail de la classification OMS des LAM en 2016.....	page 21
Figure 11 : Principe de la MRD.....	page 23
Figure 12 : Différentes techniques d'évaluation de la MRD.....	page 26
Figure 13 : Représentation schématique de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines nucléolaires du foie de rat.....	page 27
Figure 14 : Structure schématique des protéines NPM.....	page 28
Figure 15 : Organisation de l'extrémité N-terminale de la protéine NPM1.....	page 29
Figure 16 : Structure de l'extrémité C-terminale de NPM1.....	page 29
Figure 17 : Fonctions physiologiques de la protéine NPM1.....	page 30
Figure 18 : Biosynthèse du ribosome.....	page 32
Figure 19 : Les étapes du cycle cellulaire.....	page 33
Figure 20 : Implication de NPM1 dans la duplication du centrosome.....	page 34
Figure 21 : Fonctions de NPM1 dans diverses voies de réponse aux dommages de l'ADN.....	page 35
Figure 22 : La séquence NPM1 de type sauvage et six mutations associées aux LAM (types A à F).....	page 38
Figure 23 : Mécanisme d'altération du trafic nucléocytoplasmique de NPM1.....	page 39
Figure 24 : Paysage moléculaire des LAM NPM1.....	page 40
Figure 25 : Impact de la coexistence des mutations FLT3-ITD et NPM1 dans les LAM à caryotype normal.....	page 41
Figure 26 : Stratification du risque génétique des LAM selon l'ELN 2017.....	pages 41-42
Figure 27 : Points d'étude de la MRD par quantification de la mutation NPM1.....	page 42
Figure 28 : Groupes de risque initiaux et après MRD2 des LAM NPM1.....	page 43
Figure 29 : MRD NPM1 prédictive du risque de rechute et de la survie globale.....	page 43

Figure 30 : Caractéristiques de blastes avec aspect du noyau « cup-like-nuclei ».....	page 44
Figure 31 : Principe de la réaction PCR utilisant des sondes d'hydrolyse TaqMan.....	page 48
Figure 32 : PCR allèle spécifique.....	page 48
Figure 33 : LightCycler® 480.....	page 49
Figure 34 : Programme de PCR pour la quantification des transcrits NPM1 de type A selon les recommandations du kit Ipsogen® NPM1 Mut A Mutaquant.....	page 50
Figure 35 : Allure des courbes de fluorescence.....	page 52
Figure 36 : Pente de calibration pour les plasmides NPM1 A et ABL.....	page 53
Figure 37: Cinétique sang PATIENT 1 du diagnostic à la fin de traitement.....	page 54-55

Liste des tableaux

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques au diagnostic des 3 patients LAM NPM1 de type A sélectionnés.....	page 47
Tableau 2 : Statut de la MRD2 dans le sang et groupe de risque des 3 patients LAM NPM1 de type A sélectionnés selon le BIG-01.....	page 47
Tableau 3 : Cinétique sur sang PATIENT 1.....	page 55
Tableau 4 : Cinétique sur moelle osseuse PATIENT 1.....	page 56
Tableau 5 : Cinétique sur sang PATIENT 2.....	page 56
Tableau 6 : Cinétique sur sang PATIENT 3.....	page 57
Tableau 7 : Cinétique sur moelle osseuse PATIENT 3.....	page 57
Tableau 8 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 1 avec l'hôpital Cochin.....	page 58-59
Tableau 9 : Comparaison des résultats sur moelle osseuse du PATIENT 1 avec l'hôpital Cochin.....	page 60-61
Tableau 10 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 2 avec l'hôpital Cochin.....	page 61-62
Tableau 11 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 3 avec l'hôpital Cochin.....	page 63-64
Tableau 12 : Comparaison des résultats sur moelle osseuse du PATIENT 3 avec l'hôpital Cochin.....	page 64-65
Tableau 13 : Répétabilité.....	page 66
Tableau 14 : Reproductibilité.....	page 67
Tableau 15 : Exactitude.....	page 67
Tableau 16 : Analyse des EEQ en fit point.....	page 68

Liste des abréviations :

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

APE1 : Apurinic/aprimidinic Endonuclease 1

ASXL1 : Additional Sex Combs-Like 1

Bcl-2 : B cell lymphoma 2

BER : Base Excision Repair

BRCA 1 : breast cancer 1

BRCA1-BARD : BRCA1-associated RING domain protein

CBF β : Core-binding factor, sous-unité beta

CEBPA CCAAT/Enhancer Binding Protein

CENPA CENtromere Protein A Crm1 Chromosome Region Maintenance 1

CDKs : Cyclin-Dependent Kinases

CHIP : clonal hematopoiesis of indeterminate prognosis

CK2 : Casein kinase 2

CMF : cytométrie en flux

CRM-1 Chromosome Region Maintenance 1

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSL : cellule souche leucémique

DFC : compartiment fibrillaire dense

DfN : differences from normal

DHAC : histone desacetyltransferase

DNMT3A : DNA methyltransferase 3A

DUB : deubiquitinating enzymes

dPCR : Digital polymerase chain reaction

ELN : European leukemia net

ETS : external transcribed spacer

FAB : French-American-British

FC : centre fibrillaire

FLT3 : FMS-like tyrosine kinase 3

FLT3-ITD : FLT3 internal tandem duplication

FLT3 TKD : FLT3 tyrosine kinase domain

GC : centre granulaire

HAT : histone acetyltransferase
HDM2 : human mouse double minute 2
Hsp : heat shock protein
IDH1 et 2 : isocitrate deshydrogenase 1 et 2
ITS : internal transcribed spacer
LAIP : Leukemia Associated Immunophenotype
LAM : leucémie aigüe myéloïde
LAM CN : leucémie aigüe myéloïde à caryotype normal
MRD : Measurable residual disease
NGS : Next generation sequencing
NER : Nucleotide Excision Repair
NES : Nuclear Export Signals
NLS : Nuclear Localization Signal
NoLS : Nucleolar Localization Signal
NOR : région organisatrice nucléolaires
NOS : Not otherwise specified
NPM1 : Nucléophosmine/Nucléoplasmine 1
OMS : Organisation mondiale de la santé
Plk1 : Polo-like kinase 1
pRb : protéine du rétinoblastome
TP53 ou p53 : tumor protein 53
TLS Translesion Synthesis
TRIM TRIPartite Motif-containing protein
Ras : rat sarcoma virus
RCP : réunion de concertation pluridisciplinaire
rpL5 : ribosomal protein L5
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1
RT-qPCR : Real time quantitative polymerase chain reaction
SUMO : small-ubiquitin-like modifier
TET2 : tet methylcytosine dioxygenase
TLS : translesion synthesis
TTF-I : transcription termination factor RNA polymerase I

UMI : unique molecular identification

USP36 : Ubiquitin Specific Peptidase 36

WT1 : Wilms tumor 1

Xpo1 : exportine 1

2-HG : 2-hydroxyglutarate

INTRODUCTION

Les LAM NPM1 représentent 30% des LAM de l'adulte, ce qui en fait l'une des mutations les plus fréquemment retrouvées. La mutation NPM1 de type A est la plus fréquemment retrouvée (85% des cas).

La mise à jour 2016 de la classification des hémopathies malignes de l'OMS a fait de la LAM NPM1 une entité à part entière, classée parmi les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, de par ses caractéristiques clinico-biologiques et pronostiques propres.

La détection d'une mutation NPM1 au diagnostic, seule ou associée à d'autres anomalies moléculaires et cytogénétiques, permet de classer les patients dans des groupes pronostiques.

Les mutations NPM1 constituent également une cible sensible, spécifique et robuste qui est quantifiée pour le suivi de la maladie et constitue la MRD moléculaire (Measurable Residual Disease). La MRD2 sanguine, prélevée lors de la 2^{de} cure de consolidation, est décisionnelle et guide l'attitude thérapeutique. De plus, son suivi chez les patients en rémission cytologique permet une détection précoce des rechutes.

Le protocole BIG-01, travail des deux principaux groupes coopérateurs français de traitement des LAM (ALFA et GOELAMS) émet des recommandations nationales pour la prise en charge des LAM NPM1. La technique de référence pour la quantification des mutations NPM1 est la RT-qPCR sur ADN complémentaire.

20 LAM NPM1 ont été diagnostiquées au CHU Sud Réunion entre janvier 2015 et juillet 2020 et 17 sont des mutations NPM1 de type A (85%). Le typage de la mutation est réalisé à La Réunion. La quantification de la mutation, quant à elle, est envoyée en métropole, à l'hôpital Cochin à Paris. Ce suivi est à l'origine de délais de rendu et de dégradation de prélèvement précieux.

Ce travail a pour but d'évaluer la faisabilité de la mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type A au CHU Sud Réunion par l'utilisation du kit NPM1 MutA MutaQant du fournisseur QIAGEN afin d'optimiser le suivi des patients de La Réunion.

PARTIE I : LEUCEMIE AIGUE MYELOIDE.

1) Définition et épidémiologie.

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) forment un groupe hétérogène d'hémopathies malignes qui touchent la cellule souche hématopoïétique (CSH). Elles se caractérisent par une expansion clonale de cellules myéloïdes immatures qui infiltrent rapidement la moelle osseuse puis le sang et/ou d'autres tissus. Ces cellules myéloïdes immatures, appelées « blastes », correspondent à des progéniteurs myéloïdes bloqués à un stade précoce de leur différenciation qui ne répondent pas aux signaux normaux de prolifération. Leur prolifération médullaire incontrôlée altère rapidement l'hématopoïèse normale. (1)

Le seuil de 20% de blastes dans la moelle (ou dans le sang) est retenu par l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) pour établir le diagnostic de leucémie aiguë (LA).

On estime à 3 428 le nombre de nouveaux cas de LAM en France en 2018 avec un rapport hommes/femmes égal à 1,35.

Bien que la LAM puisse survenir à n'importe quel âge, c'est principalement une pathologie du sujet âgé, avec un âge médian au diagnostic de 69 ans chez l'homme et 72 ans chez la femme.

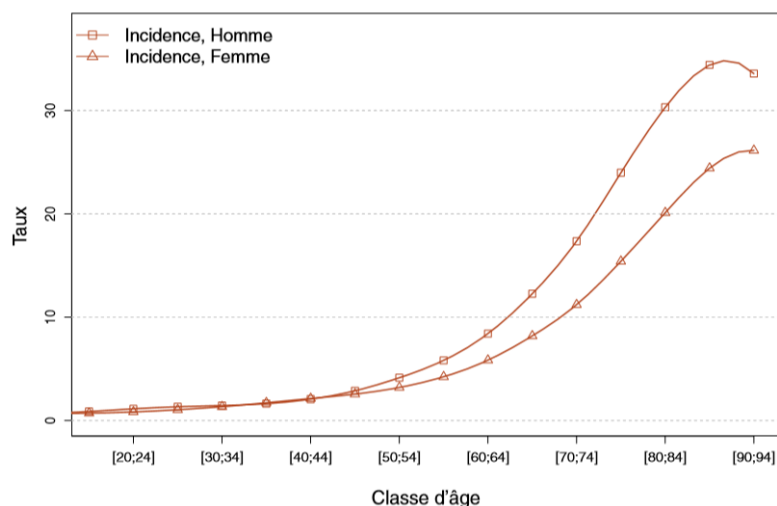


Figure 7: Taux d'incidence des LAM en France selon la classe d'âge en 2018. (2)

2) Etiologies

Les LAM représentent 80% des leucémies aiguës chez l'adulte. Dans la majorité des cas, la maladie survient *de novo*, suite à l'apparition de mutations somatiques affectant les précurseurs hématopoïétiques.

Certains facteurs de risque ont été cependant identifiés (3) :

- Facteurs génétiques constitutionnels (syndrome de Down, syndrome de Klinefelter, ataxie télangiectasies, syndrome de Schwachmann, neurofibromatose, anémie de Fanconi).

- Exposition à des toxiques environnementaux : tabac, produits chimiques (benzène, pesticides, herbicides, hydrocarbures aromatiques), radiations ionisantes thérapeutiques ou non.
- LAM secondaires aux chimiothérapies (agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase de type II, anthacyclines, taxanes) ou à l'acutisation de maladies hématologiques préexistantes (syndromes myélodysplasiques, syndromes myéloprolifératifs, aplasies médullaires/hémoglobinurie paroxystique nocturne).

3) Physiopathologie des LAM.

a. Hématopoïèse normale

L'hématopoïèse correspond à l'ensemble des mécanismes assurant la production constante et régulée des diverses cellules sanguines à partir de la cellule souche hématopoïétique. A la naissance, cette production est entièrement assurée au sein de structures spécialisées de la moelle osseuse appelées niches hématopoïétiques, qui permet de produire 10^{12} cellules sanguines par jour. Cette importante production, nécessaire au renouvellement permanent du système sanguin, la rend sensible aux mutations génétiques.

L'hématopoïèse engagée dans la différenciation myéloïde produit les cellules de la lignée granuleuse, érythrocytaire et mégacaryocytaire.

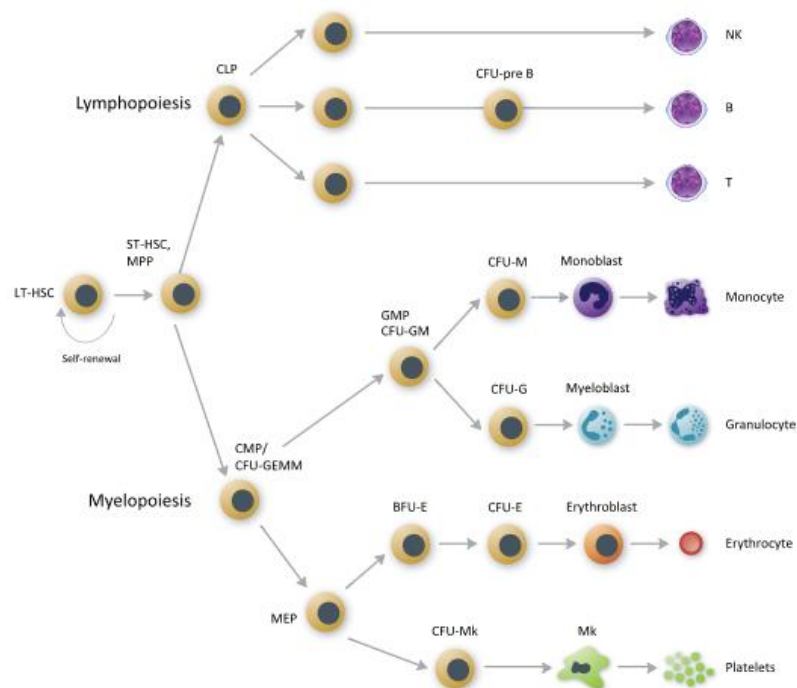


Figure 8: Modèle classique de l'hématopoïèse. La cellule souche hématopoïétique (Hematopoietic Stem Cell ou HSC) est une cellule souche multipotente. Elle s'engage dans les différents lignages cellulaires en passant par des stades progéniteurs intermédiaires (progéniteur multipotent ou Multipotential Progenitor/MPP) qui s'engagent dans la différenciation myéloïde, progéniteur myéloïde commun ou Common myeloid progenitor/CMP) puis progéniteur granulomonocytaire ou GMP et mégacaryo-érythrocytaire

ou MEP. Ces progéniteurs se différencient en précurseurs à l'origine des éléments myéloïdes matures du sang.(Figure 2) (4)

La cellule souche hématopoïétique (CSH) est une cellule souche multipotente, issue du mésoblaste intra-embryonnaire, à l'origine du tissu hématopoïétique. C'est une cellule rare qui occupe moins de 1% du compartiment médullaire. Elle possède différentes caractéristiques fonctionnelles (5) :

- Une capacité d'auto-renouvellement qui permet de maintenir le pool de CSH grâce à des divisions symétriques.
- Une capacité de différenciation par division asymétrique qui produit une cellule progénitrice multipotente.
- Il s'agit d'une cellule quiescente, en phase G0 du cycle cellulaire, qui peut résister aux altérations.

Les propriétés de la CSH sont finement régulées par des facteurs intrinsèques (facteurs de transcription, régulations épigénétiques) et extrinsèques (microenvironnement de la niche hématopoïétique).

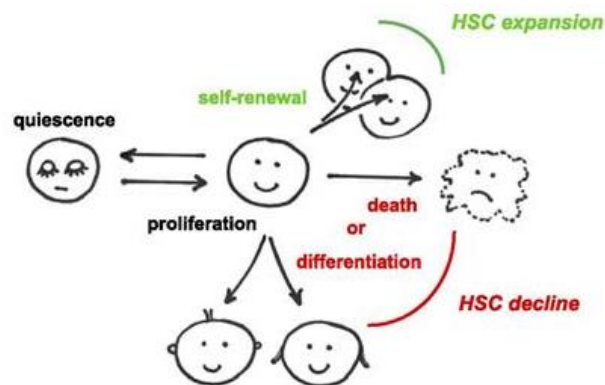


Figure 9: Multiples réponses qui affectent le nombre de CSH. (5)

A l'heure actuelle, la caractérisation phénotypique des CSH en cytométrie en flux n'a pas mis en évidence de marqueur de surface qui leur est propre. CSH et progéniteurs immatures ne peuvent pas être distingués en routine. Leur étude fine en recherche est possible par des techniques de caractérisation fonctionnelle. (6)

b. Leucémogénèse.

Un premier schéma de leucémogénèse, le « two hit model » de Gilliland et Griffin, a été proposé pour expliquer la physiopathologie de la maladie. Celui-ci consiste en la coopération nécessaire de deux mutations, de classes différentes, dans la CSH pour provoquer une LAM. Une mutation de classe II, ciblant des facteurs de transcription myéloïde ou créant des gènes de fusion, initie une interférence avec la différenciation myéloïde. Une mutation de classe I, touchant par exemple FLT3, les voies c-kit ou NRAS, s'ajoute et confère un avantage prolifératif. (7)

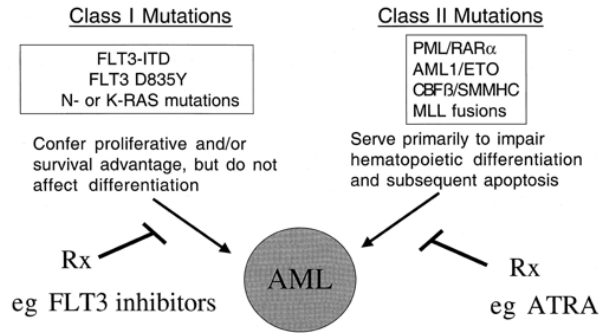


Figure 10: le "two-hit model" de leucémogénèse selon Gilliland et Griffin.

Ce modèle offrait une explication concordante à la pathogénèse de la LAM, une maladie associant un blocage de différenciation et une prolifération incontrôlée.

Cependant, la découverte de nouvelles mutations en biologie moléculaire, inclassables I ou II, ont révélé un modèle certainement plus complexe.

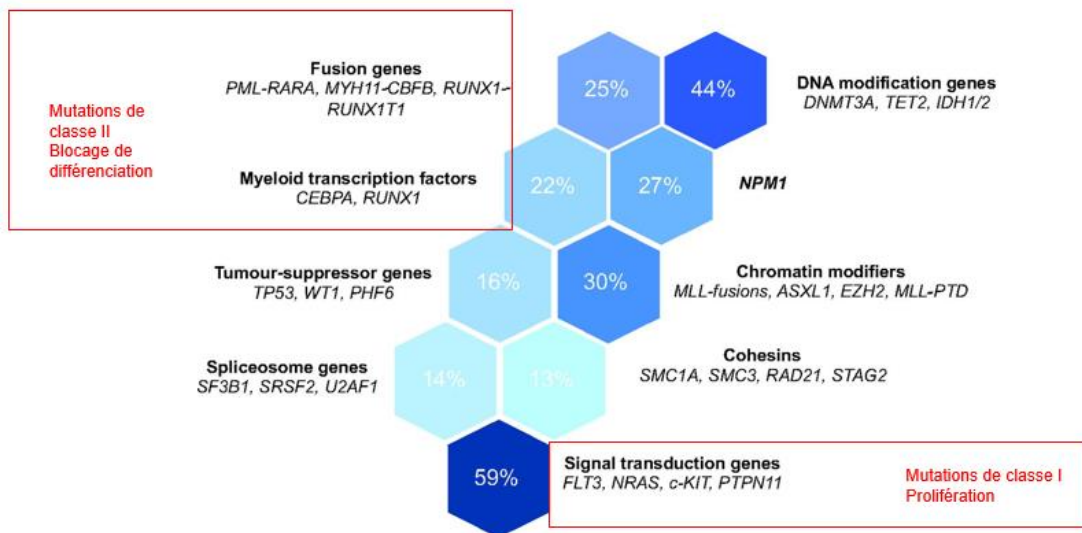


Figure 11 : Groupes de mutations récurrentes des LAM de novo (8)

L'étude de la leucémogénèse tend à mettre en évidence un processus complexe « multi-voies, mutli-causes et multi-étapes ». (9) L'altération de nombreuses voies cellulaires impliquant des facteurs de transcription et des régulateurs épigénétiques engendre une hématopoïèse clonale, dynamique dans le temps, qui acquiert et perd des mutations spécifiques à différents moments. Bien que les anomalies génétiques acquises soient récurrentes dans les blastes leucémiques, leur cause est encore inconnue mais des facteurs de risque liés au vieillissement, à des expositions génétiques et environnementales ont été rapportés.

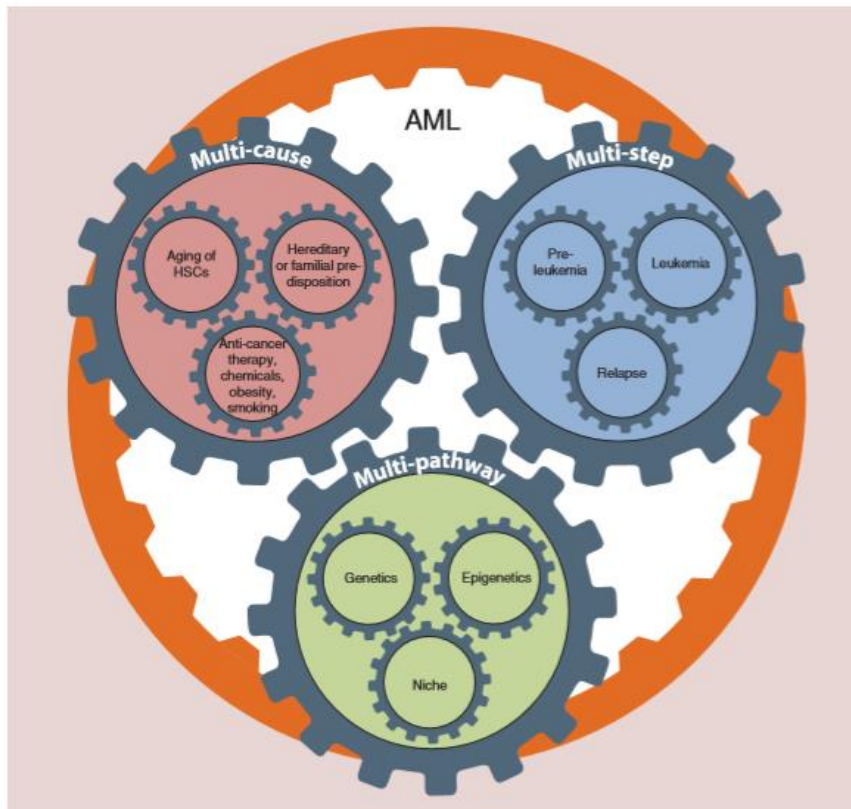


Figure 12 : Leucémogénèse "multi-voies, mutli-causes, multi-étapes".

La théorie actuelle serait l'apparition d'une mutation somatique prédisposante dans la CSH, souvent liée à l'âge, à l'origine d'un état pré-leucémique et d'une hématopoïèse clonale (« weak hit »). Un second évènement (« strong hit ») apparaît dans ces cellules qui prolifèrent davantage et qui sont donc plus sensibles aux mutations. Ce second évènement semble également reprogrammer les cellules mutées « sous forme » de cellule souche aberrante.

4) Clinique des LAM.

La symptomatologie des LAM est l'expression de la profondeur des cytopénies résultant de l'envahissement médullaire par les blastes, associée à une altération de l'état général :

- Un syndrome anémique (dyspnée, souffle cardiaque fonctionnel, vertiges, acouphènes/phosphènes) lié à la baisse de l'hémoglobine.
- Des évènements hémorragiques cutanéomuqueux ou profonds (gingivorragies, épistaxis, hématurie, saignements intracrâniens ou digestifs) symptomatiques d'une thrombopénie.
- Evènements Infectieux de tout type en lien avec la neutropénie.

L'examen clinique peut mettre en évidence un syndrome tumoral (adénopathies superficielles, splénomégalie). Il peut aussi exister des infiltrations tumorales atypiques telles que des hypertrophies gingivales, des lésions cutanées ou des symptômes neurologiques en cas d'atteinte du système nerveux central. Il a également été décrit des localisations extra-médullaires nommées chlorome ou sarcome myéloïde, consistant en l'envahissement d'un tissu ou d'un os par des blastes.

5) Classifications des LAM

L'hétérogénéité des LAM, progressivement mise en lumière par l'évolution des techniques de séquençage génomique, a fait évoluer les classifications de la maladie.

a. La classification FAB.

La classification French-American-British, émise par un groupe d'hématologistes français, américains et britanniques dans les années 1970, représente la première tentative de catégorisation de la maladie. (10)

Elle se base sur l'observation morphologique des frottis médullaires colorés au May-Grunwald-Giemsa, couplée à une analyse cytochimique. La détection d'une activité de la myéloperoxydase, enzyme spécifique des granulations primaires des cellules de la lignée granulo-monocytaire, oriente vers des blastes d'origine myéloïde. Ainsi, les LAM sont classées en fonction de leur engagement dans la différenciation d'une lignée hématopoïétique et leur degré de maturation.

FAB	Dénomination	Principaux critères cytologiques
LAM0	LAM avec différenciation minimale	Blastes indifférenciés > 90%
LAM 1	LAM sans maturation	Myéloblastes > 90%
LAM 2	LAM avec maturation	Myéloblastes 20 – 90%
LAM 3	LA promyélocytaire	Blastes hypergranuleux contenant parfois des corps d'Auer en fagots
LAM 3v		Variant cytologique hypogranuleux
LAM 4	LA myélomonocytaire	Monocytose sanguine > 5 G/L ou monocytose médullaire > 20%
LAM 4Eo		Excès d'éosinophiles dysplasiques dans le variant
LAM 5	LA monoblastique	Cellules monocytaires > 80%
		LAM 5a : sans maturation LAM 5b : avec maturation
LAM 6	Erythroleucémie (n'existe plus dans la classification OMS 2016)	< 50% d'érythroblastes et > 20% de myéloblastes parmi le contingent non érythroblastique
	LA érythroïde pure	>80% d'érythroblastes dont > 30% proérythroblastes
LAM 7	LA mégacaryocytaire	Blastes > 20% dont au moins la moitié sont des mégacaryoblastes

Figure 13: Classification FAB des LAM (10)

b. La classification internationale de l'OMS.

La classification internationale de l'OMS de 2001, revue en 2008 (11) puis 2016 (12), est désormais la référence.

L'objectif de cette classification est de définir des entités pathologiques spécifiques. Les études cliniques et biologiques ont mis à jour des anomalies cytogénétiques et moléculaires récurrentes qui interfèrent avec la prolifération et la maturation de la lignée myéloïde. Afin d'évaluer la diversité clinique et biologique des LAM, il est indispensable d'ajouter aux critères morphologiques, les nouvelles données cytogénétiques et moléculaires disponibles. Cette classification permet d'affiner la corrélation du type de LAM avec son pronostic et ses caractéristiques biologiques. (11)

Le caryotype au diagnostic est l'un des indicateurs pronostics indépendants les plus puissants dans la LAM. (13)

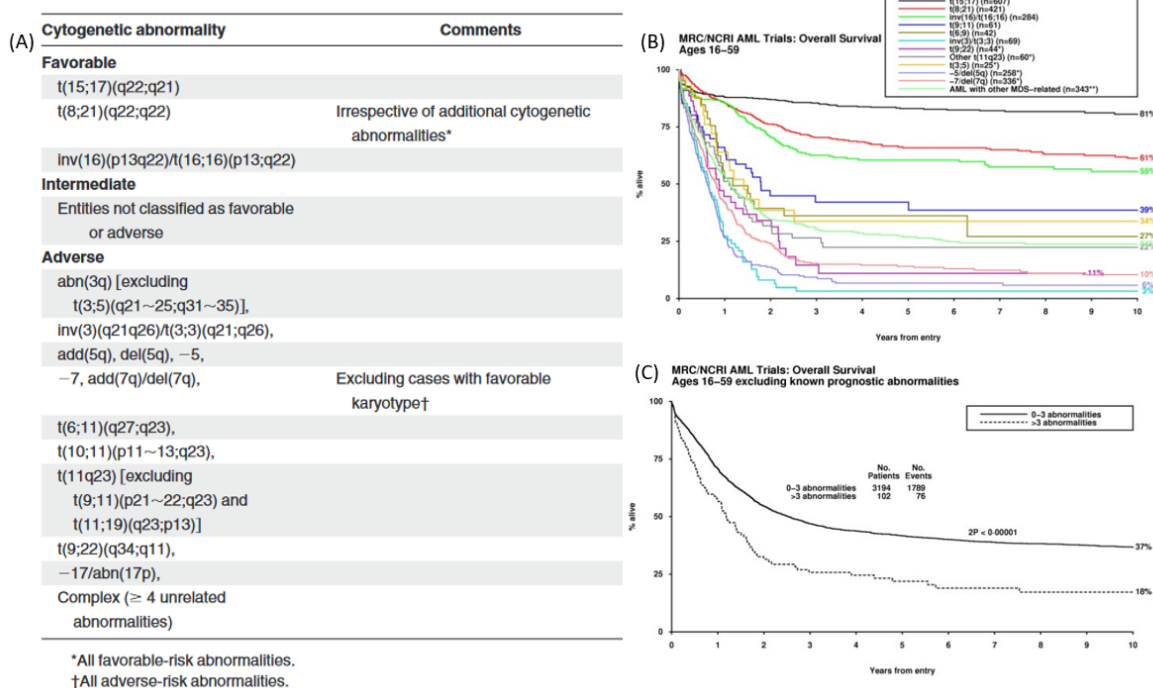


Figure 8 : Impact pronostic des anomalies cytogénétiques. (A) Classification pronostique des anomalies cytogénétiques. (B) Pronostic des patients selon la classification cytogénétique. (C) Impact de la complexité du caryotype sur la survie des patients. (13)

Dans 40% des LAM, le caryotype est normal. Les progrès de la biologie moléculaire ont permis de mettre en évidence de nombreuses anomalies associées aux LAM qui peuvent moduler le pronostic intermédiaire ou favorable du caryotype. L'apport pronostic de la biologie moléculaire, plus sensible, est complémentaire à la cytogénétique. (14)

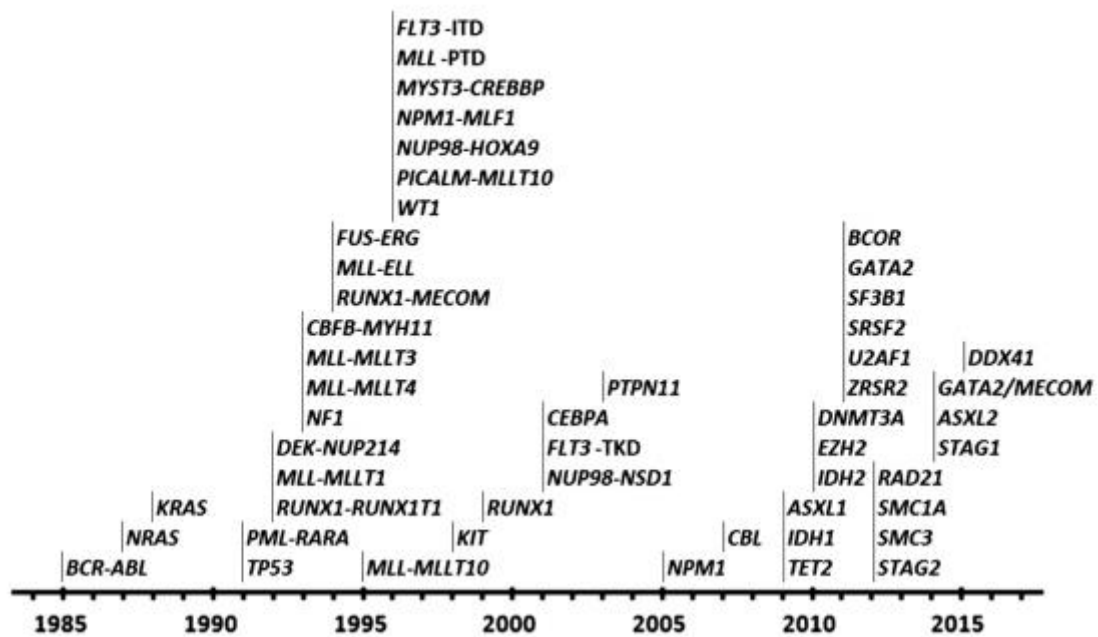


Figure 9 : Progrès dans la définition du paysage moléculaire de la LAM. Moment de l'identification des gènes de fusion leucémique et des mutations qui sous-tendent la pathogénèse de la LAM. (13)

Cette classification a individualisé 6 groupes de LAM :

- LAM avec anomalies génétiques récurrentes.
- LAM avec myélodysplasie associée
- LAM secondaire à un traitement de chimiothérapie ou radiothérapie antérieur
- LAM NOS/ « Not Otherwise Specified » : LAM non spécifiée, inclassable selon les groupes précédents, qui est catégorisée selon FAB.
- Sarcome myéloïde
- Proliférations myéloïdes associées au syndrome de Down

Les leucémies aiguës indifférenciées et biphénotypiques (Acute leukemias of ambiguous lineage) ne sont pas à proprement parler des LAM. Ce sont des leucémies qui présentent des caractéristiques mixtes, à la fois lymphoïde et myéloïde.

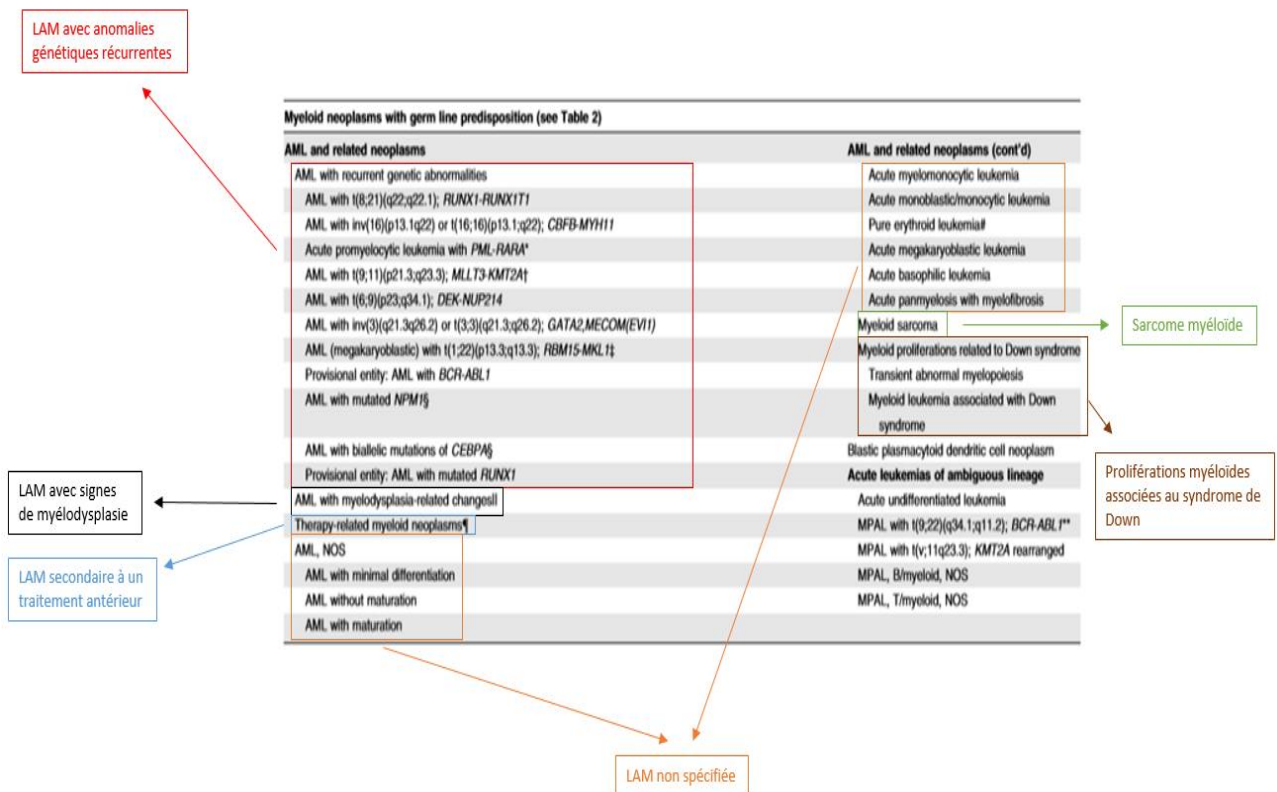


Figure 10 : Détail de la classification OMS des LAM en 2016.

6) Prise en charge thérapeutique.

Depuis plus de trente ans, le traitement des LAM est inchangé.

Le choix du traitement est décidé de façon collégiale en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

a. Patient « fit » : apte à recevoir une chimiothérapie intensive à visée curative.

Le premier temps du traitement consiste en une chimiothérapie d'induction, basée sur un schéma « 3+7 » (ou « 5+7 »), qui combine l'administration intraveineuse :

- d'un analogue des bases pyrimidiques : cytarabine en continu pendant 7 jours
- d'une anthracycline (Idarubicine pendant 3 jours, Daunorubicine pendant 5 jours) et d'une perfusion en continu d'Aracytine sur 7 jours, un analogue des bases pyrimidiques.

Une chimiothérapie intrathécale peut être adjointe s'il existe une suspicion d'atteinte du système nerveux central ou une hyperleucocytose majeure.

2 molécules ont l'AMM pour s'associer au schéma conventionnel d'induction :

- Des doses fractionnées de Gemtuzumab ozogamicin, un anticorps monoclonal anti-CD33 couplé à une anthracycline (calichéamycine). L'immunophénotypage de la LAM doit être CD33+.
- La Midostaurine per os, un inhibiteur pan-kinase qui cible les mutations de FLT3.

Le VYXEOS, conditionnement de daunorubicine-cytarabine sous forme liposomal, possède une indication dans l'induction des LAM secondaires ou associées à des signes de myélodysplasie.

Le but du traitement d'induction est l'obtention d'une rémission complète (RC) définie selon les critères suivants :

- <5% de blastes, absence de corps d'Auer, dans un frottis riche.
- Polynucléaires neutrophiles > 1 G/L ; Plaquettes > 100 G/L ; indépendance aux transfusions de globules rouges.
- Absence de localisation extra-médullaire.

Ensuite le traitement se poursuit par la phase de consolidation qui consiste en deux à quatre cures de cytarabine à doses fortes ou intermédiaires, administrées en bolus.

Un myélogramme est prélevé à chaque cure pour s'assurer de la sensibilité de la maladie au traitement et de la persistance de la rémission cytologique. Un suivi moléculaire peut être réalisé s'il existe une cible.

Différentes options existent selon les caractéristiques du patient et de la maladie :

- Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques
- Traitement d'entretien (Midostaurine)

b. Patient « unfit »

Plusieurs stratégies thérapeutiques disponibles :

- Perfusions sous-cutanées de Cytarabine à faibles doses.
- Perfusions sous-cutanées d'Azacytidine (agent hypométhylant) tous les mois
- Association d'Azacytidine ou Cytarabine faibles doses au Vénétoclax (inhibiteur de Bcl2).
- Soins de support et traitement cytoréducteur par Hydroxyurée.

7) Suivi des LAM et principe de la MRD (Measurable Residual Disease).

Malgré l'amélioration de la classification génétique des LAM et l'obtention d'un taux de rémission cytologique supérieur à 80% après la phase d'induction, plus de 50% des patients présenteront une rechute de la maladie après le traitement initial.(15)

L'hétérogénéité phénotypique et moléculaire des LAM, présente au diagnostic ou se développant au cours du traitement, est à l'origine de la variabilité de réponse aux thérapeutiques.

Le principe de la MRD se base sur la persistance de cellules leucémiques résiduelles, indétectables en cytologie, résistantes à la chimiothérapie et responsables des rechutes. La rémission cytologique est un facteur pronostique majeur mais peu sensible (au maximum 10^{-2}), ce qui en fait un indicateur grossier de la réponse thérapeutique. Le suivi de la maladie est désormais lié à la MRD et l'utilisation de techniques de meilleure sensibilité : la cytométrie en flux et la PCR. Ceci constitue un facteur pronostique puissant et indépendant pour l'évaluation thérapeutique. (16)

De nombreuses études ont montré que la négativité de la MRD est un critère robuste et indépendant qui reflète la profondeur de la rémission. (17)

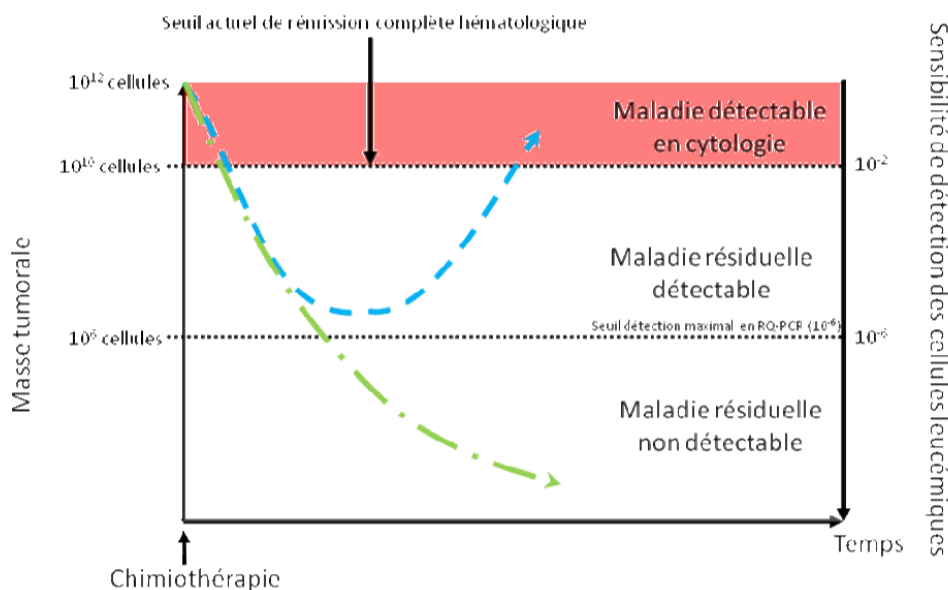


Figure 11 : Principe de la MRD.

Comparaison de deux profils de patient, en rémission cytologique à l'issue de la chimiothérapie. La courbe bleue montre une MRD détectable, à l'origine d'une rechute cytologique à distance. La courbe verte montre une MRD indétectable et d'une rémission plus profonde.

a. MRD en cytométrie en flux.

La détection de la maladie résiduelle par cytométrie en flux dans les LAM repose sur les caractéristiques phénotypiques des cellules leucémiques par rapport aux cellules normales. Il est possible de regarder l'ensemble des cellules CD45+ faibles et d'analyser leurs caractéristiques phénotypiques selon deux grandes approches.

L'approche «Leukemia Associated Immunophenotype» (LAIP), déterminée au diagnostic et appliquée lors des suivis. L'approche «Differences from normal» (DfN), utilisée lorsque le phénotype au diagnostic n'est pas disponible et qui repose sur l'identification de profils de différenciation ou de maturation aberrants lors du suivi.

L'European LeukemiaNet (ELN) suggère de combiner ces deux stratégies sous le terme de « LAIP-based DfN approach » (DfN-LAIP) (18). La stratégie DfN-LAIP repose sur la détection d'aberrations phénotypiques des cellules leucémiques telles que : une expression asynchrone d'antigène (CD34+, HLA-DR-), une expression de marqueurs dits aberrants (expression du CD19, CD7, CD56 sur des blastes myéloïdes CD34+/CD33+), une surexpression de marqueurs antigéniques (CD64+) ou encore une perte d'expression d'un marqueur (perte du HLA-DR sur les blastes myéloïdes CD34+/CD33+).

En parallèle, la MRD basée sur la recherche de cellules souches leucémiques (CSL) peut être utilisée et permettrait d'apporter une information pronostique supplémentaire quant à la réponse aux traitements et au risque de rechute (19) (20). Les CSL sont des cellules CD34+/CD38- qui peuvent présenter une ou plusieurs anomalies phénotypiques par rapport

aux cellules souches hématopoïétiques physiologiques (CSH), par exemple une expression de TIM3, CLL, CD97, CD45RA, CD123, CD7, CD56, CD19, CD13 et CD335.

La sensibilité de la MRD par CMF varie entre 10^{-3} et 10^{-5} , selon le nombre de cellules analysées, la méthode de fenêtrage, le nombre d'anticorps et le nombre des couleurs du cytomètre (8 à 10 couleurs). Le seuil de 0.1%, est recommandé pour définir les sous-groupes « MRD positifs » et « MRD négatifs » (18). Bien que cette technique présente de multiples avantages (sensibilité, rapidité, relativement peu onéreuse et applicabilité à 90% des LAM), certaines limites peuvent néanmoins être rencontrées. En effet, les cellules leucémiques ne présentent pas toujours de phénotype anormal, le contingent de CSL peut ne pas être retrouvé, le phénotype peut changer durant la maladie avec perte ou ajout d'anomalies et enfin, les techniques demeurent peu uniformisées entre les différents laboratoires. Dans le but d'harmoniser les pratiques, l'ELN a émis plusieurs recommandations (18). L'inclusion dans des protocoles thérapeutiques (protocole BIG NCT02416388) devrait également permettre une uniformisation des pratiques entre les centres français, avec des panels d'anticorps et des stratégies de fenêtrage identiques.

b. MRD par biologie moléculaire

Deux grandes approches sont actuellement utilisées : les techniques basées sur la PCR quantitative et les approches basées sur le séquençage.

- PCR quantitative

-RQ-PCR

La RQ-PCR ou Real-time quantitative Polymerase chain reaction, considérée comme le « gold standard », est la technique la plus sensible pour la détection de la MRD (10^{-4} à 10^{-6} en fonction de la qualité de l'ARN/ADN). La RT-qPCR, développée dans les années 90, et largement standardisée depuis (Europe Against Cancer program EAC6), repose sur l'utilisation d'amorces et de sondes fluorescentes qui détectent de façon sensible et spécifique les transcrits de fusion chimériques RUNX1-RUNX1T1, CBFβ-MYH11, PML-RARA et le transcrit mutant de NPM1. Cette approche n'est cependant applicable qu'à 40 à 60% des LAM et cette proportion tend à diminuer avec l'âge avancé des patients (21). Par ailleurs, des phénomènes d'accroche non spécifique (en particulier pour les formes mutantes de NPM1) peuvent parfois être observés, notamment lorsque les mutations géniques correspondent à un seul changement de nucléotide.

L'hyperexpression du gène WT1 n'est pas préconisée comme marqueur de MRD du fait de sa faible spécificité et sensibilité (10^{-3}). Néanmoins, sa détermination peut s'avérer utile lorsque les patients ne présentent ni marqueur phénotypique ni transcrit aberrant.

On parle de rémission moléculaire complète chez un patient en rémission cytologique qui présente 2 MRD moléculaire négative à 4 semaines d'intervalle.

La persistance moléculaire est une MRD qui se maintient un faible taux (<2%) sans augmenter significativement entre deux prélèvements (<1log) chez un patient en rémission cytologique.

La progression moléculaire est définie par l'augmentation d'une persistance moléculaire <1log entre deux prélèvements.

La rechute moléculaire est définie chez un patient en rémission cytologique et moléculaire par une augmentation de la MRD > 1log entre deux prélèvements.

-PCR digitale

La PCR digitale repose sur la quantification absolue des acides nucléiques. L'échantillon est partitionné en des milliers de compartiments distincts dans lesquels est réalisée l'amplification de l'ADN cible. La détection de la réaction de PCR se fait en point final sur la détection d'une fluorescence. La quantification est basée sur la loi de Poisson et permet d'estimer très finement la quantité initiale de cibles présentes dans l'échantillon du départ. Cette technique présente une meilleure sensibilité que la qPCR, ne nécessite pas de courbe de calibration, est moins sensible aux inhibiteurs et présente une excellente reproductibilité. Cependant, le coût d'un tel équipement et le manque de standardisation limitent à ce jour son utilisation en pratique courante pour la détection de la MRD.

- Séquençage haut débit

Le séquençage haut débit (NGS) permet la détection simultanée de mutations somatiques spécifiques de chaque patient. Cette approche pourrait donc théoriquement être applicable à tous les patients présentant des aberrations mutationnelles (90% des patients atteints de LAM). Le NGS est habituellement réservé aux diagnostics des LAM, principalement pour la stratification pronostique en fonction des anomalies géniques retrouvées (17) mais également pour identifier des cibles thérapeutiques (FLT3 ou mutations de IDH). Le NGS permet également le suivi du ou des clones malins, via des modèles d'architecture clonale.

Bien qu'il existe de façon compréhensible un engouement important autour de cette technologie, certaines limites doivent cependant être prises en compte. Avant toute chose, il convient de définir les cibles moléculaires pertinentes pour le suivi de la MRD. En effet, l'interprétation du NGS peut être compliquée par l'hématopoïèse clonale de signification indéterminée (CHIP, clonal hematopoiesis of indeterminate prognosis). Il s'agit de mutations somatiques liées à l'âge, affectant le plus souvent les gènes de l'épigénétique avec en tête de liste DNMT3A, TET2 et ASXL1 (gènes de type « DTA »). Ces mutations sont souvent retrouvées au niveau du clone fondateur et peuvent persister après l'obtention de la rémission complète, sans pour autant avoir un impact négatif sur la survie globale (22). Dans le cadre du NGS, il est donc parfois difficile de faire la part des choses entre la persistance du clone responsable de la maladie ou une hématopoïèse clonale de signification indéterminée. La seconde difficulté du NGS réside dans le bruit de fond introduit lors de la préparation des bibliothèques et du séquençage, rendant délicate l'interprétation des mutations de faibles fréquences alléliques (<1%). Ce bruit de fond complexifie d'autant plus l'analyse que la profondeur et la sensibilité du séquençage sont importantes. Pour pallier à cette difficulté, des stratégies de correction d'erreurs ont été développées, fondées soit sur l'analyse bio-informatique et l'application d'algorithmes correctifs, soit sur des méthodologies de séquençage particulières faisant appel à des barcodes moléculaires ou UMI (Unique molecular identification). (23)

c. MRD par méthodes biochimiques.

Les mutations somatiques des enzymes isocitrate deshydrogénases 1 et 2 (IDH1/2) sont rencontrées dans 10 à 30% des LAM *de novo* et conduisent à la production d'un onco-métabolite, le 2-hydroxyglutarate (2-HG), qui inhibe la fonction enzymatique de TET2, entraînant un blocage de différenciation. Le dosage sérique de 2-HG présente un double intérêt diagnostique et pronostique mais peut être également utilisé comme marqueur de MRD, notamment chez les patients traités par inhibiteurs d'IDH (24).

Méthode	Sensibilité	Avantages	Inconvénients
Cytométrie en flux (CEF)	10^{-3} à 10^{-5}	<ul style="list-style-type: none"> - Sensible - Rapide (> 1 jour) - Peu onéreux - Applicable à > 90% des LAM - Détecte les cellules souches leucémiques 	<ul style="list-style-type: none"> - Phénotype pas toujours stable - Expertise requise - Standardisation limitée
RT-qPCR	10^{-4} à 10^{-6}	<ul style="list-style-type: none"> - Très sensible - Très bien standardisé - Applicable dans de nombreux laboratoires 	<ul style="list-style-type: none"> - Applicable à ≈ 50% de LAM - Délai de rendu > CEF
Séquençage haut débit	1% à potentiellement 10^{-6} selon les technologies 10^{-4}	<ul style="list-style-type: none"> - Détection de mutations sur plusieurs gènes - Permet d'envisager un suivi multi-cibles - Découverte de nouvelles mutations 	<ul style="list-style-type: none"> - Interférence des CHIP - Onéreux - Long - Non standardisé - Bioinformatique complexe - Mutations persistantes en RC
PCR Digitale	10^{-4}	<ul style="list-style-type: none"> - Quantification absolue - Excellente reproductibilité - Grande précision - Applicable à différents types de cibles 	<ul style="list-style-type: none"> - Onéreux - Expertise requise - Non standardisé - Pas disponible dans tous les laboratoires

Figure 12 : Différentes techniques d'évaluation de la MRD.

PARTIE II : NPM1 : DU GENE A LA PROTEINE.

1) La famille NPM

Les protéines de la famille nucléophosmine/nucléoplasmine, également connues sous le nom de phosphoprotéine nucléolaire B23 ou numatrine chez les mammifères et NO38 chez les amphibiens, ont été découvertes dans les années 1970, lors de l'analyse de cellules de foie de rat par électrophorèse bidimensionnelle sur gel de polyacrylamide (25). Elles ont d'abord été nommées B23 parce qu'elles étaient les 23^{ème} protéines dans la région B de la plaque de gel lorsque les dépôts protéiques ont été numérotées par ordre de mobilité décroissante dans les deux dimensions électrophorétiques.

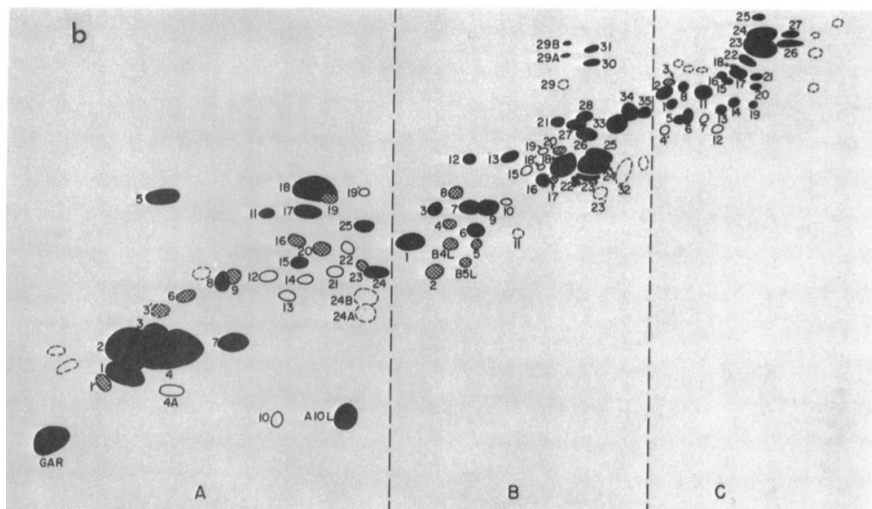


Figure 13 : Représentation schématique de l'électrophorèse bidimensionnelle des protéines nucléolaires du foie de rat. (Orrick et al, 1973) (25)

Cette famille de protéines se compose de trois membres fonctionnels majeurs qui partagent des motifs structuraux conservés (26). Leur rôle est la régulation du protéome de la cellule par l'intermédiaire de leur activité de chaperon moléculaire.

- Un domaine hydrophobe à l'extrémité N-terminale, appelé le « noyau », responsable de l'oligodimérisation et de l'activité chaperon.
- Un domaine acide requis pour l'activité ribonucléase.
- Un domaine basique, commun à NPM1 et NPM2 mais absent de NPM3, impliqué dans la liaison des acides nucléiques.
- Les membres de la famille NPM hébergent des signaux de localisation nucléaire (NLS), des signaux d'exportation nucléaire (NES) et des clusters acides.

Seul NPM1 présente un domaine aromatique à son extrémité C-terminale, qui comporte un signal de localisation nucléolaire (NoLS) nécessaire pour sa localisation subcellulaire.

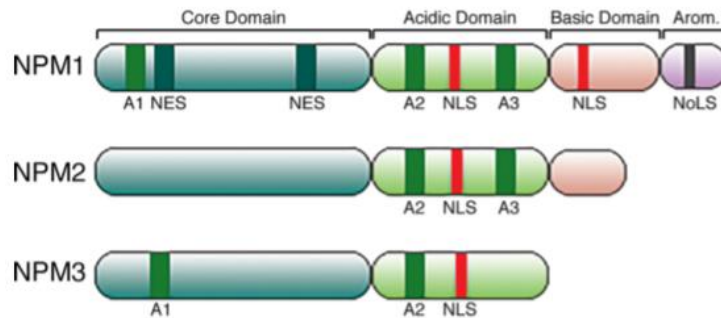


Figure 14 : Structure schématique des protéines NPM. (26)

2) Structure et expression du gène NPM1.

Le gène NPM1 couvre une région génomique d'environ 23 kb au niveau du chromosome 5q35 et possède 12 exons.

Il peut être transcrit en trois formes variantes (27) :

- NPM 1.1, transcrit majeur, est une protéine nucléolaire exprimée de façon ubiquitaire. Elle correspond à la transcription des 12 exons et se compose de 294 acides aminés.
- NPM 1.2 est une protéine plus courte, composée de 265 acides aminés, obtenue après un saut de l'exon 8 au cours de la transcription. Sa localisation est nucléoplasmique.
- NPM 1.3 est une protéine de 259 acides aminés avec une extrémité C-terminale différente de NPM 1.1.

Les fonctions et l'expression des isoformes NPM1.2 et 1.3 sont mal connues.

Dans le chapitre suivant, nous détaillerons la structure de la protéine NPM 1.1, qui est le transcrit majeur.

3) Domaines structuraux et fonctionnels de NPM1.

a. Extrémité N-terminale.

L'extrémité N-terminale (résidus 1 – 120), également nommée « le noyau », est la région la plus conservée dans la famille des protéines NPM. L'étude de sa structure par cristallographie aux rayons X révèle un assemblage sous forme de pentamères (28). Chaque monomère est composé de huit feuillets beta disposés de manière antiparallèle entre eux et fermement liés par des liaisons hydrophobes et hydrogènes. La répartition des charges électrostatiques exprimées à la surface de la région est asymétrique : un côté est chargé négativement (« top »), tandis que l'autre expose une charge neutre (« bottom »). Cette tendance à l'oligomérisation de l'extrémité N-terminale stabilise la protéine et lui permet d'effectuer ses fonctions. Cette région possède également plusieurs sites de phosphorylation hautement conservés qui permettent une plasticité de sa conformation. Leur phosphorylation stabilise la structure sous forme de monomère, permettant ainsi d'exposer des sites à la liaison des protéines cibles. A l'inverse, leur déphosphorylation, notamment par les protéines cibles, va favoriser le passage à l'état pentamérique. Par ailleurs, cette région comporte 2 motifs NES (signal d'export nucléaire) qui permettent à la protéine de jouer son rôle de navette nucléocytoplasmique : un premier motif au niveau des résidus 42-47 du feuillet bêta 3 qui intervient dans la biogenèse du ribosome, et un second motif au niveau des résidus 94-102 du feuillet bêta 7 qui intervient dans la duplication du centrosome.

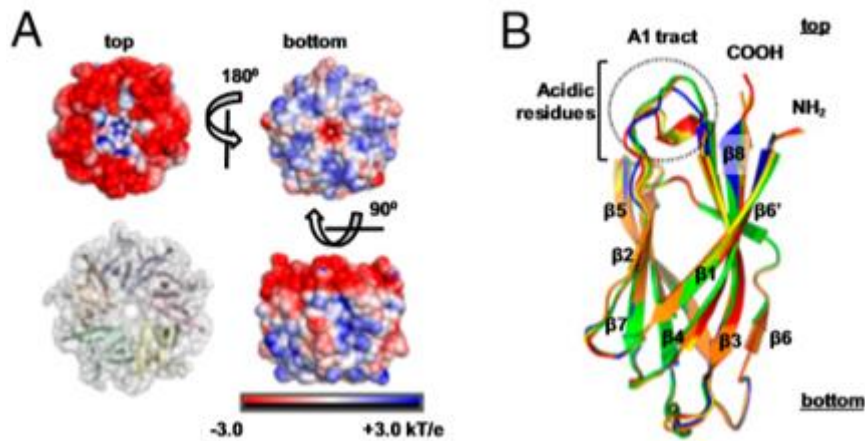


Figure 15 : Organisation de l'extrémité N-terminale de la protéine NPM1. Transformation d'un pentamère plié en un monomère désordonné. (A) Structure cristalline du domaine N-terminal de NPM1 sous forme pentamérique, résolue à 1,8 Å. (B) Superposition de sous-unités isolées du pentamère. (29)

b. Région centrale.

Cette région (résidus 121 -243) est composée de résidus acides enrichis en aspartate et glutamate (A2 et A3) qui permettent des interactions avec des protéines basiques telles que les histones et une action sur la chromatine. Des résidus basiques enrichis en lysine et arginine s'y trouvent également. Cette région contient un motif NLS (signal de localisation nucléaire). (30)

c. Extrémité C-terminale.

L'extrémité C-terminale est spécifique à NPM1 : elle contient un NoLS (signal de localisation nucléolaire) indispensable à la fonction de navette nucléo-cytoplasmique. De plus, la présence de résidus aromatiques (tryptophane 288 et 290) et de lysine (248, 263, 267) forme un noyau hydrophobe qui renforce sa localisation nucléolaire. L'étude de la structure de cette extrémité, en spectroscopie par résonance magnétique, met en évidence trois hélices liées par ce noyau. (30)

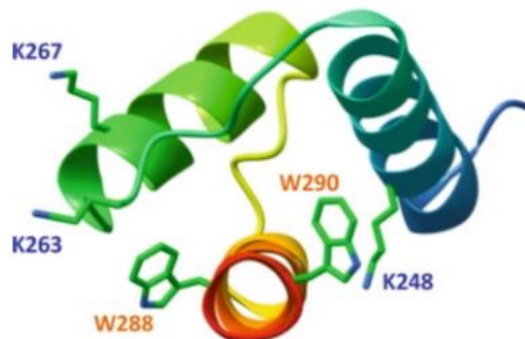


Figure 16 : Structure de l'extrémité C-terminale de NPM1. (31)

4) Fonctions de la protéine NPM1.

NPM1 est une phosphoprotéine nucléolaire multifonctionnelle impliquée dans de nombreux processus biologiques qui à la fois stimule la prolifération cellulaire mais également favorise des évènements suppresseurs de croissance. Bien que l'ensemble de ses fonctions biologiques et les mécanismes moléculaires sous-jacents ne soient pas encore totalement élucidés, plusieurs études se sont intéressées à son rôle au sein de la cellule. Ses principales fonctions sont résumées dans le tableau ci-dessous.

Fonctions physiologiques de la protéine NPM1
Chaperon moléculaire
Biogenèse du ribosome
Régulation de la transcription
Inhibition de l'apoptose
Modulation des suppresseurs de tumeur
Maintien de la stabilité génomique
Régulation du cycle cellulaire

Figure 17 : Fonctions physiologiques de la protéine NPM1.

Le nucléole, où la protéine se localise, est un organite sans membrane bien caractérisé à l'intérieur du nucléoplasme. C'est une structure dynamique au cours du cycle cellulaire dont la taille est le reflet de la synthèse des ribosomes. (32)

Pendant l'interphase, le nucléole se prépare à la division cellulaire et s'organise en trois régions : le centre fibrillaire (FC), le compartiment fibrillaire dense (DFC) et le centre granulaire (GC). Ainsi les machineries cellulaires sont compartimentalisées : la transcription des gènes ribosomiques est réalisée dans le centre fibrillaire, alors que le traitement de l'ARN ribosomique débute dans le compartiment fibrillaire dense et se termine dans le centre granulaire. La mitose correspond à une période d'inactivation et de délocalisation des machineries nucléaires. Le nucléole se désorganise lorsque la cellule se divise et la transcription est alors inhibée. À la fin de la mitose, les nucléoles sont assemblés précocement autour de "régions organisatrices nucléolaires" (NOR) composés de gènes ribosomiques (ADNr), dans les cellules filles. (33)

La structure dynamique du nucléole est également un élément central dans la coordination de la réponse au stress cellulaire. Pour induire l'arrêt du cycle cellulaire ou l'apoptose, la cellule réorganise son architecture nucléaire et ses fonctions. (34)

a. Chaperon moléculaire.

NPM1 a la capacité de fonctionner comme un chaperon moléculaire pour les protéines et les acides nucléiques. (35) Le nucléole est un organite extrêmement dense où une concentration élevée de protéines doit pouvoir circuler sans s'agréger entre elles. Il existe ainsi un besoin important de protéines chaperons. (36)

Il existe peu de similarité structurelle entre NPM1 et d'autres chaperons moléculaires, tels que les protéines de choc thermique (Hsp). Cependant, il existe des points communs : une tendance à l'oligodimérisation, l'organisation de leur structure secondaire en feuillets bêta et hélices alpha, l'association de régions chargées (extrémité N-terminale) et non polaires (résidus acides de la région centrale).

Au cours du cycle cellulaire, NPM1 fonctionne comme un chaperon d'histones pour contrôler la formation de la chromatine. (37)

b. Biogenèse des ribosomes.

Le ribosome est un complexe ribonucléoprotéique cytoplasmique essentiel pour la traduction des informations contenues par les ARN messagers en protéines fonctionnelles. Sa biosynthèse, déterminant principal de la capacité de synthèse protéique cellulaire et donc de l'expression génique, a lieu dans le nucléole et met en jeu de nombreux acteurs moléculaires.

Le détail de la biogenèse du ribosome, à la fois assurée par des protéines ribosomales et non ribosomales, est décrite dans la figure 16.

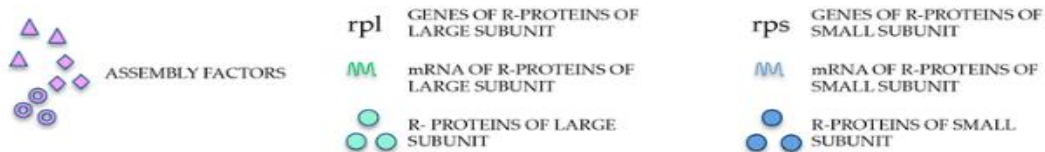
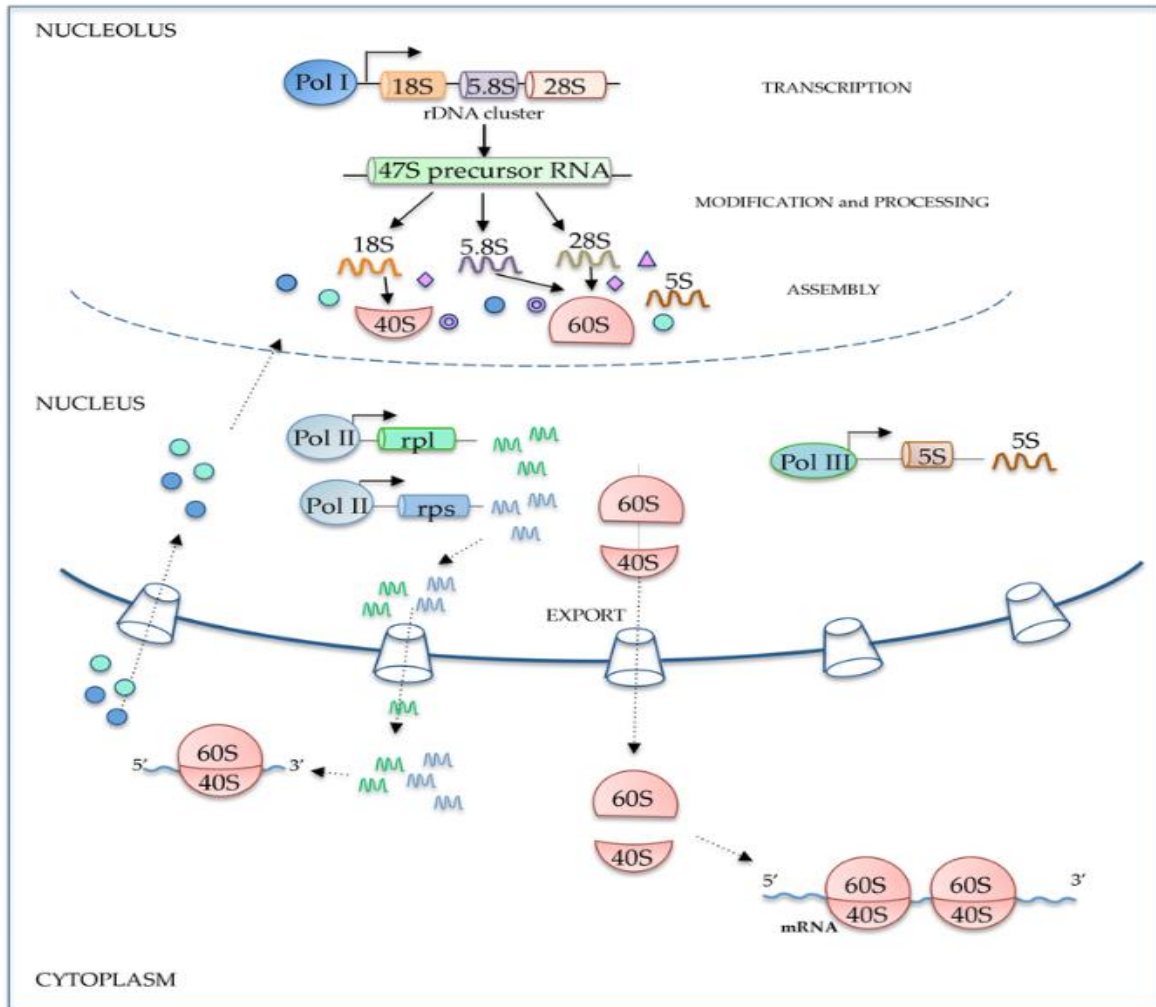


Figure 18 : Biosynthèse du ribosome. L'ADN ribosomal est contenu par des gènes situés dans les NOR (régions organisatrices nucléolaires) du nucléole. L'ARN polymérase I les transcrit pour former un pré-ARN 47S. Ce transcrit primaire est caractérisé par des ETS (external transcribed spacers) et ITS (internal transcribed spacers), contenant des sites de clivage ciblés par des nucléases. Les clivages successifs et les modifications nucléotidiques opérés dans le nucléole génèrent les ARNr 18S, 5.8S et 28S. La transcription de l'ARN 5S est médiée par l'ARN polymérase III dans le noyau. L'ARN polymérase II synthétise les protéines ribosomales dans le cytoplasme qui sont ensuite importées dans le noyau. L'association des ARNr et de protéines ribosomales dans le noyau forment les sous-unités : la grande sous-unité 40S avec l'ARNr 40S et 33 protéines ribosomales, la grande sous unité 60S avec les ARNr 5S, 5.8S, 28.S et 47.

NPM1 est une des nombreuses protéines non ribosomales impliquées dans cette biosynthèse : grâce à sa structure, elle possède les fonctions nécessaires à la maturation et l'assemblage des ribosomes. Son extrémité C-terminale, riche en acides aminés aromatiques intercalés parmi les résidus basiques à l'origine d'une charge positive, conférant ainsi une affinité pour les acides nucléiques, chargés négativement. Son activité ribonuléasique intrinsèque permet de cliver les ARN pré-ribosomiques et définir les sous-unités ribosomiques. (38) L'activité de chaperon moléculaire de NPM1 évite non seulement l'agrégation des protéines au cours de leur maturation, mais va permettre d'effectuer l'assemblage des sous-unités ribosomales. Notamment, NPM1 sert de médiateur à l'exportation nucléaire de la protéine rpL5 (protéine ribosomale qui transporte le pré-ARN5S, constituant de la sous-unité ribosomale 60S) par un mécanisme dépendant de CRM1 (39). Au-delà de la proximité entre la protéine NPM1 et la machinerie cellulaire du ribosome, NPM1 peut accéder directement à la synthèse protéique.

c. Régulation du cycle cellulaire.

Le cycle cellulaire a pour but la transmission identique et complète de l'information génétique contenue par une cellule mère à deux cellules filles sans apport de matériel génétique extérieur. Le déroulement correct du cycle cellulaire est assuré par une famille de kinases sérine-thréonine dites kinases dépendantes des cyclines (CDK), dont l'activation est déterminée par leurs modifications post-traductionnelles (phosphorylation/déphosphorylation) et par l'association à une cycline, qui constitue la sous-unité régulatrice du complexe enzymatique.

Il se compose de deux phases majeures, qui se divisent elles-mêmes en différentes étapes :

- l'interphase (phases G₁, S et G₂)
- la mitose (phase M)

Le centrosome est un centre organisateur de microtubules, composé d'une paire de centrioles et d'une région péri-centriolaire. Son rôle est primordial : il assure la formation du fuseau mitotique, essentiel pour la ségrégation correcte des chromosomes dans les cellules filles.

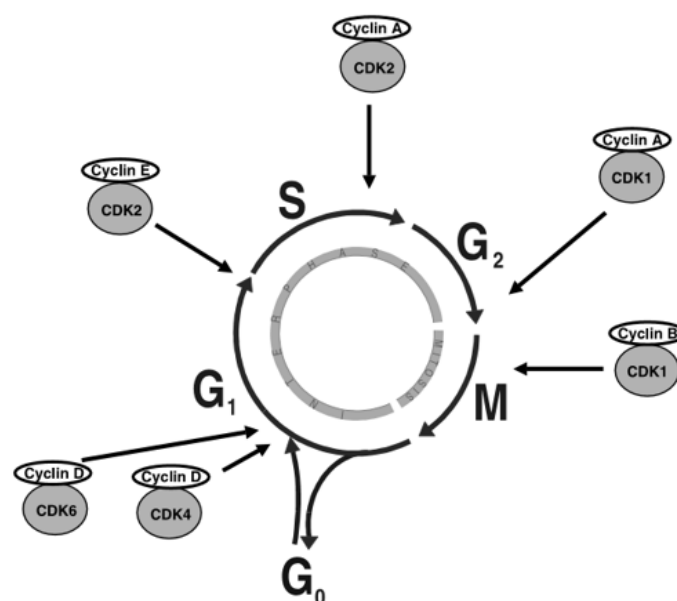


Figure 19 : Les étapes du cycle cellulaire. (40)

L'interphase représente les différentes étapes nécessaires à la préparation à la division. La cellule augmente sa taille et duplique son ADN. Le centrosome doit aussi se dupliquer, en coordination avec la synthèse de l'ADN. Le centriole, noyau du centrosome, initie la duplication entre les phases G1 et S de l'interphase sous l'activation du complexe CDK2-cycline E (qui a également un rôle majeur dans la synthèse de l'ADN par phosphorylation de pRb). NPM1 a été identifiée comme un substrat de ce complexe (41). Sa phosphorylation au niveau du résidu Thréonine 199 lui fait perdre son affinité pour le centrosome : cette dissociation est essentielle pour initier la duplication. (42) Le complexe CDK2-cycline A phosphoryle à son tour NPM1 au niveau de son résidu Thréonine 199 afin d'éviter sa réassociation au centrosome lors des étapes ultérieures de l'interphase, les phases S et G2.

Lorsque la mitose débute, l'enveloppe nucléaire se disloque. Le contenu du noyau, y compris le nucléole, se trouve dispersé dans le cytoplasme. La chromatine se condense en chromosome. Une zone spécialisée, organisée en fibrilles serrées et granules denses se constitue en contact direct avec la chromatine : la « mitotic chromosome periphery » (43). De nombreuses protéines nucléaires et nucléolaires y participent, y compris NPM1. Son rôle est multiple : protection de la chromatine contre l'exposition au cytoplasme, organisation de la migration des protéines ou de la formation du nouveau nucléole des cellules filles. Surtout, NPM1 est phosphorylé au niveau de son résidu Sérine 4 par la kinase Plk1 (Polo-like-kinase 1) qui permet à nouveau son association au centrosome et évite les défauts mitotiques (nombre aberrant de centrosomes, cytokinèse incomplète). (44)

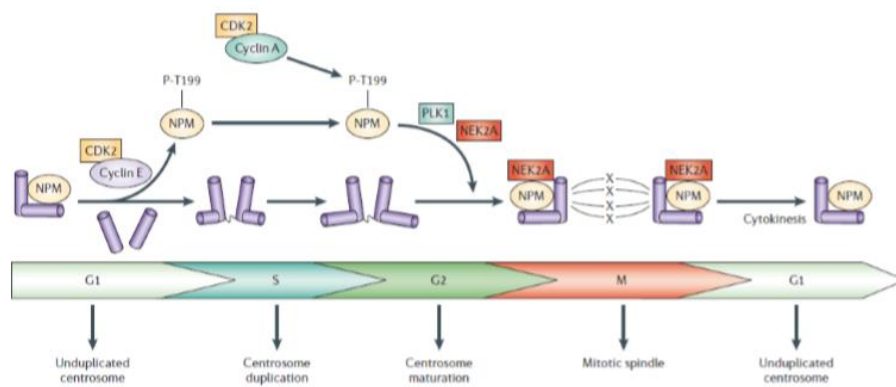


Figure 20 : Implication de NPM1 dans la duplication du centrosome. (45)

d. Réparation des dommages à l'ADN.

NPM1 est nécessaire à l'intégrité de l'ADN. Il a été montré que l'absence d'expression de NPM1 chez la souris entraîne une accumulation de dommages à l'ADN, une activation de p53, une apoptose généralisée. (46)

Les cassures double brin de l'ADN, telles que celles induites par les rayonnements ionisants ou certains agents anticancéreux, font partie des lésions de l'ADN les plus destructrices. De nombreuses protéines permettent de détecter, signaler et réparer ces lésions. Le recrutement de NPM1 dans cette cascade est possible par sa translocation dans le noyau et la phosphorylation de son résidu Thr199 qui lui permet d'agir avec d'autres protéines de réparation telles que γ H2AX et BRCA1. (47)

NPM1 est aussi impliquée dans la voie de réparation BER. En situation normale, NPM1 maintient certains facteurs de cette voie dans le nucléole. Lors d'une réponse au stress, NPM1

est transloqué hors du nucléole et les protéines BER peuvent agir sur la régulation du cycle cellulaire, et particulièrement interférer avec la biosynthèse du ribosome. (48) Particulièrement, l'endonucléase nucléaire apurinique/aprimidinique 1 (APE1), une enzyme centrale du système BER, interagit spécifiquement avec NPM1 dans le nucléole et le nucléoplasme. (49)

En réponse aux dommages de l'ADN induits par les UV, NPM1, déphosphorylé sur ses résidus thréonine Thr199, Thr234 et Thr 23, interagit avec la protéine suppresseur de tumeur du rétinoblastome (pRB) et enclenche l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes de réparation de l'ADN. (50)

NPM1 régule le système TLS (translesion synthesis) en stabilisant l'ADN polymérase η . (51)

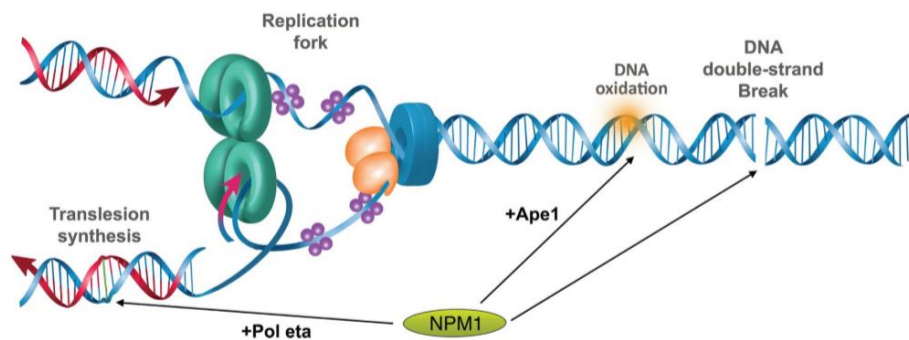


Figure 21 : Fonctions de NPM1 dans diverses voies de réponse aux dommages de l'ADN. (26)

e. Régulation des protéines suppresseurs de tumeur p14Arf et p53

NPM1 est impliqué dans la régulation de l'activité de protéines suppresseurs de tumeurs.

P14Arf est un gène suppresseur de tumeur qui code pour une protéine nucléolaire p14Arf. En cas de signaux oncogéniques comme la surexpression de c-myc ou la mutation de Ras, 14pArf séquestre HDM2, qui possède une activité ligase E3 ubiquitine capable d'inhiber p53, dans le nucléole. Ceci est permis par l'accumulation nucléolaire de p14Arf, qui se couple à des complexes de haut poids moléculaire contenant NPM1 pour assurer sa stabilisation. (46) Une interaction directe entre NPM1 et p14Arf a récemment été mise en évidence, mettant en contact leur extrémité N-terminale et C-terminale respectives. (52) Ainsi, p14Arf intervient dans la réponse au stress cellulaire par une voie dépendante de p53.

P14Arf peut également agir par des voies indépendantes de p53 en cas de signaux de stress, notamment sur la synthèse ribosomale. Il inhibe la production d'ARN ribosomal, en retardant le traitement des précurseurs 47/45S et 32S. (53) P14Arf contrôle la localisation nucléaire du facteur de terminaison de la transcription de l'ARN polymérase I, TTF-I. TTF-I se déplace entre le nucléoplasme et le nucléole grâce à sa liaison à une séquence de localisation nucléolaire de NPM1. P14Arf inhibe l'importation nucléolaire de TTF-I en se liant à cette séquence. (54)

Le gène TP53, localisé sur le chromosome 17, code pour la protéine suppresseur de tumeur p53. Elle est activée par des facteurs de stress variés, tels que des dommages à l'ADN, l'hypoxie cellulaire ou l'activation de proto-oncogènes qui entraînent une perturbation nucléolaire. (55) Elle agit comme un facteur de transcription qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose si les dommages sont trop importants. Ainsi la régulation de p53 doit être fermement contrôlée. Hors situation de stress, HDM2 (Human MDM2) régule le taux de p53 en agissant comme une E3 ubiquitine ligase et permet sa dégradation protéosomale. (56)

Après des stimuli de stress, NPM1 se relocalise dans le noyau pour lier HDM2 et permettre l'action de p53.

NPM1 interagit non seulement avec ses molécules régulatrices (p14ARF, HDM2), lui permettant son action en cas de signaux cellulaires de stress, mais également directement avec p53 pour réguler sa stabilité et sa transcription. (57)

NPM1 est un acteur majeur de la réparation de l'ADN par son implication dans la voie de réponse cellulaire au stress dépendante de p53.

5) Modifications post-traductionnelles.

Plusieurs fonctions physiologiques de la protéine NPM1 sont modulées par des modifications post-traductionnelles. Celles-ci permettent l'ajout covalent de groupements fonctionnels ou le clivage protéolytique de sous-unités régulatrices qui vont réguler la localisation et l'implication de NPM1 dans les voies de signalisation cellulaire.

a. Phosphorylation.

En tant que phosphoprotéine, NPM1 possède plusieurs sites de phosphorylation. Différentes kinases cycline-dépendantes (CDK) phosphorylent NPM1 au cours du cycle cellulaire.

Lors de la mitose, la kinase cycline B/Cdc2 phosphoryle NPM1 au niveau de ses résidus Thréonine T199, T219, T234, T237 qui entraîne l'inhibition du clivage de l'ARNr et de la biogenèse du ribosome. (57)

Au cours de l'interphase, NPM1, substrat de la caséine kinase 2 (CK2), est phosphorylée au niveau de son résidu Sérine S125, augmentant sa mobilité nucléo-cytoplasmique. (58)

La kinase cycline E/ Cdc2, en fin de phase G1 du cycle cellulaire, phosphoryle son résidu Thréonine T199, alors que Plk1 phosphoryle son résidu Sérine S4, événements à l'origine de la duplication du centrosome.

Il a été montré que la phosphorylation de la Thréonine T95 ou de la Sérine S125 favorise la protéine sous la forme monomérique, facilitant l'action des kinases sur des résidus inaccessibles au sein du pentamère. (29)

b. N-acétylation

La N-acétylation est une modification qui peut s'opérer à la fois pendant et après la traduction protéique. Elle consiste en l'ajout d'un groupe acétyle à partir d'un cofacteur (l'Acetyl-Coenzyme A) sur le groupe amine d'une lysine ou sur le groupe amino-terminal d'une protéine. Cette modification, réversible, est régie par les actions opposées des acetyltransferases (HAT) et des desacetyltransferases (DHAC). Elle a été observée sur les résidus lysine des histones afin de réguler l'expression des gènes : le transfert d'un groupe acétyle neutralise la charge positive des résidus lysine entraîne une diminution de l'interaction entre l'histone et l'ADN. Ainsi, l'ADN devient accessible à l'ARN polymérase.

L'acétylation de NPM1 permet sa fonction de chaperon d'histone, l'interaction seule avec les histones centraux H3, H2B et H4 n'étant pas suffisante, et induit la transcription de la chromatine. (59)

La désacétylation de NPM1 par la sirtuine 1 (une lysine désacétylase), au contraire, réduit significativement son potentiel d'activation transcriptionnelle. (60)

c. Ubiquitination

L'ubiquitination ajoute une ubiquitine à la suite d'une cascade enzymatique sur un ou plusieurs résidus lysine de la protéine cible. Outre la dégradation protéasomique, l'ubiquitination joue un rôle important dans la régulation de la transcription, le transport des protéines et l'activation de kinases impliquées dans les processus de signalisation. Des protéases nommées DUB (deubiquitinating enzymes) rendent cette réaction réversible en hydrolysant la liaison peptidique et permettent le recyclage de l'ubiquitine.

Lorsque NPM1 est surexprimé, l'interaction nucléolaire entre NPM1 et p14Arf favorise sa polyubiquitination et induit sa dégradation. (61)

NPM1 est un substrat de l'activité ubiquitine ligase E3 du complexe hétérodimérique BRCA1-BARD1, dans un processus qui stabilise NPM1 aux pôles du fuseau mitotique au cours de la mitose. (62)

L'USP36 est une enzyme de dés-ubiquitination nucléolaire ayant un rôle dans la biogenèse des ribosomes. Sa région C-terminale basique, qui interagit avec la région acide centrale de NPM1, lui sert de signal de localisation nucléolaire. En contrepartie, la présence de l'enzyme dans le nucléole ne gêne pas la biosynthèse du ribosome. (63)

d. SUMOylation

La SUMOylation ajoute de façon covalente une protéine SUMO (small-ubiquitin-like modifier) sur un résidu lysine d'une protéine cible. Bien que la structure moléculaire des protéines SUMO soit très proche de l'ubiquitine, qu'elles fonctionnent par l'intermédiaire d'une cascade enzymatique, leur séquence d'acides aminés ainsi que leur charge de surface diffèrent, et leurs fonctions sont bien distinctes. La SUMOylation est impliquée dans la réponse aux dommages à l'ADN, les réponses immunitaires, la progression du cycle cellulaire et l'apoptose. Ce processus est réversible grâce à des protéases de la famille SENP. Ces enzymes, localisées dans le nucléoplasme, peuvent effectuer les processus de SUMOylation/dés-SUMOylation dans le nucléole.

La liaison de Arf à NPM1 induit sa SUMOylation sur les résidus Lysine 230 et 263, nécessaire pour sa localisation centrosomale et nucléolaire. De plus, la SUMOylation renforce la liaison de NPM1 à Rb et stimule la transcription des gènes de réparation médiée par E2F1. (64)

TRIM28/KAP1, un facteur de transcription avec une activité ligase E3, coopère avec ARF pour SUMOyler NPM1 et prévenir l'amplification du centrosome. (65)

SENP3, protéase nucléolaire SUMO spécifique, est associée à NPM1. SENP3 catalyse la dés-SUMOylation du complexe NPM1-SUMO2 et antagonise la modification de NPM1 par SUMO2 induite par ARF. La déconjugaison de SUMO2 de NPM1 par SENP3, facteur essentiel dans la biogenèse du ribosome, est impliquée dans la maturation de l'ARNr 28S (inhibition de la conversion de l'ARN 32S). (66)

PARTIE III : LAM NPM1.

La révision de la classification OMS des hémopathies malignes en 2016 a fait de la LAM NPM1 une entité à part entière, classée parmi les LAM associée aux anomalies génétiques récurrentes. (12) Tout d'abord, les mutations du gène NPM1 sont une altération génétique fréquente de la LAM chez l'adulte : elles sont mises en évidence chez environ 1/3 des patients au bilan initial et dans 60% des cas de LAM à caryotype normal. (67) De plus, cette altération génétique a des implications cliniques, biologiques et pronostiques importantes.

1) Les mutations de NPM1.

Plus de 50 mutations du gène NPM1 ont été décrites dans la LAM. Elles sont nommées alphabétiquement selon leur ordre de découverte. Malgré leur hétérogénéité génomique, les mutations de NPM1 impliquent toutes la même conséquence : un décalage du cadre de lecture qui altère l'extrémité C-terminale de la protéine et le motif NoLS qu'elle contient.

Type of Mutation	GenBank Accession No.	Sequence	Predicted Protein	No./No. of Cases (%)
None (wild type)	NM_002520	GATCTCTG...GCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLKQRRKSL	40/52 (77)
Mutation A	AY740634	GATCTCTCTCTGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLCLAVEE TR LE TR	7/52 (13)
Mutation B	AY740635	GATCTCTGCATGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLCMAVEE TR LE TR	1/52 (2)
Mutation C	AY740636	GATCTCTGCGTGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLCVAVER TR LE TR	1/52 (2)
Mutation D	AY740637	GATCTCTGCGTGGCAGT...GGAGGAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLCLAVEE TR LE TR	1/52 (2)
Mutation E	AY740638	GATCTCTG...GCAGTCTCTTGGCCAAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLKQSLAQ TR LE TR	1/52 (2)
Mutation F	AY740639	GATCTCTG...GCAGTCCCTGGAGAAAGTCTCTTTAAGAAATAG	-DLKQLEK TR LE TR	1/52 (2)

Figure 22 : La séquence NPM1 de type sauvage (nucléotides 952 à 989) et six mutations associées aux LAM (types A à F). Les insertions de nucléotides sont en rouge et la protéine traduite est représentée avec des zones encadrées indiquant les positions des deux résidus tryptophane de l'extrémité C-terminale. Le résidu tryptophane de type sauvage est représenté en jaune, et les résidus mutés en gris. La nouvelle séquence d'acides aminés en C-terminal commune à toutes les protéines mutées est représentée en vert. (67)

La mutation NPM1 de type A, mise en évidence en 2005 par l'équipe de Falini, en est la plus fréquente (80% des cas). Elle consiste en une duplication en tandem d'un tétranucléotide TCTG entre les positions 860 et 863 de la séquence de base.

2) Physiopathologie des LAM NPM1.

Bien qu'elle réalise une navette nucléo-cytoplasmique, la protéine NPM1 sauvage réside dans le nucléole par l'intermédiaire de son extrémité C-terminale et son motif NoLS contenant les résidus tryptophane critiques T288 et T290. (68)

La majorité des mutations connues de NPM1 touche l'exon 12 et entraîne un décalage du cadre de lecture à l'extrémité C-terminale qui supprime ces résidus. (69)

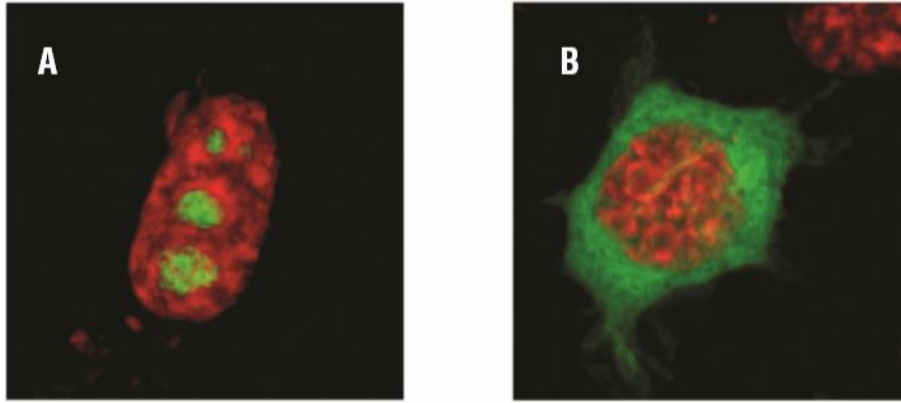


Figure 23 : Mécanisme d'altération du trafic nucléocytoplasmique de NPM1. L'analyse par immunofluorescence montre la localisation nucléolaire de NPM1 sauvage dans des fibroblastes de souris, alors que les mutants NPM1 s'accumulent dans le cytoplasme (B). (70)

De plus, ces mutations créent un motif NES riche en résidus leucine qui lie NPM1 à l'exportine 1 (Xpo1), récepteur de la voie d'exportation nucléaire dépendante de CRM-1, conduisant à l'export de la protéine vers le cytoplasme. (71)(72)

Les mutations de NPM1 sont toujours hétérozygotes. L'étude immunohistochimique des blastes a montré que les protéines NPM1 mutées se dimérisent avec les protéines NPM1 sauvages par leur extrémité N-terminale conservée (responsable de l'oligomérisation). Ce complexe NPM1 mutée/NPM1 sauvage est transloqué dans le cytoplasme. (73) La distribution subcellulaire de NPM1 dépendrait du rapport entre les protéines mutées et les protéines sauvages : plus les protéines mutées sont nombreuses, plus les protéines sauvages, par dimérisation, sont délocalisées dans le cytoplasme. (74)

L'absence de perte d'hétérozygotie indique l'haploinsuffisance de NPM1. La leucémogénèse n'est pas enclenchée par l'inactivation bi-allélique, la perte complète du gène NPM1 n'est pas requise. (75)

Ainsi, la leucémogénèse pourrait être la conséquence de deux phénomènes :

Perte de fonction secondaire à la délocalisation nucléolaire.

Gain de fonction secondaire à la localisation cytoplasmique aberrante.

P14Arf est protégé de la dégradation protéasomale dans le nucléole par son association avec NPM1 sauvage. (76) Cependant, la protéine NPM1 mutée délocalise NPM1 sauvage, qui lie p14Arf, dans le cytoplasme. Ainsi la stabilité de p14Arf et ses fonctions suppressives de tumeurs sont compromises. (77)

Il a été montré que le proto-oncogène c-myc est surexprimé dans les hémopathies malignes (78), et favorise la leucémogénèse myéloïde chez la souris (79). La protéine NPM1 sauvage régule la localisation nucléolaire et la stabilité de la protéine Fbw7 gamma, essentielle pour la dégradation de c-myc. La protéine NPM1 mutée entre en compétition avec NPM1 sauvage pour lier Fbw7 et favorise sa dégradation en la délocalisant dans le cytoplasme. Il en résulte une surexpression du proto-oncogène c-myc. (80)

NPM1 intervient dans les processus de réparation des dommages à l'ADN, notamment par l'intermédiaire de la voie BER et APE1. La mutation de NPM1 accumule APE1 dans le

cytoplasme, exposée à la dégradation des granzymes A et K, et altère le processus de réparation de l'ADN BER. (49)

La protéine NPM1 mutée inhibe spécifiquement et directement des protéases de mort cellulaire, également impliquées dans la différenciation myéloïde : les caspases 6 et 8. La localisation cytoplasmique de NPM1 induit deux conséquences vis-à-vis de ces caspases : une inhibition de l'apoptose et un blocage dans la différenciation myéloïde. (81)

Il existe une surexpression des gènes Homeobox HOXA et HOXB dans les LAM NPM1. (82) L'expression de ces gènes est normalement diminuée pour ne pas interférer avec la différenciation myéloïde. (83) L'étude de l'expression génétique de la LAM NPM1 montre une hausse de plusieurs facteurs de transcription contenant des homéodomains, et notamment les gènes HOX connus pour leur rôle dans le maintien des cellules souches. La LAM NPM1 pourrait dériver d'une cellule hématopoïétique multipotente. (84)

A l'heure actuelle, aucun modèle sur souris transgéniques mutées NPM1 générés pour modéliser cette LAM n'ont été suffisant pour induire une leucémie aigüe (85). Ceci suggère la nécessité d'une ou plusieurs mutations coopératives, FLT3-ITD par exemple. (86)

3) Paysage moléculaire des LAM NPM1.

Une majorité de patients atteints de LAM NPM1 présentent diverses autres mutations :

- des gènes impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN (DNMT3A, TET2, IDH1, IDH2),
- des gènes de l'épissage de l'ARN (SRSF2, SF3B1)
- des gènes du complexe cohésine (RAD21, SMC1A, SMC3, STAG2).
- des voies de signalisation cellulaire (FLT3, NRAS et PTPN11)

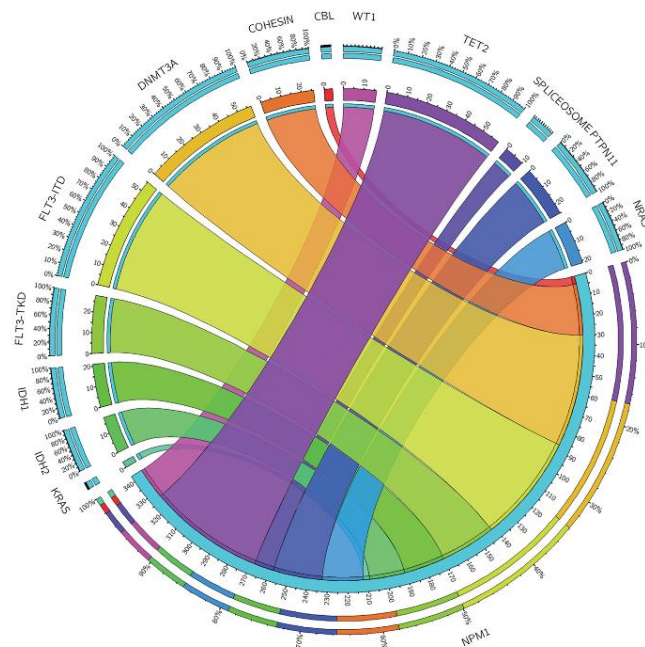


Figure 24 : Paysage moléculaire des LAM NPM1. (87)

La coexistence de ces mutations, qui ont montré des charges alléliques plus élevées, suggère que la mutation de NPM1 est un événement secondaire dans la pathogenèse de la LAM, précédée par des mutations fondatrices associées à une hématopoïèse clonale préclinique. (87)

La mise en évidence de l'une de ces mutations est particulièrement importante : FLT3-ITD. Son association, fréquente (40% des cas), a montré son impact sur le pronostic des LAM NPM1 en termes de survie et de taux de rechute. (88)

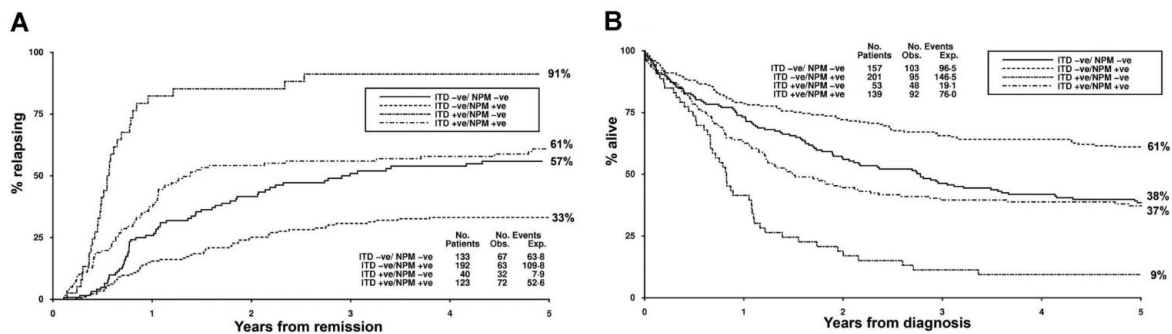


Figure 25 : Impact de la coexistence des mutations FLT3-ITD et NPM1 dans les LAM à caryotype normal. Courbes de Kaplan-Meier montrant le risque de rechute (A) et la survie globale (B). (88)

4) Caractéristiques pronostiques et prise en charge.

Le groupe de travail European LeukemiaNet a émis en 2017 des recommandations pour la prise en charge des LAM. Une classification en 3 groupes pronostiques selon des critères cytogénétiques et moléculaires au diagnostic est proposée.

Risk category*	Genetic abnormality
Favorable	t(8;21)(q22;q22.1); <i>RUNX1-RUNX1T1</i> inv(16)(p13.1;q22) or t(16;16)(p13.1;q22); <i>CBFB-MYH11</i> Mutated <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} Biallelic mutated <i>CEBPA</i>
Intermediate	Mutated <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high†} Wild-type <i>NPM1</i> without <i>FLT3-ITD</i> or with <i>FLT3-ITD</i> ^{low†} (without adverse-risk genetic lesions) t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLL3-KMT2A</i> ‡ Cytogenetic abnormalities not classified as favorable or adverse
Adverse	t(6;9)(p23;q34.1); <i>DEK-NUP214</i> t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> rearranged t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR-ABL1</i> inv(3)(q21.3;q26.2) or t(3;3)(q21.3;q26.2); <i>GATA2,MECOM(EV11)</i> -5 or del(5q); -7; -17/abn(17p) Complex karyotype,§ monosomal karyotypell Wild-type <i>NPM1</i> and <i>FLT3-ITD</i> ^{high†} Mutated <i>RUNX1</i> ¶ Mutated <i>ASXL1</i> ¶ Mutated <i>TP53</i> #

*Prognostic impact of a marker is treatment-dependent and may change with new therapies.

†Low, low allelic ratio (<0.5); high, high allelic ratio (≥0.5); semiquantitative assessment of *FLT3*-ITD allelic ratio (using DNA fragment analysis) is determined as ratio of the area under the curve "*FLT3*-ITD" divided by area under the curve "*FLT3*-wild type"; recent studies indicate that AML with *NPM1* mutation and *FLT3*-ITD low allelic ratio may also have a more favorable prognosis and patients should not routinely be assigned to allogeneic HCT.^{57-59,77}

‡The presence of t(9;11)(p21.3;q23.3) takes precedence over rare, concurrent adverse-risk gene mutations.

§Three or more unrelated chromosome abnormalities in the absence of 1 of the WHO-designated recurring translocations or inversions, that is, t(8;21), inv(16) or t(16;16), t(9;11), t(v;11)(v;q23.3), t(6;9), inv(3) or t(3;3); AML with *BCR-ABL1*.

||Defined by the presence of 1 single monosomy (excluding loss of X or Y) in association with at least 1 additional monosomy or structural chromosome abnormality (excluding core-binding factor AML).¹¹⁶

¶These markers should not be used as an adverse prognostic marker if they co-occur with favorable-risk AML subtypes.

#*TP53* mutations are significantly associated with AML with complex and monosomal karyotype.^{37,66-69}

Figure 26 : Stratification du risque génétique des LAM selon l'ELN 2017. (17)

Les patients LAM *NPM1* sont majoritairement classés soit en :

- Groupe pronostique favorable si la mutation *NPM1* est seule ou associée à une mutation *FLT3*-ITD de ratio faible (<0.5).
- Groupe pronostique intermédiaire si la mutation *NPM1* s'associe à une mutation *FLT3*-ITD de ratio élevé (>0.5).

Les mutations *NPM1* sont des marqueurs moléculaires sensibles, utilisés pour suivre la maladie par l'intermédiaire de la MRD moléculaire. Le suivi est réalisé à des moments précis de la prise en charge.

Points d'étude de la MRD	Intitulé	Moelle	Sang
Avant le début de la première consolidation	MRD1	X	X
Avant le début de la deuxième consolidation	MRD2	X	X
Avant le début de la troisième consolidation	MRD3	X	X
Après la 3ème consolidation (1 mois après la fin de la cure)	MRD4	X	X

Figure 27 : Points d'étude de la MRD par quantification de la mutation *NPM1*.

Au diagnostic, la mutation est quantifiée, exprimée sous la forme d'un logarithme décimal du pourcentage d'allèle muté par rapport à un gène de ménage, et constitue un point de départ pour le suivi. Avant chaque cure de consolidation, une quantification sanguine et médullaire est réalisée pour observer la log-réduction du marqueur.

La MRD2 dans le sang est décisionnelle et module le groupe pronostique des patients établi au diagnostic.

- Elle est considérée négative si sa décroissance est supérieure à 4log par rapport au diagnostic (La MRD2 moelle, non décisionnelle, est considérée négative si inférieure à 1%). Une MRD2 négative dans le sang (re)classe le patient en groupe favorable. Il n'y a pas d'indication à l'allogreffe de CSH, le traitement est poursuivi par une cure de consolidation ultime.
- Elle est considérée positive si sa décroissance est inférieure à 4log par rapport au diagnostic et (re)classe le patient en groupe pronostique intermédiaire. L'indication d'allogreffe en première rémission complète est retenue.
- Un patient initialement classé dans le groupe pronostique défavorable le reste quel que soit sa MRD et l'allogreffe de CSH est indiquée.

CLASSIFICATION INITIALE	MRD2 SANG	DECISION D'ALLOGREFFE
RISQUE FAVORABLE	MRD2 négative : RISQUE FAVORABLE	NON
	MRD positive : RISQUE INTERMEDIAIRE	OUI
RISQUE INTERMEDIAIRE	MRD2 négative : RISQUE FAVORABLE	NON
	MRD2 POSITIVE : RISQUE INTERMEDIAIRE	OUI
RISQUE DEFAVORABLE	RSIQUE DEFAVORABLE quel que soit la MRD2	OUI

Figure 28 : Groupes de risque initiaux et après MRD2 des LAM NPM1. (Protocole BIG-01)

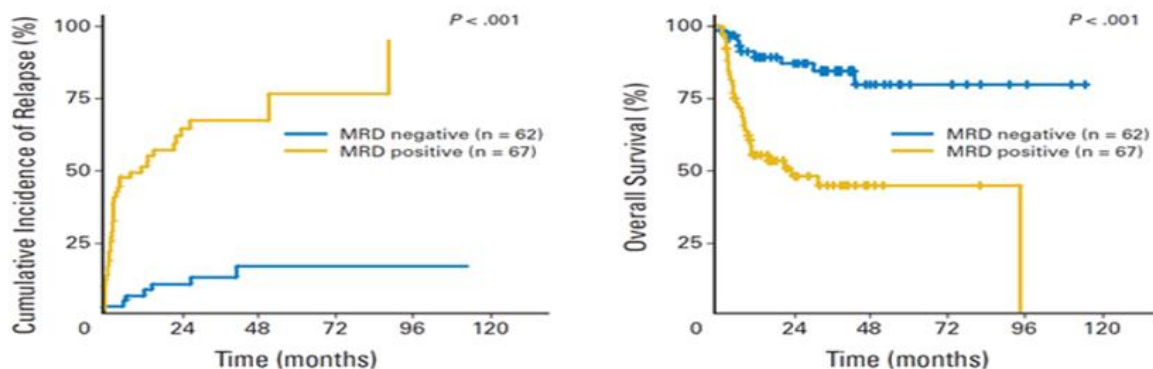


Figure 29 : MRD NPM1 prédictive du risque de rechute et de la survie globale. (89)

5) Caractéristiques cliniques et biologiques

Les mutations de NPM1 s'associent plus fréquemment aux LAM de novo et classées M4 et M5 selon FAB. (90) La présentation biologique est plus volontairement hyperleucocytaire avec une blastose circulante et une thrombocytose. La cytologie peut révéler des blastes présentant un noyau avec un aspect de « cup-like nuclei ». (91). L'étude de l'hématopoïèse résiduelle au myélogramme peut montrer de la dysplasie multilignée associée, notamment une dysmégacaryocytopoïèse. Plus de 95% de ces LAM sont CD34- en cytométrie de flux. (67) Cliniquement, la mutation NPM1 semble être corrélée à une dissémination extra médullaire de la maladie, avec des hypertrophies gingivales et des adénopathies. (92) Cette LAM est plus fréquente chez les femmes. (93) Le caryotype médullaire est normal dans 85% des cas ou associé à des anomalies non spécifiques (duplication du chromosome 8 et 4, délétion du bras court du chromosome 9).

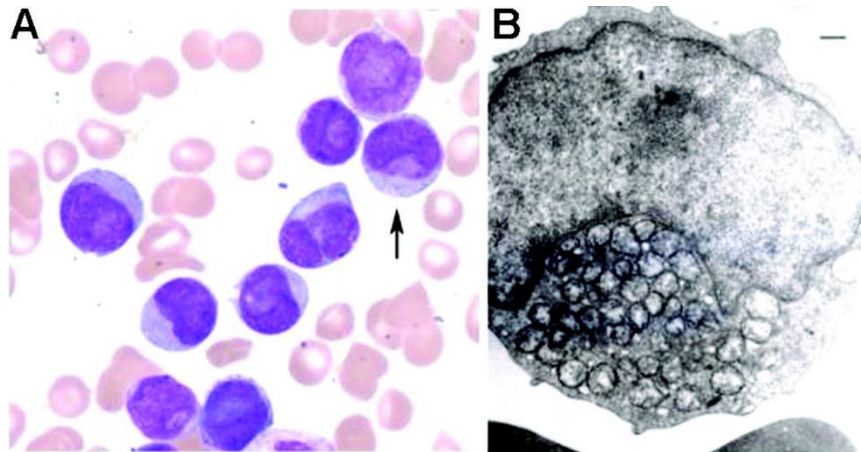


Figure 30 : Caractéristiques de blastes avec aspect du noyau « cup-like-nuclei ». (A) Frottis de moelle osseuse avec des blastes de taille moyenne, un rapport nucléo-cytoplasmique intermédiaire, le noyau présente des invaginations nucléaires proéminentes et le cytoplasme quelques fines granulations azurophiles (frottis de moelle osseuse au Wright-Giemsa ; grossissement original, x 1000). (B) Observation au microscope électronique à transmission de collections condensées de mitochondries à l'intérieur des poches nucléaires invaginées.

6) Thérapies ciblées.

Plusieurs études sont désormais menées pour établir des thérapies ciblées contre les blastes exprimant NPM1 mutée.

- Cibler l'extrémité N-terminale de la protéine NPM1 mutée, intacte dans la maladie et responsable de l'activité chaperon. (94) (95)
- Cibler la localisation cytoplasmique aberrante de la protéine mutée par l'inhibition du mécanisme dépendant de XPO1/CRM1 qu'elle utilise. (96)
- Cibler les niveaux de NPM1 cytoplasmique. Malgré la complexité de la leucémogénèse, la croissance et la survie des cellules cancéreuses peuvent être entravées par l'inactivation d'un seul oncogène. La protéine NPM1 mutée, qui simultanément inactive des suppresseurs de tumeurs tels que ARF et active des oncogènes dont c-myc, représente un maillon intéressant. L'action synergique de l'acide rétinoïque et de l'arsenic, en complément de la chimiothérapie, induit la dégradation protéasomique de NPM1 mutée et restaure la localisation nucléolaire de la protéine NPM1. (97)

PARTIE IV : MISE EN PLACE DE LA QUANTIFICATION DE LA MUTATION NPM1 DE TYPE A AU CHU SUD REUNION. EVALUATION DU KIT IPSOGEN® NPM1 MUTA MUTAQUANT.

1) Introduction.

Les LAM NPM1 représentent 30% des LAM de l'adulte, ce qui en fait l'une des mutations les plus fréquemment retrouvées. Plus de cinquante mutations NPM1 ont été décrites, mais la mutation NPM1 de type A est la plus fréquemment retrouvée (85% des cas). (67) (98)

La mise à jour 2016 de la classification OMS des hémopathies malignes a fait de la LAM NPM1 une entité à part entière, classée parmi les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, de par ses caractéristiques clinico-biologiques et pronostiques propres.

La détection d'une mutation NPM1 au diagnostic, seule ou associée à d'autres anomalies moléculaires et cytogénétiques, permet de classer les patients dans des groupes pronostiques.

Les mutations NPM1 constituent également une cible sensible, spécifique et robuste qui est quantifiée pour le suivi de la maladie et constitue la MRD moléculaire (Measurable Residual Disease). La MRD2 sanguine, prélevée lors de la 2^{de} cure de consolidation, est décisionnelle et guide l'attitude thérapeutique. (89) De plus, son suivi chez les patients en rémission cytologique permet une détection précoce des rechutes.

Le protocole BIG-01, travail des deux principaux groupes coopérateurs français de traitement des LAM (ALFA et GOELAMS) a émis des recommandations nationales pour la prise en charge des LAM NPM1. La technique de référence pour la quantification des mutations NPM1 est la RT-qPCR sur ADN complémentaire.

Cent trente-trois LAM ont été diagnostiquées au CHU Sud Réunion entre janvier 2015 et juillet 2020, dont vingt sont des LAM NPM1 (15%). Parmi ces LAM NPM1, dix-sept sont des mutations NPM1 de type A (85%). La quantification des LAM NPM1 de type A représente une activité significative qui justifie sa mise en place localement au CHU de La Réunion. De plus, le développement en local de cette analyse permettrait de s'affranchir des délais de rendu trop longs compte tenu des temps de transport avec la métropole. D'autant plus que l'analyse est réalisée à partir d'une extraction d'ARN qui rend le prélèvement très sensible à la dégradation.

C'est dans ce contexte que nous avons trouvé intéressant de développer cet examen de biologie sur l'île. Ce travail a donc pour but d'évaluer la faisabilité de la mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type A au CHU Sud Réunion par l'utilisation du kit NPM1 Muta MutaQant du fournisseur QIAGEN afin d'optimiser le suivi des patients de La Réunion.

2) Etat des lieux de la prescription de la biologie moléculaire au CHU de La Réunion.

Nous avons utilisé le système informatique du laboratoire Inlog™ pour extraire les données et sélectionner les patients à inclure dans notre étude.

Concernant le bilan moléculaire LAM pour les patients du CHU de La Réunion :

- Au diagnostic de la LAM : le bilan standard LAM comporte la recherche des mutations NPM1, FLT3-ITD/TKD, IDH1/2, CEBPA et le NGS sont envoyés à l'hôpital Cochin à Paris. La recherche de mutation NPM1 est réalisée en parallèle au CHU de La Réunion par une technique HRM et la recherche de mutation FLT3-ITD par PCR sur gel

d'agarose. La recherche de transcrits PML-RARA, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 sont réalisés au CHU de La Réunion par PCR sur gel.

- Au suivi de la LAM : les quantifications des transcrits NPM1-A ou B, CBFβ-MYH11, RUNX1-RUNX1T1 sont envoyés à l'hôpital Cochin. Les quantifications PML-RARA sont réalisées localement au CHU de la Réunion

3) Matériels et méthodes

a. Patients

Entre janvier 2015 et juillet 2021, 20 LAM NPM1 ont été diagnostiquées au CHU Sud Réunion. Le typage des mutations a révélé :

- 17 cas mutés NPM1 de type A. (85% des LAM NPM1 mutées)
- 1 cas muté NPM1 de type B.
- 1 cas avec une mutation NPM1 atypique (c.863_864CTCG)
- 1 mutation NPM1 n'a pas pu être typée.

Critères d'inclusion des patients :

- LAM associée à une mutation de NPM1 de type A.
- Disponibilité du matériel génétique au diagnostic, afin de constituer un point de départ pour le suivi.
- Suivi moléculaire à l'hôpital Cochin de façon à pouvoir faire une comparaison avec nos résultats obtenus au CHU de La Réunion. A noter que la comparaison ne peut se faire que sur des prélèvements ayant subi le même prétraitement concernant la rétrotranscription.

Trois patients remplissant les critères d'inclusion susmentionnés ont pu être sélectionnés. Les caractéristiques et les suivis de MRD de ces patients sont mentionnés dans les tableaux ci-dessous.

Tableau 1 : Caractéristiques cliniques et biologiques au diagnostic des 3 patients LAM NPM1 de type A sélectionnés.

	PATIENT 1	PATIENT 2	PATIENT 3
Date du diagnostic	Avril 2020	Octobre 2020	Mars 2021
Sexe	Femme	Femme	Homme
Age	58 ans	33 ans	66 ans
LAM <i>de novo</i> ou secondaire	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>	<i>De novo</i>
Leucocytes (sang)	307.1 G/L	36.3 G/L	3.73 G/L
Compte de blastes/ classification FAB (myélogramme)	95% LAM1	35% (hémodilution) LAM5	90% LAM5
CD33+	Oui	Oui	Oui
CD34-	Non	Oui	Oui
Caryotype	Normal	Normal	Normal
Statut FLT3 ITD	Muté (ratio élevé)	Muté (ratio faible)	Sauvage
Statut FLT3 TKD	Sauvage	Muté	Sauvage
Groupe à risque initial selon le BIG-01	Intermédiaire	Favorable	Favorable
Mutations au NGS	TET2 (2 mutations)	WT1	BCOR, IDH1, DNMT3A, SRSF2

Tableau 2 : Statut de la MRD2 dans le sang et groupe de risque des 3 patients LAM NPM1 de type A sélectionnés selon le BIG-01.

	PATIENT 1	PATIENT 2	PATIENT 3
MRD 2	Négative	Négative	Positive
Groupe de risque après MRD2 selon BIG-01	Favorable	Favorable	Intermédiaire

b. Matériels

b.1. Réactifs.

La quantification des transcrits NPM1 muté A est réalisée par PCR quantitative en temps réel à partir de prélèvements d'ADN complémentaire ou cDNA (RT-qPCR) à l'aide du kit Ipsogen® NPM1 mut A MutaQuant, Qiagen. Ce kit inclut les amorces et sondes ciblant les exons 11 et 12.

Ce kit utilise un mélange sonde/amorces. Il est basé sur le principe de la qPCR par hydrolyse de sondes spécifiques doublement marquées FAM™-TAMRA™. Au cours de la PCR, les amorces sens et anti-sens sont hybridées à une séquence spécifique. La sonde est composée d'un oligonucléotide marqué à son extrémité 5' par un marqueur émetteur de fluorescence (Reporter : FAM™) et à son extrémité 3' en aval par un inhibiteur de fluorescence (Quencher : TAMRA™).

Si la cible d'intérêt est présente, la sonde se fixe spécifiquement entre les sites où sont hybridés les amorces sens-et anti-sens. L'activité exonucléase 5'->3' de l'ADN polymérase *Taq* clive alors la sonde entre le reporter et le quencher. Les fragments de sonde sont ainsi déplacés de la cible et la polymérisation se poursuit (Figure 29). La fluorescence émise par le reporter est émise et mesurée par l'appareil. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR (Figure 30).

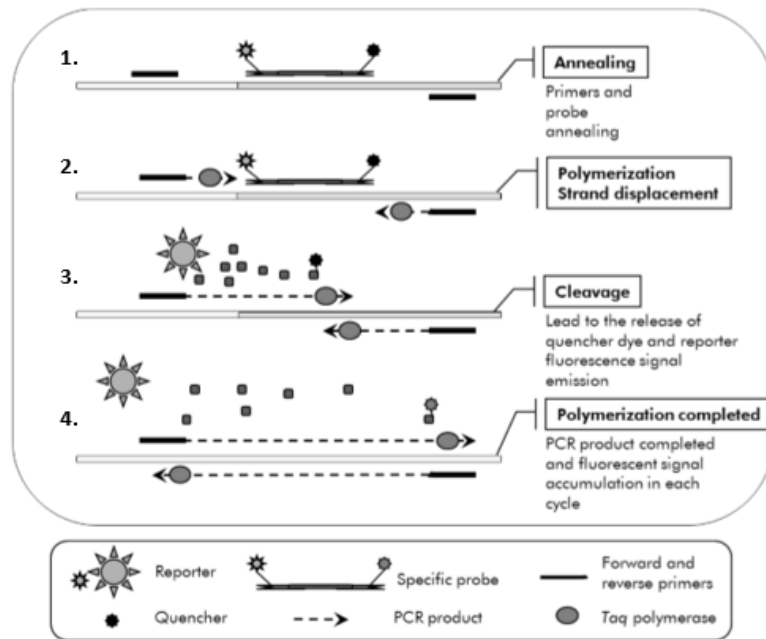


Figure 31 : Principe de la réaction PCR utilisant des sondes d'hydrolyse TaqMan.

La fluorescence émise par le reporter est mesurée par l'appareil. L'augmentation de la fluorescence est directement proportionnelle à l'amplification de la cible durant la PCR. Le nombre de cycles PCR nécessaires à la détection d'un signal supérieur au seuil est appelé le cycle threshold (Ct ou Cp) et est directement proportionnel à la quantité de cible présente au début de la réaction. Plus la concentration d'une cible est importante à l'initiation de la réaction de PCR, moins de cycles sont nécessaires pour obtenir l'amplification. Ce kit utilise une amorce anti-sens spécifique de NPM1-A muté dans le mélange d'amorces et de sondes (PPM-NPM1 mutA) permettant une détection spécifique des transcrits de la mutation NPM1 de type A (Figure 32).

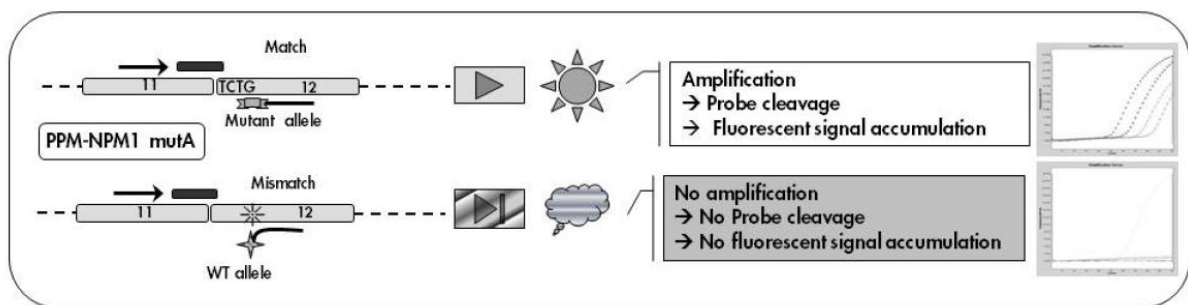


Figure 32 : PCR allèle spécifique.

Le kit NPM1 MutA MutaQuant d'Ipsogen fournit, en plus des mélanges sondes-amorces NPM1-A et ABL, des calibrants NPM1-A (de concentration connue 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copies NPM1-A/5 μ L) et ABL (de concentration connue 10^3 , 10^5 , 10^6 copies ABL/5 μ L). Ces calibrants permettent d'établir la courbe de calibration qui servira à la quantification.

La quantification absolue d'une cible par RT-qPCR dépend de nombreux paramètres des étapes préalables à l'amplification :

- De la quantité de cellules utilisées pour l'extraction et de son rendement.
- De la qualité de l'ARN obtenu

- Du rendement de la rétro-transcription.

La maîtrise de l'ensemble de ces facteurs étant difficile, la quantification des transcrits NPM1 A est normalisée par rapport à la quantification d'un gène de contrôle, d'expression élevée, ubiquitaire et stable au cours de l'évolution de la maladie. La quantification d'ABL permet de s'affranchir des variations dues aux étapes pré-PCR.

Les résultats sont exprimés en copies normalisées de mutant NPM1-A par rapport à ABL et multipliée par 100 pour avoir un pourcentage

$$\text{Ratio (\%)} = \frac{N_{\text{NPM1 A}}}{N_{\text{ABL}}} \times 100$$

(N : nombre de cible en cours d'amplification nécessaires pour atteindre le seuil)

b.2. Appareil de qPCR.

Nos analyses ont été réalisées sur le système PCR du laboratoire, LightCycler®480 (Roche Diagnostics).

Le LightCycler® 480 est un système de PCR en temps réel qui travaille avec des plaques 96 puits. Il permet la quantification de gènes et l'analyse des variations génétiques par les courbes de fusion à haute résolution (High Resolution Melting HRM). Il est constitué d'un thermocycleur (appareil de PCR conventionnel) couplé à un système optique (pour l'excitation et la détection de fluorophores). Cet instrument permet de faire le suivi d'une réaction de PCR en temps réel grâce à l'utilisation des fluorophores.



Figure 33 : LightCycler® 480

c. Méthodes

c.1. Mode opératoire des manipulations

Les échantillons sont distribués en duplicate, excepté l'eau.

Les plasmides NPM1 A et ABL sont fournis par le kit. Des contrôles de qualité interne (CIQ) ont été constitués à partir d'échantillons patients et d'EEQ afin d'obtenir trois niveaux connus de concentrations de NPM1 A (élevée, intermédiaire, faible) et encadrer les manipulations.

Le détail de la manipulation est présenté ci-dessous, la feuille de paillasse est en annexe.

1. Préparation des échantillons : dilution des patients au 2/5^{ème} pour obtenir un volume total de 25µl soit 10µl d'ADNc patient et 15µl d'eau purifiée pour biologie moléculaire. Préparer de la même manière les CIQ et un témoin de non contamination H2O.

2. Afin d'éviter toute contamination, préparation des mix dans une salle différente. Le volume des mix est déterminé par (le nombre de cupules à distribuer + 1) pour disposer d'un volume mort en fin de manipulation. Les mix contiennent l'ADN Taq polymérase (Taq Man Universal PCR Master Mix ; non fournie par le kit /préconisée), les mix d'amorces et de sondes NPM1 et ABL (mix P-S fournis par le kit) et de l'eau purifiée pour biologie moléculaire (nucléase-free PCR grade water, non fournie par le kit)
3. Distribuer 20µl des mix NPM1 A et ABL dans les cupules appropriées. Recouvrir la plaque avec du papier aluminium afin de protéger de la lumière.
4. Ajouter 5µl d'échantillon dans l'ordre suivant : plasmides → CIQ → H2O → patients.
5. Retirer d'aluminium. Recouvrir d'une feuille d'étanchéité. Centrifuger pendant 1 minute, à 4°C à 300g (unité de l'accélération centrifuge radiale)
6. Placer la plaque dans le LightCycler 480. Lancer le « Run Template » enregistré dans le système PCR : « NPM1 A MutA Quant Run ». Le programme PCR est détaillé dans le tableau ci-dessous.

Mode of analysis	Quantification
Hold 1	Temperature: 50°C Time: 2 minutes
Hold 2	Temperature: 95°C Time: 10 minutes
Cycling	50 times 95°C for 15 seconds 63°C for 1 minute; with acquisition of FAM fluorescence: Single

Figure 34 : Programme de PCR pour la quantification des transcrits NPM1 de type A selon les recommandations du kit Ipsogen® NPM1 Mut A Mutaquant.

c.2. Performances du kit NPM1 Mut A MutaQuant

Dans l'objectif de mettre en place la technique de quantification de la mutation NPM1 de type A à La Réunion, nous avons évalué différents paramètres :

- Répétabilité

D'après le SH GTA 04, «l'essai de répétabilité consiste à analyser un même échantillon dans les conditions suivantes : même opérateur, même lot de réactifs, même instrument, même étalonnage dans un délai le plus court possible. L'objectif est de caractériser la meilleure performance possible, dans des conditions optimales et de vérifier le bon fonctionnement du système (instrument/réactif) pour l'analyte concerné. L'évaluation de la répétabilité est indispensable lors de l'installation d'un nouvel analyseur afin de connaître les performances initiales.»

Le SH GTA 04 précise également que la répétabilité doit être testée pour chaque matrice susceptible d'être analysée et qu'il est recommandé de tester au moins deux niveaux de concentrations dont une si possible proche du seuil décisionnel. Concernant le nombre de valeurs, l'effectif recommandé est de 30 pour avoir une interprétation statistique optimale.

En raison du coût des réactifs, nous avons décidé de passer 5 fois les 3 niveaux de CQI.

- Reproductibilité/fidélité intermédiaire

D'après le SH GTA 04 , 9.6.1.2 : « L'essai de fidélité intermédiaire consiste à analyser un échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... » (103).

En pratique, la fidélité intermédiaire est calculée à partir des contrôles internes de qualité (CIQ) qui sont passés à chaque série. Nous avons choisi 5 déterminations sur 3 niveaux de concentration.

Notre technique n'étant pas encore utilisée en routine, nous n'avons pas pu recueillir toutes les données nécessaires au calcul de la fidélité intermédiaire. Nous présentons tout de même les résultats préliminaires dans le Tableau 14.

- Justesse/exactitude

D'après le SH STA 04 : « La justesse est l'étroitesse de l'accord entre la moyenne d'un nombre infini de valeurs mesurées répétées et une valeur de référence (ou valeur vraie). »

« Une approche de la justesse peut être envisagée en comparant la moyenne de plusieurs dosages d'un même échantillon à une valeur cible, assimilée à la valeur vraie. L'écart observé correspond au biais. Le biais peut être évalué à partir des résultats obtenus avec des échantillons de contrôle titrés ou des valeurs observées dans des programmes de contrôle interne couplés à une comparaison inter-laboratoire (externalisation des CIQ). L'approche de la justesse n'est pas applicable dans notre cas car il n'existe pas de programme de CIQ externalisés pour cette technique. »

D'après le SH GTA 04, « L'exactitude est définie comme l'étroitesse de l'accord entre une valeur mesurée et la valeur vraie d'un mesurande. Comme la justesse, l'exactitude devrait être vérifiée à partir d'étalons primaires ou de matériaux de référence certifiés ou de méthodes de référence ou à des étalons internationaux. A ce jour, les laboratoires évaluent l'exactitude à partir des résultats des Evaluations Externes de la Qualité (EEQ). » Pour la quantification de la mutation NPM1 A, le laboratoire de biologie moléculaire du CHU de La Réunion est inscrit aux programmes d'EEQ du Groupe des Biologistes Moléculaires des Hémopathies Malignes (GBMHM) qui envoie quatre échantillons une fois par an.

Pour les critères quantitatifs comme le nôtre, une valeur de référence appelée valeur cible est calculée ; elle correspond à la moyenne de l'ensemble des résultats des participants. Vingt-trois laboratoires ont participé à ces EEQ . Nous nous sommes comparés à leur moyenne par l'intermédiaire d'un Z-score (nombre d'écart types qui sépare notre résultat de la moyenne). A chaque résultat une note sous forme de lettre (A, B, C ou D) est attribuée en fonction de l'écart à la moyenne.

- Variabilité inter-opérateurs

D'après le SH GTA 04 : « La variabilité inter-opérateurs constitue un indicateur de la maîtrise de la réalisation des méthodes non automatisées. Un moyen d'assurer cette maîtrise repose sur la vérification de la compétence des opérateurs (habilitation). Des critères pourront être établis, par exemple, par l'intermédiaire d'une analyse de la robustesse ».

Au laboratoire de biologie moléculaire du CHU de La Réunion, trois opérateurs vont être amenés à réaliser cette technique en routine. Concernant la formation des techniciens, les automates sont déjà utilisés en routine pour la quantification du transcrite de fusion BCR-ABL, nous n'avons donc pas eu besoin de les former à l'utilisation du LightCycler®.

- Contamination inter-échantillon.

D'après le SH GTA 04, 9.6.1.9 : « Des phénomènes de contamination peuvent être observés lors de l'utilisation de systèmes analytiques notamment au niveau des systèmes de pipetage des échantillons (contamination inter-échantillons) et de distribution des réactifs (contamination inter-réactifs). »

Il existe la contamination inter-échantillons et la contamination inter-réactifs, cette dernière n'étant pas applicable à notre technique car les mix réactionnels sont préparés de façon unique. Pour tester le risque de contamination inter-échantillons de notre technique, un échantillon avec un fort ratio connu doit être alterné avec un échantillon sur la plaque de PCR. La contamination inter-échantillon n'a pas été reprise, ayant déjà été validée sur une technique similaire accréditée au laboratoire (BCR-ABL).

4) Résultats

Nous articulons nos résultats en trois parties :

- Validation analytique de la RT-qPCR
- Comparaison des cinétiques moléculaires CHU Sud Réunion –hôpital Cochin
- Vérification de méthode du kit NPM1 Muta MutaQuant d'Ipsogen

a. Validation analytique de la RT-qPCR

La PCR en temps réel permet de déterminer la quantité d'une séquence cible ou d'un gène présent dans un échantillon. Le C_t (cycle de seuil) correspond à l'intersection entre une courbe d'amplification et une ligne de seuil. Il correspond à une mesure relative de la concentration de la cible dans la réaction de PCR.

Nous avons établi des critères de validation technique de notre RT-qPCR, en accord avec les recommandations du fournisseur et la littérature. (99) (100)

a.1. Vérification des courbes d'amplification des plasmides NPM1 A et ABL

L'allure des courbes de fluorescence doit être exponentielle, témoignant de la qualité des amorces et des sondes.

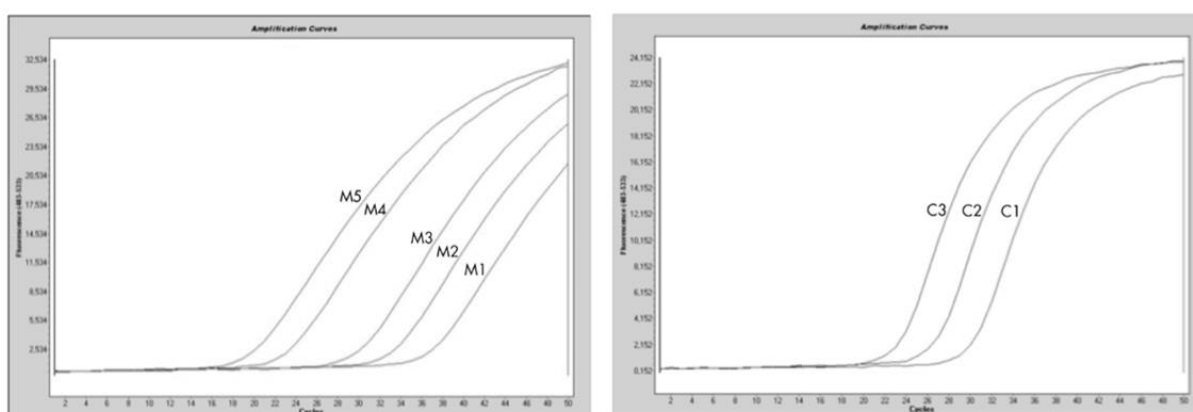


Figure 35 : Allure des courbes de fluorescence. Des plasmides NPM1 A et ABL. A gauche, détection des cinq plasmides de NPM1 (10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^5 , 10^6 copies/5 μ l). A droite, détection des trois plasmides de contrôle ABL (10^3 , 10^4 , et 10^5 copies/5 μ l).

a.2. Vérification de l'efficacité de la PCR.

A partir des valeurs brutes de Cp obtenues pour chaque dilution de NPM1 A et ABL, une droite de calibration est calculée.

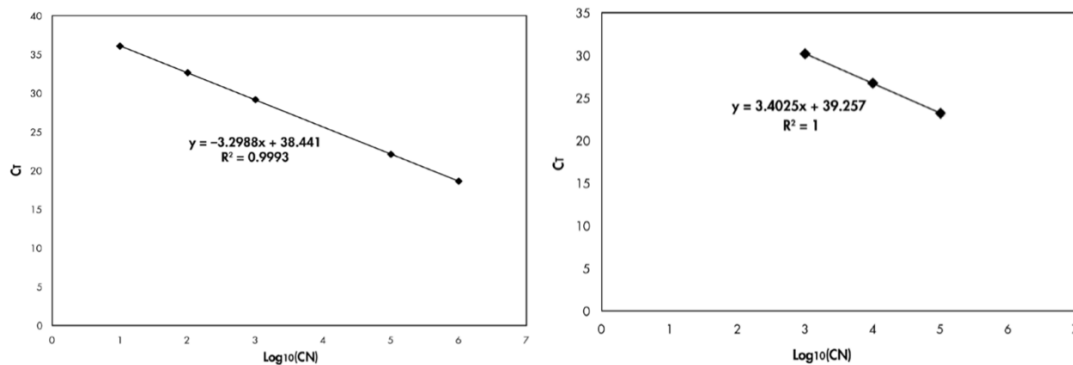


Figure 36 : Pente de calibration pour les plasmides NPM1 A à gauche et ABL à droite.

La pente théorique de la courbe est de -3.3. Une pente (« slope ») comprise entre -3,0 et -3,9 est acceptable tant que le coefficient de détermination R^2 est $>0,95$.

L'efficacité (« efficiency ») de la PCR doit être comprise entre 1.93 et 2.08. La formule $E = 10^{-1/\text{pente}}$ permet de l'obtenir.

Les duplicatas doivent être reproductibles (<1 Cp de différence).

Vérification du contrôle négatif avec une absence d'amplification du puit contenant l'eau purifiée de biologie moléculaire.

b. Résultats des 3 patients obtenus au CHU de La Réunion.

b.1. PATIENT 1

Le PATIENT 1 est une femme de 58 ans diagnostiquée pour une LAM *de novo* en avril 2020, avec mutations NPM1-A et FLT3-ITD ratio élevé sans anomalie additionnelle de mauvais pronostic au NGS, ce qui la classe en groupe de risque intermédiaire (selon la classification ELN 2017). Les résultats de quantification de NPM1 A au diagnostic et au suivi sur moelle et sang sont présentés dans le **tableauxxx**. Malheureusement, le prélèvement de MRD2 était en quantité insuffisante pour évaluer ce point par biologie moléculaire. Le myélogramme en MRD2 ne montrait par ailleurs pas d'excès de blastes.

Sa prise en charge a consisté en une chimiothérapie d'induction selon le BIG-01, avec l'adjonction de Midostaurine à partir de J8 ayant permis l'obtention d'une rémission cytologique complète en post-induction.

Le traitement de consolidation a été poursuivi par 2 cures d'Aracytine hautes doses associées à la Midostaurine. Les myélogrammes réalisés à chacune de ces cures ont montré une persistance de la rémission cytologique.

La log-réduction de la MRD2 sur le sang est $> 4\log$, avec la mutation NPM1 A toujours détectable, et reclasse la patiente en groupe à risque favorable : il n'y a donc pas d'indication à l'allogreffe de CSH et le traitement est poursuivi par une cure de consolidation ultime. La mutation NPM1 est indétectable en MRD3. Un myélogramme de fin de traitement, réalisé en septembre 2020, montre la persistance de la rémission cytologique et moléculaire.

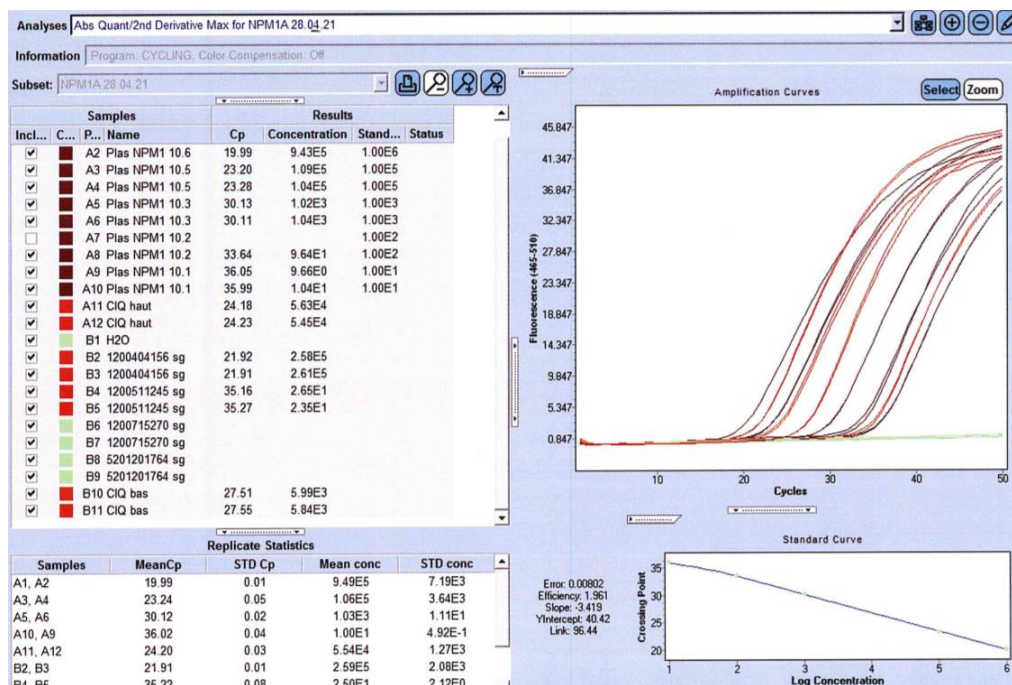
Le suivi moléculaire est poursuivi tous les 3 mois dans le sang. La midostaurine, maintenue en traitement d'entretien, est arrêtée en février 2021 devant une mauvaise tolérance clinique.

En avril 2021, la mutation NPM1 de type A est à nouveau détectée dans le sang, quantifiée à 43%. Ce résultat indique une rechute moléculaire qui mène à une exploration médullaire en mai 2021 confirmant la rechute cytologique avec 86% de blastes avec un transcrit NPM1 quantifié à 1463.68% dans la moelle.

La patiente est hospitalisée pour une chimiothérapie de rattrapage par Aracytine hautes doses, associées au Gemtuzumab Ozogamicin. La rémission cytologique est obtenue au décours. La prise en charge consiste en l'allogreffe de cellules souches dès l'obtention d'une rémission complète.

- Cinétique dans le sang PATIENT 1.

Détail de notre RT-qPCR :



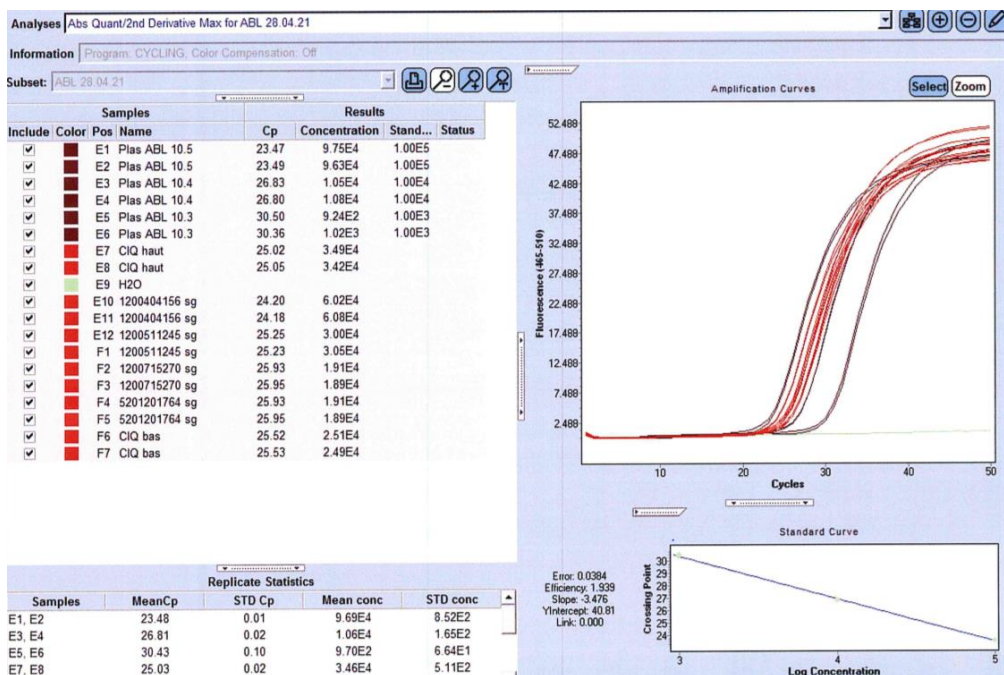


Figure 37: Cinétique sang PATIENT 1 du diagnostic à la fin de traitement. En haut : copies de NPM1 A. En bas : copies d'ABL.

Validation technique de la manipulation :

- Les courbes de fluorescence des plasmides NPM1 A et ABL sont exponentielles.
- Pente comprise entre -3.0 et -3.9 (-3.419 pour NPM1 A et -3.476 pour ABL) et efficacité entre 1.93 et 2.08 ((1.961 pour NPM1 A, 1.939 pour ABL).
- Les plasmides NPM1 et ABL et le patient, en duplicate, sont reproductibles (< 1 Cp de différence)
- Absence d'amplification de l'eau.

Tableau 3 : Cinétique sur sang PATIENT 1.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Diagnostic (avril 2020)	515000	121000	425.62	2.629	-
MRD1 (mai 2020)	605	60500	0.10	-1.0	3.63
MRD3 (juillet 2020)	0	38000	0	-	Indéetectable
Fin de traitement (septembre 2020)	0	38000	0	-	Indéetectable
Suspicion de rechute (avril 2021)	2960	41700	7.098	0.8511	-
Rechute (mai 2021)	703000	198100	357.87	2.5537	-1.7
Post-rattrapage (juin 2021)	0	33900	0	-	Indéetectable
Post-rattrapage (juillet 2021)	0	26300	0	-	indéetectable

Tableau 4 : Cinétique sur moelle osseuse PATIENT 1.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Diagnostic (avril 2020)	2159690	481000	449	2.652	-
MRD1 (mai 2020)	3073	59100	5.2	0.714	1.94
MRD3 (juillet 2020)	0	45000	0	-	Indéetectable
Fin de traitement (septembre 2020)	0	42900	0	-	Indéetectable
Rechute (mai 2021)	1218000	252000	483	2.6842	-0.322
Post-rattrapage (juin 2021)	0.73	28200	0.0026	-2.585	5.3

b.2. PATIENT 2

Le PATIENT 2 est une femme de 33 ans diagnostiquée pour une LAM *de novo* en octobre 2020, avec mutations NPM1 A et FLT3-ITD de ratio faible en biologie moléculaire, ce qui la classe dans le groupe à risque favorable (selon la classification ELN 2017).

La prise en charge a consisté en une chimiothérapie d'induction selon le BIG1. La Midostaurine est ajoutée à partir de J8. La rémission cytologique est obtenue sur le myélogramme post-induction.

Le traitement est poursuivi par 2 cures d'Aracytine hautes doses associées à la Midostaurine. La MRD2 sanguine, toujours détectable, présente une log-réduction est > 4log par rapport au diagnostic. Une dernière cure de consolidation est envisagée mais la patiente décide d'arrêter le traitement malgré les risques encourus. Ainsi, la MRD2 constitue le dernier point de suivi sous traitement. L'absence d'excès de blastes montre la persistance de la rémission cytologique.

Le suivi de la mutation NPM1 A est poursuivi dans le sang tous les 3 mois. En février 2021, la rémission moléculaire partielle se maintient, mais la MRD se positive faiblement. En juin 2021, à 5 mois de la dernière cure, une numération sanguine met en évidence une hyperleucocytose à 22 G/L, essentiellement composée de blastes (80%), dont certains présentent un aspect « cup-like ». La quantification du transcrit NPM1 A est alors très nettement augmentée dans la moelle comme dans le sang.

Nous avons repris le suivi moléculaire dans le sang du PATIENT 2. Les détails des manipulations sont en annexe.

Tableau 5 : Cinétique sur sang PATIENT 2.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Diagnostic (novembre 2021)	280000	54100	517.56	2.714	-
MRD1 (décembre 2020)	146.6	16960	0.864	-0.0633	2.78
MRD2 (janvier 2021)	10.94	40600	0.027	-1.57	4.28
Suivi (février 2021)	3.64	39000	0.01	-2.03	4.74
Rechute cytologique (juin 2021)	905000	99300	911.38	2.9597	-0.25

b.3. PATIENT 3

Le PATIENT 3 est un homme de 66 ans, diagnostiqué pour une LAM *de novo* en mars 2021, avec mutation de NPM1 A et donc classé en groupe à risque favorable. (selon la classification ELN 2017)

La prise en charge a consisté en une chimiothérapie d'induction du sujet âgé selon le BIG-01. La rémission cytologique en post-induction est obtenue.

Le traitement de consolidation a été poursuivi par 2 cures d'Aracytine à doses intermédiaires. Les myélogrammes montrent une persistance de la rémission cytologique.

La MRD2, dans le sang et dans la moelle osseuse, est positive car elle n'atteint pas une log-réduction > 4log et pose l'indication théorique d'une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. La MRD3 est négative avec un transcrit NPM1 A détectable.

Quatre points du suivi dans la moelle osseuse ont été repris (diagnostic, MRD1, MRD2 et MRD3) et trois points de suivi dans le sang (diagnostic, MRD2 et MRD3). Les résultats sont présentés dans le tableauxx.

Tableau 6 : Cinétique sur sang PATIENT 3.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Diagnostic (mars 2021)	125600	86600	145	2.1615	-
MRD2 (juin 2021)	8.76	37000	0.0237	-1.625	3.8
MRD3 (juillet 2021)	0	43200	0	-	indétectable

Tableau 7 : Cinétique sur moelle osseuse PATIENT 3.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Diagnostic (mars 2021)	515000	103400	498	2.6973	-
MRD1 (mai 2021)	1464	54400	2.69	0.4298	2.3
MRD2 (juin 2021)	114	61700	0.185	-0.7328	3.4
MRD3 (juillet 2021)	0	45200	0	-	indétectable

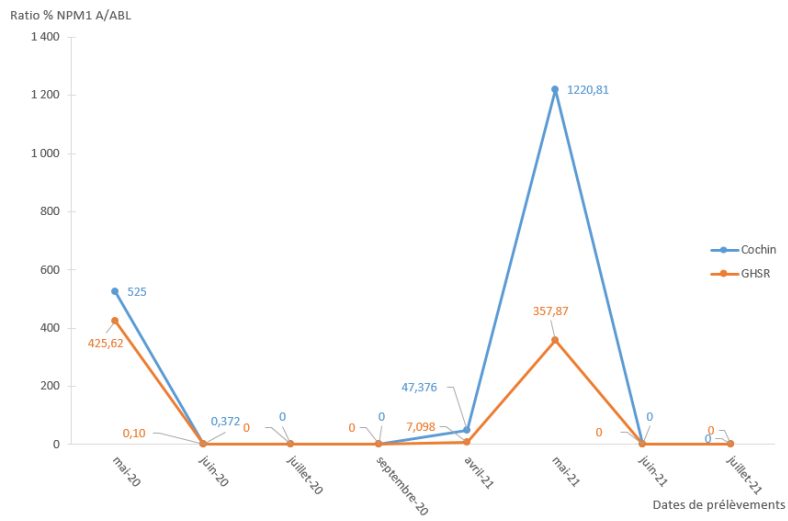
c. Comparaison de nos résultats à l'hôpital Cochin.

c.1. PATIENT 1

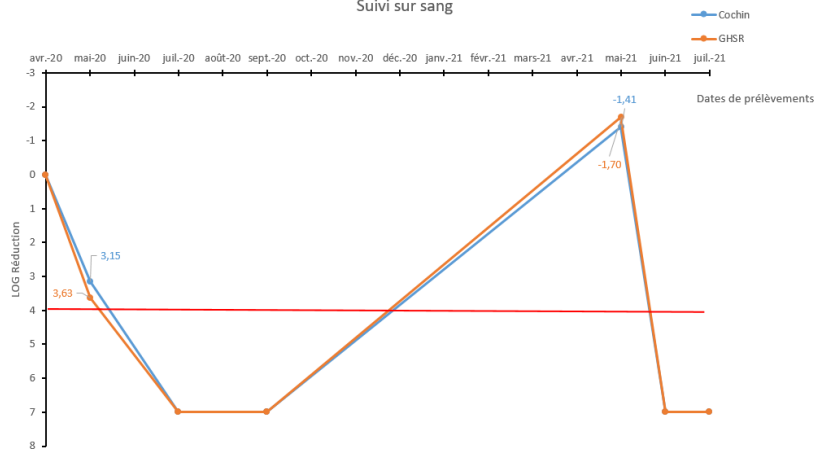
Tableau 8 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 1 avec l'hôpital Cochin.

	COPIES NPM1 A		COPIES ABL		% NPM1 A		LOG		LOG REDUCTION	
	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR
Diagnostic (avril 2020)	1000598	515000	190590	121000	525	425.62	2.72	2.629	-	-
MRD1 (mai 2020)	2231	605	56983	60500	0.372	0.10	-0.43	-1.0	3.15	3.63
MRD3 (juillet 2020)	0	0	49413	38000	0	0	-	-	Indéetectable	Indéetectable
Fin de traitement (septembre 2020)	0	0	45439	38000	0	0	-	-	Indéetectable	Indéetectable
Suspicion de rechute (avril 2021)	14804	2960	31248	41700	47.376	7.098	1.68	0.8511	-	-
Rechute (mai 2021)	5864145	703000	480347	198100	1220.81	357.87	3.09	2.5537	-1.41	-1.7
Post-rattrapage (juin 2021)	0	0	97317	33900	0	0	-	-	indéetectable	Indéetectable
Post-rattrapage (juillet 2021)	0	0	45657	26300	0	0	-	-	Indéetectable	indéetectable

%NPM1 A PATIENT 1
Suivi sur sang



Log réduction PATIENT 1
Suivi sur sang

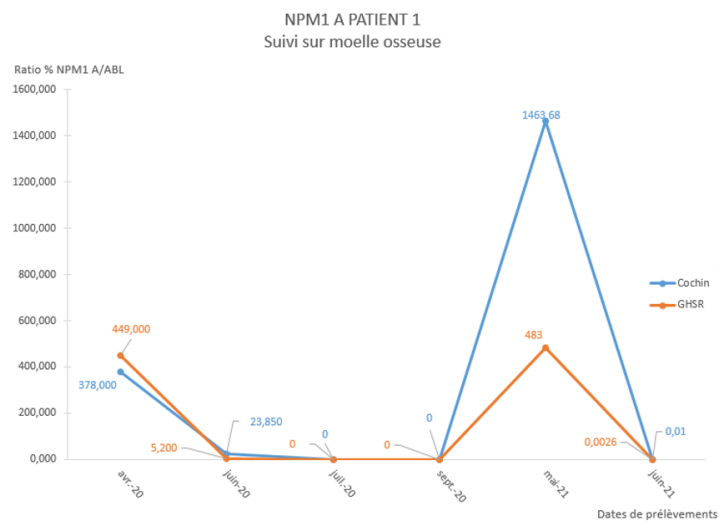


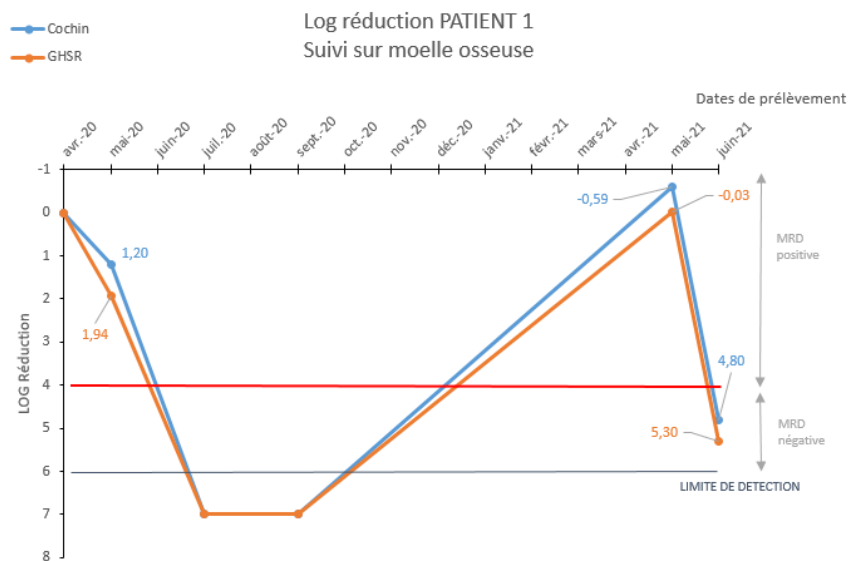
Le suivi sanguin du PATIENT 1 est superposable à l'hôpital Cochin.

- Cinétique dans la moelle osseuse du PATIENT 1.

Tableau 9 : Comparaison des résultats sur moelle osseuse du PATIENT 1 avec l'hôpital Cochin.

	COPIES NPM1 A		COPIES ABL		% NPM1 A		LOG		LOG REDUCTION	
	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR
Diagnostic (avril 2020)	1215410	2159690	321537	481000	378	449	2.578	2.652	-	-
MRD1 (mai 2020)	16624	3073	69701	59100	23.85	5.2	1.378	0.714	1.20	1.94
MRD3 (juillet 2020)	0	0	49413	45000	0	0	-	-	Indétectable	Indétectable
Fin de traitement (septembre 2020)	0	0	42348	42900	0	0	-	-	Indétectable	Indétectable
Rechute (mai 2021)	9380765	1218000	640903	252000	1463.68	483	3.17	2.6842	-0.592	-0.322
Post-rattrapage (juin 2021)	6	0.73	105394	28200	0.01	0.0026	-2.24	-2.585	5.4	5.3



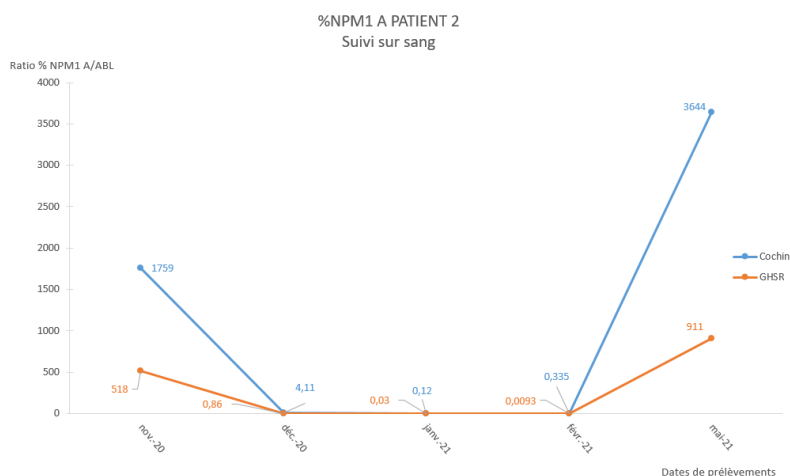


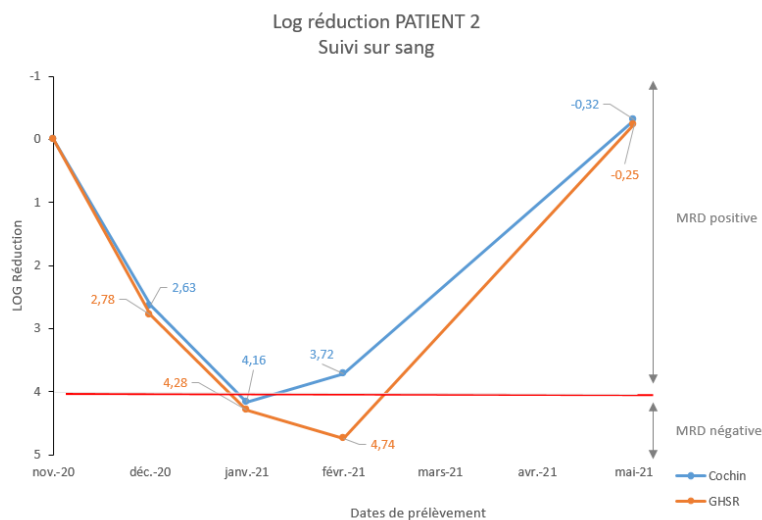
Le suivi médullaire du PATIENT 1 est également superposable à l'hôpital Cochin.

c.2. PATIENT 2

Tableau 10 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 2 avec l'hôpital Cochin.

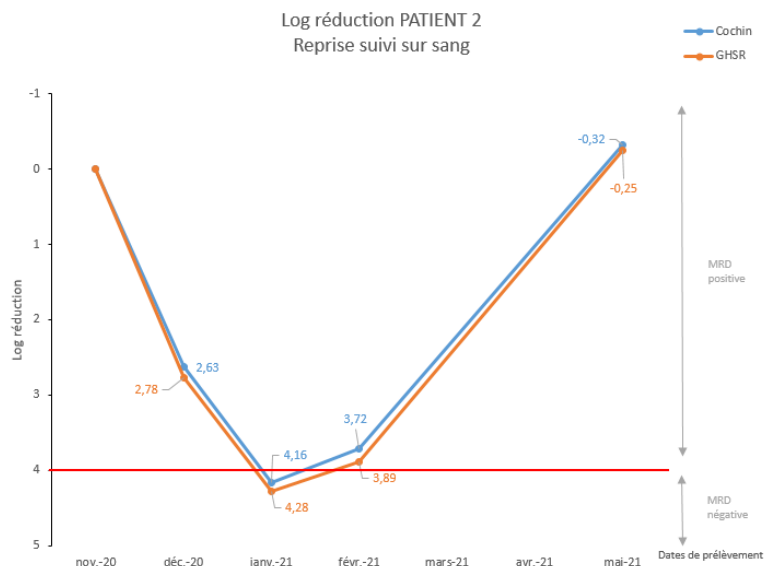
	COPIES NPM1 A		COPIES ABL		% NPM1 A		LOG		LOG REDUCTION	
	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR
Diagnostic (novembre 2021)	2705719	280000	153740	54100	1759	517.56	3.25	2.714	-	-
MRD1 (décembre 2020)	831	146.6	20206	16960	4.113	0.864	0.61	-0.06	2.63	2.78
MRD2 (janvier 2021)	60	10.94	49710	40600	0.121	0.027	-0.92	-1.57	4.16	4.28
Suivi (février 2021)	137	3.64	40919	39000	0.335	0.01	-0.48	-2.03	3.72	4.74
Rechute cytologique (juin 2021)	5248517	905000	144032	99300	3644	911.38	3.56	2.96	-0.31	-0.25





Notre cinétique est superposable jusqu'en MRD2 : la cible est toujours détectable, avec une réduction > 4log par rapport au diagnostic. En revanche notre suivi en février 2021 diverge : alors que l'hôpital Cochin trouve une MRD qui se positive, notre MRD négative se renforce, avec une cible toujours détectable. Nous répétons la manipulation pour vérifier notre résultat.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG	LOG REDUCTION
Suivi (février 2021)	3.64	39000	0.01	-2.03	4.74
Suivi (février 2021) Repassage	26.2	39600	0.0662	-1.1794	3.89



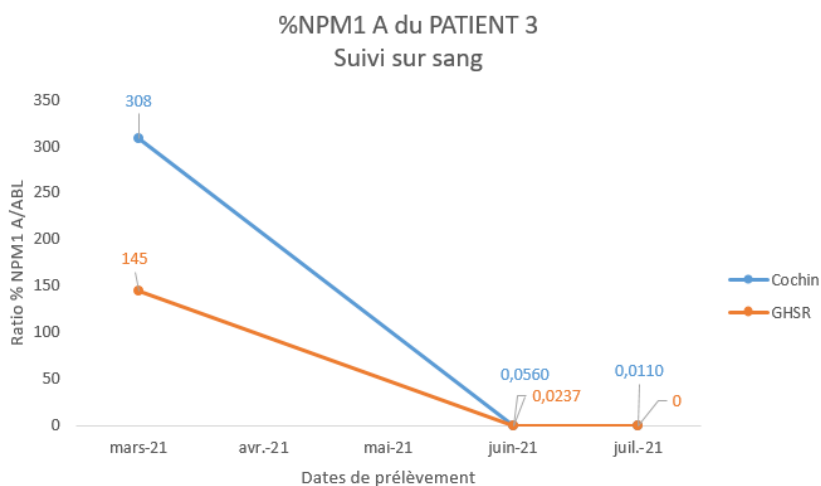
Ce repassage met en évidence davantage de mutations NPM1 A sur un nombre de copies d'ABL de contrôle similaire et corrige notre log-réduction par rapport au diagnostic. Notre MRD2 se positive également. Nous n'avons pas d'explication sur pourquoi nous avons trouvé moins de copies de NPM1 A sur la première manipulation.

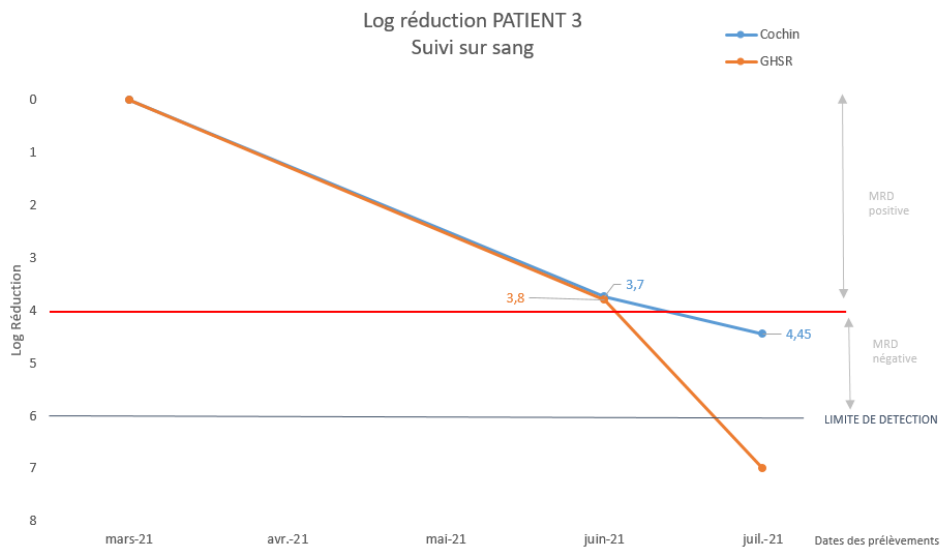
Nous mettons la rechute moléculaire en évidence.

c.3. PATIENT 3

Tableau 11 : Comparaison des résultats sur sang du PATIENT 3 avec l'hôpital Cochin.

	COPIES NPM1 A		COPIES ABL		% NPM1 A		LOG		LOG REDUCTION	
	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR
Diagnostic (mars 2021)	374523	125600	121490	86600	308	145	2.49	2.1615	-	-
MRD2 (juin 2021)	36	8.76	64937	37000	0.056	0.0237	-1.25	-1.625	3.7	3.8
MRD3 (juillet 2021)	7	0	57548	43200	0.011	0	-1.958	-	4.45	indétectable

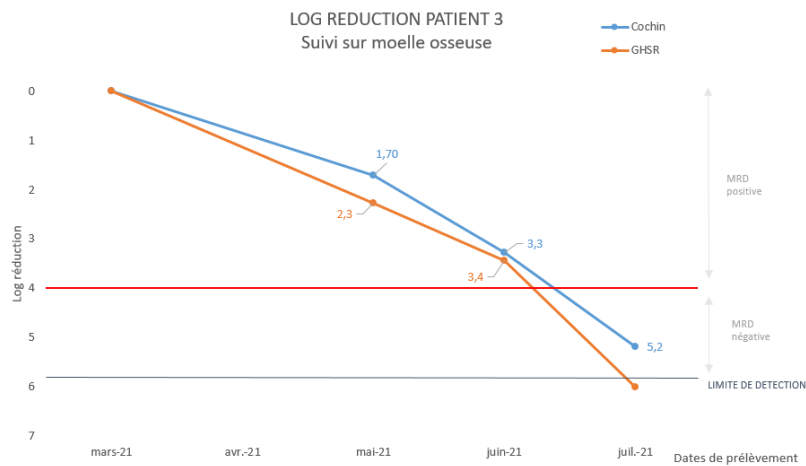
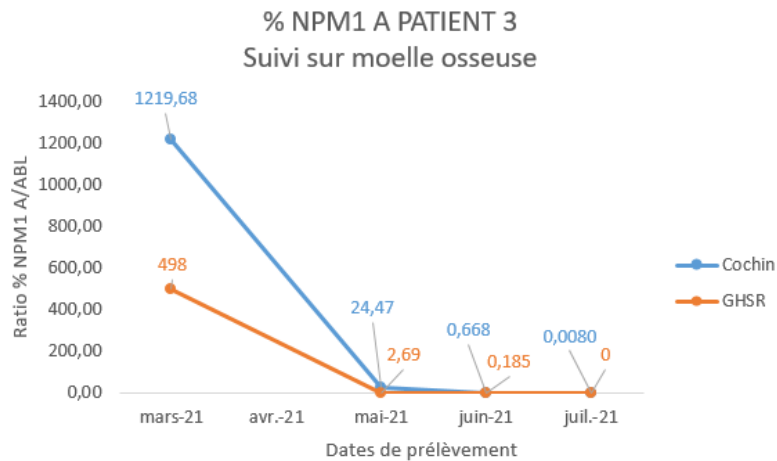




Notre suivi sur sang est comparable, notamment notre MRD2 qui est également positive. Nous trouvons une MRD3 indétectable, alors que l'hôpital Cochin, en analysant davantage de copies d'ABL, trouve 7 copies de la mutation NPM1 A.

Tableau 12 : Comparaison des résultats sur moelle osseuse du PATIENT 3 avec l'hôpital Cochin.

	COPIES NPM1 A		COPIES ABL		% NPM1 A		LOG (% NPM1A)		LOG REDUCTION	
	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR	Cochin	GHSR
Diagnostic (mars 2021)	2999022	515000	245886	103400	1249.68	498	3.09	2.6973	-	-
MRD1 (mai 2021)	5236	1464	21394	54400	24.47	2.69	1.39	0.4298	1.70	2.3
MRD2 (juin 2021)	623	114	93258	61700	0.668	0.185	-0.18	- 0.7328	3.3	3.4
MRD3 (juillet 2021)	11	0	57548	45200	0.011	0	-1.958	-	5.2	indétectable



Notre MRD2 moelle est comparable au résultat de Cochin. Tout comme le sang, notre MRD3 est indétectable, alors que l'hôpital Cochin trouve quelques copies de NPM1 A sur davantage d'ABL traités.

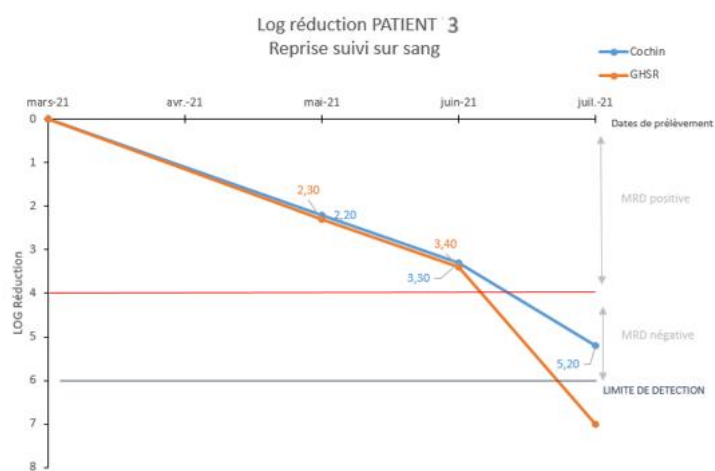
Notre résultat de MRD1 nous interpelle. Les points sont situés de chaque côté d'une réduction de 2log. Dans l'hypothèse d'un prélèvement de MRD2 avec une discordance au seuil décisionnel d'une réduction de 4log, ce résultat pose problème.

Le prélèvement a été repassé deux fois en faisant varier la position sur la plaque de manipulation et l'opérateur. Nous avons également dosé à nouveau le prélèvement du diagnostic pour s'assurer de la justesse de notre quantification initiale, même si nos MRD2 et 3 étaient concordantes. Notre résultat MRD1 n'a pas été modifié.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG (% NPM1 A)	LOG REDUCTION
Diagnostic	515000	103400	498	2.6973	-
Diagnostic repassage	484000	102900	470	2.6724	-
MRD1	1464	54400	2.69	0.4298	2.3
MRD1 repassage 1	1277	62600	2.040	0.3096	2.4
MRD1 repassage 2	1335	66200	2.017	0.3047	2.4

En reprenant la MRD1 de l'hôpital Cochin, nous avons observé un nombre de copies du gène ABL inférieur aux autres prélèvements du suivi (21394 copies d'ABL). Nous avons pris le parti d'envoyer à nouveau du matériel pour un repassage à Paris, dans l'hypothèse d'une qualité de prélèvement altérée. Leur analyse permet le travail sur davantage d'ABL (75333 copies d'ABL) et la log réduction se corrige à 2.2, comparable à celle que nous avons obtenue.

	COPIES NPM1 A	COPIES ABL	% NPM1 A	LOG (% NPM1 A)	LOG REDUCTION
Repassage MRD1 à Cochin	8465	75333	11.237	1.05	2.2



d. Vérification de méthode du kit NPM1 MutA MutaQuant

c.1. Répétabilité

Tableau 13 : Répétabilité

						Moyenne (%)	Ecart-type (%)	CV (%)
Répétabilité 1	2.452	2.295	2.446	2.224	2.276	2.34	0.10	4.45
Répétabilité 2	9.202	9.11	8.519	9.191	9.271	9.06	0.31	3.39

c.2. Reproductibilité

Tableau 14 : Reproductibilité

	1 ^{er} passage	2 nd passage	3 ^{ème} passage	4 ^{ème} passage	5 ^{ème} passage	Moyenne (%)	Ecart- type (%)	CV (%)
CIQ Haut	144.69	142.99	123.53	144.26	137.29	138.55	8.90	6.43
CIQ Intermédiaire	21.18	24.65	19.86	18.79	20.72	21.04	2.21	10.52
CIQ Bas	2.85	2.51	2.41	2.17	2.56	9.06	0.31	3.39

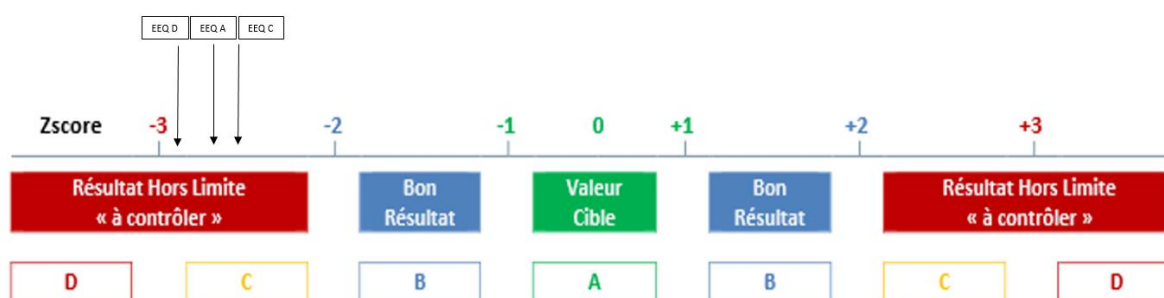
c.3. Exactitude

Tableau 15 : Exactitude.

Echantillons	Valeur cible (%)	Ecart-type (log)	Valeur CHU Sud « Absolute Quantification »
EEQ A	1.368	0.117	0.646
EEQ B	Négatif	Non applicable	Négatif
EEQ C	5.740	0.117	2.85
EEQ D	0.274	0.106	0.135

Calcul du Z-score :

	Z-score
EEQ A	-2.70
EEQ B	-
EEQ C	-2.60
EEQ D	-2.90



Les résultats de nos EEQ sont hors limite, entre -2 et -3 Z-score de la valeur cible (moyenne des 23 laboratoires participants).

c.4. Optimisation de notre technique qPCR

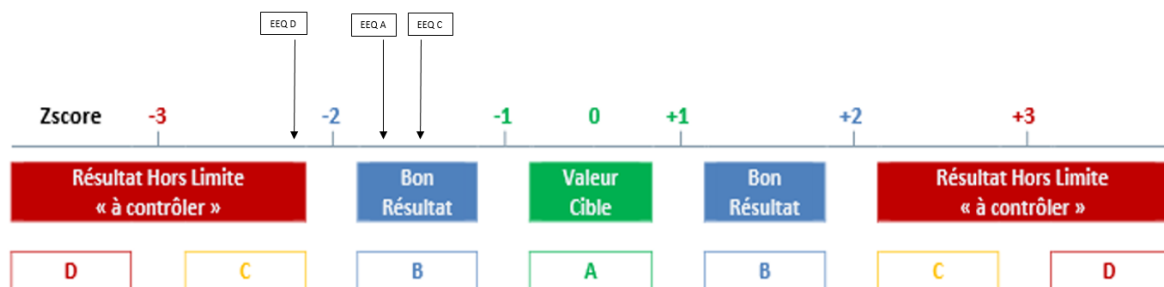
Les résultats de nos EEQ sont hors limite, entre -2 et -3 Z-score de la valeur cible (moyenne des 23 laboratoires participants), nous avons donc tenter 3 approches pour améliorer nos résultats d'EEQ : la modification du threshold, le changement de Taq Polymérase et le changement d'appareil de Q-PCR.

- Modification du threshold

Afin d'opérer une correction, nous avons modifié le mode d'analyse. Le mode « Fit point », recommandé par le fournisseur, permet à l'opérateur de positionner le threshold manuellement pour s'affranchir du bruit de fond. Les résultats des EEQ analysés en mode Fit-point et le nouveau calcul des z-scores sont représentés dans le tableau 16.

Tableau 16 : Analyse des EEQ en fit point.

Echantillons	Valeur cible (%)	Ecart-type (log)	Valeur CHU Sud « Fit point »	Z-score
EEQ A	1.368	0.117	0.858	-1.73
EEQ B	Négatif	Non applicable	Négatif	-
EEQ C	5.740	0.117	3.845	-1.49
EEQ D	0.274	0.106	0.159	-2.24



- Changement de Taq polymérase

Nous avons passé les EEQ en utilisant une autre enzyme ADN Taq polymérase : Roche PCR master Mix 5x.

- Changement d'appareil de qPCR

Nous avons à disposition au laboratoire un deuxième appareil LightCycler® 480.

Aucune de ces modifications n'a amélioré nos résultats.

Discussion

L'évaluation de la maladie résiduelle (MRD) est d'importance majeure dans le suivi des patients LAM NPM1. La quantification de la mutation NPM1 est un marqueur sensible et spécifique. La MRD2 dans le sang est décisionnelle pour l'attitude thérapeutique d'afin d'identifier les candidats à l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Le suivi sanguin de la mutation NPM1 des patients en rémission complète est un marqueur précoce permettant d'anticiper la rechute cytologique.

Le premier objectif de ce travail était d'évaluer les paramètres analytiques de la RT-qPCR pour la quantification de la mutation NPM1 type A à partir d'ADN complémentaire. Nous avons suivi les recommandations du fournisseur QIAGEN ainsi que les recommandations des publications

internationales. Nos manipulations ont validé ces critères, confirmant ainsi que la méthode a été correctement mise en place sur nos appareils de qPCR.

Le deuxième objectif de ce travail était de reprendre les cinétiques moléculaires, à travers trois patients suivis au CHU Sud, et de réaliser comparaison avec le centre de référence, l'hôpital Cochin à Paris. Un biais de ce travail est que nous connaissons le suivi des patients, ainsi les résultats discordants ont été investigués pour les expliquer. Ainsi un prélèvement du suivi du PATIENT 2 a été analysé une seconde fois afin de concorder avec les résultats de Cochin. A l'inverse, la MRD1 du PATIENT 3 a été renvoyée à l'hôpital Cochin afin de corriger une erreur aléatoire. Les prélèvements décisionnels de MRD2 et les rechutes moléculaires sont comparables. Le suivi du PATIENT 3 nous questionne sur la sensibilité de la technique utilisée : l'hôpital Cochin, en MRD3, a réussi à analyser davantage de copies d'ABL et trouver des mutations de NPM1 A. Ceci ne change pas le statut de la MRD, qui est négative selon les critères du protocole BIG, mais justifiera d'explorer cette légère baisse de sensibilité de notre technique.

Le troisième objectif de ce travail était d'évaluer les performances du kit commercial afin de garantir la qualité de nos résultats. Les tests préliminaires réalisés pourront servir au futur dossier de validation de méthode en vue d'une future accréditation. Nos données indiquent une bonne fidélité du kit NPM1 MutA MutaQuant pour la quantification des transcrits NPM1 A au laboratoire du CHU Sud, évaluée par la répétabilité et la reproductibilité. L'évaluation de l'exactitude, par l'intermédiaire des Evaluations Externes de Qualité (EEQ) organisés par le Groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (GBMHM) auxquelles participent 23 laboratoires en France, montre des résultats discordants avec nos confrères (groupe de pairs). Les modifications et tentatives d'optimisation de la qPCR (changement d'enzyme, utilisation d'un autre LightCycler, changement du mode d'analyse des données) n'ont pas montré d'amélioration. L'explication la plus probable concernerait l'étape en amont de la qPCR, la rétrotranscription. C'est donc sur le choix de l'enzyme utilisée (rétrotranscriptase) pour synthétiser les ADNc à partir de l'ARN, que les investigations doivent se porter. En effet, à partir des ADNc générés dans notre laboratoire, les résultats de quantifications réalisées au CHU Sud Réunion et à Cochin sont concordants. La technique de qPCR en elle-même ne semble pas la cause de non-conformité des EEQ. Une solution alternative que nous pouvons proposer pour pallier à cette différence est l'application d'un facteur de correction, qui existe dans la quantification d'autres marqueurs moléculaire. Ces deux approches feront l'objet d'une étude ultérieure.

Ce travail a permis de confirmer la faisabilité de cet examen au CHU de La Réunion. Les résultats des patients testés sont comparables à notre centre de référence, l'hôpital Cochin à Paris. Les tests préliminaires réalisés pour évaluer les performances du kit constituent un début pour répondre aux exigences de la norme ISO 15189 en vue d'une future accréditation par le COFRAC (Comité Français d'accréditation). L'appareil de qPCR et les réactifs du kit commercial n'étant pas étiqueté « CE-IVD », une validation de méthode en portée B sera nécessaire pour évaluer l'ensemble des performances et des limites du kit utilisé dans les conditions de travail de notre laboratoire et assurer ainsi la qualité des résultats rendus.

CONCLUSION

Les LAM NPM1 mutée sont une entité distincte dans la classification OMS 2016 et font partie des groupes de risque favorable et intermédiaire selon le statut FLT3-ITD dans la classification ELN 2017. Elles constituent plus de la moitié des LAM à caryotype normal soit 30% des LAM. La mutation NPM1 de type A concerne 85% des LAM NPM1 mutée. Ainsi la quantification de la mutation NPM1 A constitue un marqueur d'importance majeure pour l'évaluation de la MRD dans le suivi des patients avec LAM NPM1 muté. Il a été démontré que le taux de mutation NPM1 était le facteur pronostic le plus « puissant » et la MRD2 est décisionnelle pour l'attitude thérapeutique notamment pour la décision d'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques. La technique de RT-qPCR constitue le gold standard pour la quantification de la mutation NPM1.

Actuellement les quantifications NPM1 des patients du CHU de La Réunion sont envoyées en métropole à l'hôpital Cochin. Les LAM NPM1 muté représente 15% des LAM au CHU de La Réunion. La quantification de la mutation NPM1 constitue une part importante d'activité pour le laboratoire de biologie moléculaire. L'objectif de ce travail était de mettre en place la technique sur l'île permettant ainsi de s'affranchir des envois en métropole et de bénéficier d'un délai de rendu de résultat plus rapide. Nous avons choisi de tester le kit Isogen® MutaQuant NPM1 mut A qui utilise des sondes TaqMan sur l'appareil de qPCR disponible au laboratoire, le LightCycler 480 Roche. L'objectif de ce travail était d'évaluer la faisabilité de cette analyse dans notre laboratoire en testant quelques patients sélectionnés et en faisant une comparaison avec notre centre de référence (l'hôpital Cochin, Paris) qui réalise l'analyse actuellement. D'autre part nous avons évalué les performances analytiques du kit. Ces données nous permettront d'établir le futur dossier de validation de méthode en vue d'une demande d'accréditation de cette analyse par le COFRAC. Les tests analytiques réalisés ont montré une bonne répétabilité et reproductibilité. Les tests de comparaison avec l'hôpital ont montré globalement des résultats satisfaisants. Par contre, les résultats des EEQ n'étaient pas conformes aux cibles attendues alors que les CQI étaient conformes. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'investiguer cette non-conformité des EEQ.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES :

1. Short NJ, Rytting ME, Cortes JE. Acute myeloid leukaemia. *Lancet Lond Engl.* 18 août 2018;392(10147):593-606.
2. Le Guyader-Peyrou Sandra, Defossez Gautier, Dantony Emmanuelle, Mounier Morgane, Cornet Edouard, Uhry Zoé, Cowppli-Bony Anne, Maynadié Marc, Troussard Xavier, Delafosse Patricia, Grosclaude Pascale, Colonna Marc, Woronoff Anne-Sophie, Remontet Laurent, Bossard Nadine, Monnereau Alain. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018 - Hémopathies malignes : Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim [Internet]. [cité 16 août 2021]. Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr/import/estimations-nationales-de-l-incidence-et-de-la-mortalite-par-cancer-en-france-metropolitaine-entre-1990-et-2018-hemopathies-malignes-etude-a-pa>
3. Deschler B, Lübbert M. Acute myeloid leukemia: epidemiology and etiology. *Cancer.* 1 nov 2006;107(9):2099-107.
4. Wognum AW. Hematopoietic Stem and Progenitor Cells. :10.
5. Eaves CJ. Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood.* 23 avr 2015;125(17):2605-13.
6. Haas S, Trumpp A, Milsom MD. Causes and Consequences of Hematopoietic Stem Cell Heterogeneity. *Cell Stem Cell.* 3 mai 2018;22(5):627-38.
7. Gilliland DG, Griffin JD. The roles of FLT3 in hematopoiesis and leukemia. *Blood.* 1 sept 2002;100(5):1532-42.
8. Grove CS, Vassiliou GS. Acute myeloid leukaemia: a paradigm for the clonal evolution of cancer? *Dis Model Mech.* août 2014;7(8):941-51.
9. Gruszka AM, Valli D, Alcalay M. Understanding the molecular basis of acute myeloid leukemias: where are we now? *Int J Hematol Oncol.* nov 2017;6(2):43-53.
10. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* août 1976;33(4):451-8.
11. Vardiman JW, Thiele J, Arber DA, Brunning RD, Borowitz MJ, Porwit A, et al. The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood.* 30 juill 2009;114(5):937-51.
12. Arber DA, Orazi A, Hasserjian R, Thiele J, Borowitz MJ, Le Beau MM, et al. The 2016 revision to the World Health Organization classification of myeloid neoplasms and acute leukemia. *Blood.* 19 mai 2016;127(20):2391-405.
13. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood.* 22 juill 2010;116(3):354-65.
14. Grimwade D, Ivey A, Huntly BJP. Molecular landscape of acute myeloid leukemia in younger adults and its clinical relevance. *Blood.* 7 janv 2016;127(1):29-41.

15. Burnett AK, Goldstone A, Hills RK, Milligan D, Prentice A, Yin J, et al. Curability of Patients With Acute Myeloid Leukemia Who Did Not Undergo Transplantation in First Remission. *J Clin Oncol.* 1 avr 2013;31(10):1293-301.
16. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for “prime time”? *Blood.* 27 nov 2014;124(23):3345-55.
17. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood.* 26 janv 2017;129(4):424-47.
18. Schuurhuis GJ, Heuser M, Freeman S, Béné M-C, Buccisano F, Cloos J, et al. Minimal/measurable residual disease in AML: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood.* 22 mars 2018;131(12):1275-91.
19. Vergez F, Green AS, Tamburini J, Sarry J-E, Gaillard B, Cornillet-Lefebvre P, et al. High levels of CD34+CD38low/-CD123+ blasts are predictive of an adverse outcome in acute myeloid leukemia: a Groupe Ouest-Est des Leucémies Aigues et Maladies du Sang (GOELAMS) study. *Haematologica.* déc 2011;96(12):1792-8.
20. Zeijlemaker W, Grob T, Meijer R, Hanekamp D, Kelder A, Carbaat-Ham JC, et al. CD34+CD38- leukemic stem cell frequency to predict outcome in acute myeloid leukemia. *Leukemia.* mai 2019;33(5):1102-12.
21. Ravandi F, Walter RB, Freeman SD. Evaluating measurable residual disease in acute myeloid leukemia. *Blood Adv.* 12 juin 2018;2(11):1356-66.
22. Jongen-Lavrencic M, Grob T, Hanekamp D, Kavelaars FG, Al Hinai A, Zeilemaker A, et al. Molecular Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med.* 29 mars 2018;378(13):1189-99.
23. Salk JJ, Schmitt MW, Loeb LA. Enhancing the accuracy of next-generation sequencing for detecting rare and subclonal mutations. *Nat Rev Genet.* mai 2018;19(5):269-85.
24. DiNardo CD, Propert KJ, Loren AW, Paietta E, Sun Z, Levine RL, et al. Serum 2-hydroxyglutarate levels predict isocitrate dehydrogenase mutations and clinical outcome in acute myeloid leukemia. *Blood.* 13 juin 2013;121(24):4917-24.
25. Orrick LR, Olson MO, Busch H. Comparison of nucleolar proteins of normal rat liver and Novikoff hepatoma ascites cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* mai 1973;70(5):1316-20.
26. Box JK, Paquet N, Adams MN, Boucher D, Bolderson E, O'Byrne KJ, et al. Nucleophosmin: from structure and function to disease development. *BMC Mol Biol.* déc 2016;17(1):19.
27. Umekawa H, Chang JH, Correia JJ, Wang D, Wingfield PT, Olson MO. Nucleolar protein B23: bacterial expression, purification, oligomerization and secondary structures of two isoforms. *Cell Mol Biol Res.* 1993;39(7):635-45.
28. Lee HH, Kim HS, Kang JY, Lee BI, Ha JY, Yoon HJ, et al. Crystal structure of human nucleophosmin-core reveals plasticity of the pentamer-pentamer interface. *Proteins.* 15 nov 2007;69(3):672-8.

29. Mitrea DM, Grace CR, Buljan M, Yun M-K, Pytel NJ, Satumba J, et al. Structural polymorphism in the N-terminal oligomerization domain of NPM1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 25 mars 2014;111(12):4466-71.
30. Hingorani K, Szebeni A, Olson MO. Mapping the functional domains of nucleolar protein B23. *J Biol Chem*. 11 août 2000;275(32):24451-7.
31. Yip SP, Siu PM, Leung PHM, Zhao Y, Yung BYM. The Multifunctional Nucleolar Protein Nucleophosmin/NPM/B23 and the Nucleoplasmin Family of Proteins. *The Nucleolus*. 23 mai 2011;15:213-52.
32. Mélése T, Xue Z. The nucleolus: an organelle formed by the act of building a ribosome. *Curr Opin Cell Biol*. juin 1995;7(3):319-24.
33. Tsekrekou M, Stratigi K, Chatzinikolaou G. The Nucleolus: In Genome Maintenance and Repair. *Int J Mol Sci*. 1 juill 2017;18(7):E1411.
34. Boulon S, Westman BJ, Hutten S, Boisvert F-M, Lamond AI. The nucleolus under stress. *Mol Cell*. 22 oct 2010;40(2):216-27.
35. Szebeni A, Olson MO. Nucleolar protein B23 has molecular chaperone activities. *Protein Sci Publ Protein Soc*. avr 1999;8(4):905-12.
36. Welch WJ, Feramisco JR. Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock protein in heat-shocked mammalian cells. *J Biol Chem*. 10 avr 1984;259(7):4501-13.
37. Okuwaki M, Matsumoto K, Tsujimoto M, Nagata K. Function of nucleophosmin/B23, a nucleolar acidic protein, as a histone chaperone. *FEBS Lett*. 12 oct 2001;506(3):272-6.
38. Herrera JE, Savkur R, Olson MO. The ribonuclease activity of nucleolar protein B23. *Nucleic Acids Res*. 11 oct 1995;23(19):3974-9.
39. Yu Y, Maggi LB, Brady SN, Apicelli AJ, Dai M-S, Lu H, et al. Nucleophosmin is essential for ribosomal protein L5 nuclear export. *Mol Cell Biol*. mai 2006;26(10):3798-809.
40. Vermeulen K, Berneman ZN, Van Bockstaele DR. Cell cycle and apoptosis. *Cell Prolif*. juin 2003;36(3):165-75.
41. Okuda M. The role of nucleophosmin in centrosome duplication. *Oncogene*. 9 sept 2002;21(40):6170-4.
42. Tokuyama Y, Horn HF, Kawamura K, Tarapore P, Fukasawa K. Specific phosphorylation of nucleophosmin on Thr(199) by cyclin-dependent kinase 2-cyclin E and its role in centrosome duplication. *J Biol Chem*. 15 juin 2001;276(24):21529-37.
43. Hernandez-Verdun D, Gautier T. The chromosome periphery during mitosis. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol*. mars 1994;16(3):179-85.
44. Zhang H, Shi X, Paddon H, Hampong M, Dai W, Pelech S. B23/nucleophosmin serine 4 phosphorylation mediates mitotic functions of polo-like kinase 1. *J Biol Chem*. 20 août 2004;279(34):35726-34.
45. Grisendi S, Mecucci C, Falini B, Pandolfi PP. Nucleophosmin and cancer. *Nat Rev Cancer*. juill 2006;6(7):493-505.

46. Colombo E, Bonetti P, Lazzerini Denchi E, Martinelli P, Zamponi R, Marine J-C, et al. Nucleophosmin is required for DNA integrity and p19Arf protein stability. *Mol Cell Biol.* oct 2005;25(20):8874-86.
47. Koike A, Nishikawa H, Wu W, Okada Y, Venkitaraman AR, Ohta T. Recruitment of phosphorylated NPM1 to sites of DNA damage through RNF8-dependent ubiquitin conjugates. *Cancer Res.* 1 sept 2010;70(17):6746-56.
48. Poletto M, Lirussi L, Wilson DM, Tell G. Nucleophosmin modulates stability, activity, and nucleolar accumulation of base excision repair proteins. *Mol Biol Cell.* mai 2014;25(10):1641-52.
49. Vascotto C, Lirussi L, Poletto M, Tiribelli M, Damiani D, Fabbro D, et al. Functional regulation of the apurinic/apyrimidinic endonuclease 1 by nucleophosmin: impact on tumor biology. *Oncogene.* 29 mai 2014;33(22):2876-87.
50. Lin CY, Tan BC-M, Liu H, Shih C-J, Chien K-Y, Lin C-L, et al. Dephosphorylation of nucleophosmin by PP1 β facilitates pRB binding and consequent E2F1-dependent DNA repair. *Mol Biol Cell.* déc 2010;21(24):4409-17.
51. Ziv O, Zeisel A, Mirlas-Neisberg N, Swain U, Nevo R, Ben-Chetrit N, et al. Identification of novel DNA-damage tolerance genes reveals regulation of translesion DNA synthesis by nucleophosmin. *Nat Commun.* 25 nov 2014;5:5437.
52. Luchinat E, Chiarella S, Franceschini M, Di Matteo A, Brunori M, Banci L, et al. Identification of a novel nucleophosmin-interaction motif in the tumor suppressor p14arf. *FEBS J.* mars 2018;285(5):832-47.
53. Sugimoto M, Kuo M-L, Roussel MF, Sherr CJ. Nucleolar Arf tumor suppressor inhibits ribosomal RNA processing. *Mol Cell.* févr 2003;11(2):415-24.
54. Lessard F, Morin F, Ivanchuk S, Langlois F, Stefanovsky V, Rutka J, et al. The ARF tumor suppressor controls ribosome biogenesis by regulating the RNA polymerase I transcription factor TTF-I. *Mol Cell.* 28 mai 2010;38(4):539-50.
55. Rubbi CP, Milner J. p53--guardian of a genome's guardian? *Cell Cycle Georget Tex.* févr 2003;2(1):20-1.
56. Freed-Pastor WA, Prives C. Mutant p53: one name, many proteins. *Genes Dev.* 15 juin 2012;26(12):1268-86.
57. Okuwaki M, Tsujimoto M, Nagata K. The RNA binding activity of a ribosome biogenesis factor, nucleophosmin/B23, is modulated by phosphorylation with a cell cycle-dependent kinase and by association with its subtype. *Mol Biol Cell.* juin 2002;13(6):2016-30.
58. Szebeni A, Hingorani K, Negi S, Olson MOJ. Role of protein kinase CK2 phosphorylation in the molecular chaperone activity of nucleolar protein b23. *J Biol Chem.* 14 mars 2003;278(11):9107-15.
59. Swaminathan V, Kishore AH, Febitha KK, Kundu TK. Human histone chaperone nucleophosmin enhances acetylation-dependent chromatin transcription. *Mol Cell Biol.* sept 2005;25(17):7534-45.

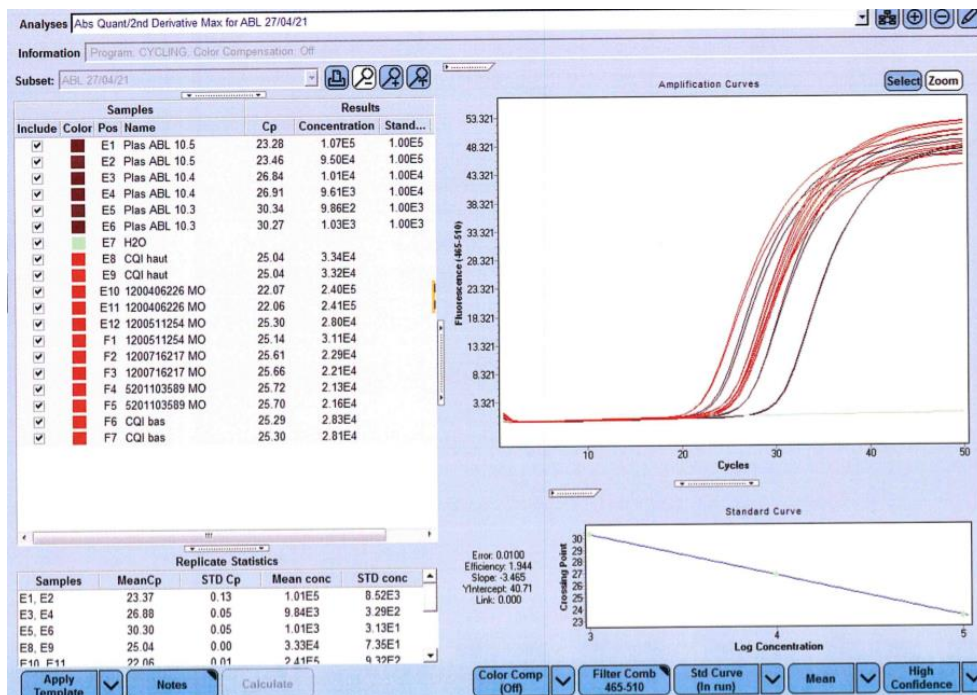
60. Shandilya J, Swaminathan V, Gadad SS, Choudhari R, Kodaganur GS, Kundu TK. Acetylated NPM1 localizes in the nucleoplasm and regulates transcriptional activation of genes implicated in oral cancer manifestation. *Mol Cell Biol.* sept 2009;29(18):5115-27.
61. Itahana K, Bhat KP, Jin A, Itahana Y, Hawke D, Kobayashi R, et al. Tumor suppressor ARF degrades B23, a nucleolar protein involved in ribosome biogenesis and cell proliferation. *Mol Cell.* nov 2003;12(5):1151-64.
62. Sato K, Hayami R, Wu W, Nishikawa T, Nishikawa H, Okuda Y, et al. Nucleophosmin/B23 is a candidate substrate for the BRCA1-BARD1 ubiquitin ligase. *J Biol Chem.* 23 juill 2004;279(30):30919-22.
63. Endo A, Matsumoto M, Inada T, Yamamoto A, Nakayama KI, Kitamura N, et al. Nucleolar structure and function are regulated by the deubiquitylating enzyme USP36. *J Cell Sci.* 1 mars 2009;122(Pt 5):678-86.
64. Liu X, Liu Z, Jang S-W, Ma Z, Shinmura K, Kang S, et al. Sumoylation of nucleophosmin/B23 regulates its subcellular localization, mediating cell proliferation and survival. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 5 juin 2007;104(23):9679-84.
65. Neo SH, Itahana Y, Alagu J, Kitagawa M, Guo AK, Lee SH, et al. TRIM28 Is an E3 Ligase for ARF-Mediated NPM1/B23 SUMOylation That Represses Centrosome Amplification. *Mol Cell Biol.* août 2015;35(16):2851-63.
66. Haindl M, Harasim T, Eick D, Muller S. The nucleolar SUMO-specific protease SENP3 reverses SUMO modification of nucleophosmin and is required for rRNA processing. *EMBO Rep.* mars 2008;9(3):273-9.
67. Falini B, Mecucci C, Tiacci E, Alcalay M, Rosati R, Pasqualucci L, et al. Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med.* 20 janv 2005;352(3):254-66.
68. 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.* oct 2002;66(10):2239-42.
69. Federici L, Falini B. Nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia: a tale of protein unfolding and mislocalization. *Protein Sci Publ Protein Soc.* mai 2013;22(5):545-56.
70. Falini B, Nicoletti I, Bolli N, Martelli MP, Liso A, Gorello P, et al. Translocations and mutations involving the nucleophosmin (NPM1) gene in lymphomas and leukemias. *Haematologica.* avr 2007;92(4):519-32.
71. Grummitt CG, Townsley FM, Johnson CM, Warren AJ, Bycroft M. Structural consequences of nucleophosmin mutations in acute myeloid leukemia. *J Biol Chem.* 22 août 2008;283(34):23326-32.
72. Arregi I, Falces J, Olazabal-Herrero A, Alonso-Mariño M, Taneva SG, Rodríguez JA, et al. Leukemia-Associated Mutations in Nucleophosmin Alter Recognition by CRM1: Molecular Basis of Aberrant Transport. *PLoS One.* 2015;10(6):e0130610.
73. Falini B, Martelli MP, Bolli N, Bonasso R, Ghia E, Pallotta MT, et al. Immunohistochemistry predicts nucleophosmin (NPM) mutations in acute myeloid leukemia. *Blood.* 15 sept 2006;108(6):1999-2005.

74. A dose-dependent tug of war involving the NPM1 leukaemic mutant, nucleophosmin, and ARF - PubMed [Internet]. [cité 19 août 2021]. Disponible sur: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19005479/>
75. Sportoletti P, Grisendi S, Majid SM, Cheng K, Clohessy JG, Viale A, et al. Npm1 is a haploinsufficient suppressor of myeloid and lymphoid malignancies in the mouse. *Blood*. 1 avr 2008;111(7):3859-62.
76. Bertwistle D, Sugimoto M, Sherr CJ. Physical and functional interactions of the Arf tumor suppressor protein with nucleophosmin/B23. *Mol Cell Biol*. févr 2004;24(3):985-96.
77. Colombo E, Martinelli P, Zamponi R, Shing DC, Bonetti P, Luzi L, et al. Delocalization and destabilization of the Arf tumor suppressor by the leukemia-associated NPM mutant. *Cancer Res*. 15 mars 2006;66(6):3044-50.
78. Hoffman B, Amanullah A, Shafarenko M, Liebermann DA. The proto-oncogene c-myc in hematopoietic development and leukemogenesis. *Oncogene*. 13 mai 2002;21(21):3414-21.
79. Luo H, Li Q, O'Neal J, Kreisel F, Le Beau MM, Tomasson MH. c-Myc rapidly induces acute myeloid leukemia in mice without evidence of lymphoma-associated antiapoptotic mutations. *Blood*. 1 oct 2005;106(7):2452-61.
80. Bonetti P, Davoli T, Sironi C, Amati B, Pelicci PG, Colombo E. Nucleophosmin and its AML-associated mutant regulate c-Myc turnover through Fbw7 gamma. *J Cell Biol*. 14 juill 2008;182(1):19-26.
81. Leong SM, Tan BX, Bte Ahmad B, Yan T, Chee LY, Ang ST, et al. Mutant nucleophosmin deregulates cell death and myeloid differentiation through excessive caspase-6 and -8 inhibition. *Blood*. 28 oct 2010;116(17):3286-96.
82. Alcalay M, Tiacci E, Bergomas R, Bigerna B, Venturini E, Minardi SP, 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*. 1 août 2005;106(3):899-902.
83. Fujino T, Yamazaki Y, Largaespada DA, Jenkins NA, Copeland NG, Hirokawa K, et al. Inhibition of myeloid differentiation by Hoxa9, Hoxb8, and Meis homeobox genes. *Exp Hematol*. juill 2001;29(7):856-63.
84. Brunetti L, Gundry MC, Sorcini D, Guzman AG, Huang Y-H, Ramabadran R, et al. Mutant NPM1 Maintains the Leukemic State through HOX Expression. *Cancer Cell*. 10 sept 2018;34(3):499-512.e9.
85. Mallardo M, Caronno A, Pruneri G, Raviele PR, Viale A, Pelicci PG, et al. NPMc+ and FLT3_ITD mutations cooperate in inducing acute leukaemia in a novel mouse model. *Leukemia*. nov 2013;27(11):2248-51.
86. Mupo A, Celani L, Dovey O, Cooper JL, Grove C, Rad R, et al. A powerful molecular synergy between mutant Nucleophosmin and Flt3-ITD drives acute myeloid leukemia in mice. *Leukemia*. sept 2013;27(9):1917-20.
87. Patel JL, Schumacher JA, Frizzell K, Sorrells S, Shen W, Clayton A, et al. Coexisting and cooperating mutations in NPM1-mutated acute myeloid leukemia. *Leuk Res*. 1 mai 2017;56:7-12.

88. 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 | Elsevier Enhanced Reader [Internet]. [cité 19 août 2021]. Disponible sur: <https://reader.elsevier.com/reader/sd/pii/S0006497120515589?token=098178421EF0913A86D460093600C3ABEF41E2538062D4B3A79BC8674DE03F82382BDC37C25E028C2AD9B68B16259A52&originRegion=eu-west-1&originCreation=20210819143250>
89. Krönke J, Schlenk RF, Jensen K-O, Tschürtz F, Corbacioglu A, Gaidzik VI, et al. Monitoring of minimal residual disease in NPM1-mutated acute myeloid leukemia: a study from the German-Austrian acute myeloid leukemia study group. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol*. 1 juill 2011;29(19):2709-16.
90. Döhner K, Schlenk RF, Habdank M, Scholl C, Rücker FG, Corbacioglu A, et al. Mutant nucleophosmin (NPM1) predicts favorable prognosis in younger adults with acute myeloid leukemia and normal cytogenetics: interaction with other gene mutations. *Blood*. 1 déc 2005;106(12):3740-6.
91. Chen W, Rassidakis GZ, Li J, Routbort M, Jones D, Kantarjian H, et al. High frequency of NPM1 gene mutations in acute myeloid leukemia with prominent nuclear invaginations (« cuplike » nuclei). *Blood*. 1 sept 2006;108(5):1783-4.
92. Schnittger S, Schoch C, Kern W, Mecucci C, Tschulik C, Martelli MF, et al. Nucleophosmin gene mutations are predictors of favorable prognosis in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *Blood*. 1 déc 2005;106(12):3733-9.
93. Thiede C, Koch S, Creutzig E, Steudel C, Illmer T, Schaich M, et al. Prevalence and prognostic impact of NPM1 mutations in 1485 adult patients with acute myeloid leukemia (AML). *Blood*. 15 mai 2006;107(10):4011-20.
94. Qi W, Shakalya K, Stejskal A, Goldman A, Beeck S, Cooke L, et al. NSC348884, a nucleophosmin inhibitor disrupts oligomer formation and induces apoptosis in human cancer cells. *Oncogene*. 10 juill 2008;27(30):4210-20.
95. Sekhar KR, Benamar M, Venkateswaran A, Sasi S, Penthala NR, Crooks PA, et al. Targeting nucleophosmin 1 represents a rational strategy for radiation sensitization. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1 août 2014;89(5):1106-14.
96. Parikh K, Cang S, Sekhri A, Liu D. Selective inhibitors of nuclear export (SINE)--a novel class of anti-cancer agents. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol*. 15 oct 2014;7:78.
97. El Hajj H, Dassouki Z, Berthier C, Raffoux E, Ades L, Legrand O, et al. Retinoic acid and arsenic trioxide trigger degradation of mutated NPM1, resulting in apoptosis of AML cells. *Blood*. 28 mai 2015;125(22):3447-54.
98. Falini B, Nicoletti I, Martelli MF, Mecucci C. Acute myeloid leukemia carrying cytoplasmic/mutated nucleophosmin (NPMc+ AML): biologic and clinical features. *Blood*. 1 févr 2007;109(3):874-85.
99. Beillard E, Pallisgaard N, van der Velden VHJ, Bi W, Dee R, van der Schoot E, et al. Evaluation of candidate control genes for diagnosis and residual disease detection in leukemic patients using « real-time » quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RQ-PCR) - a Europe against cancer program. *Leukemia*. déc 2003;17(12):2474-86.

100. Gabert J, Beillard E, van der Velden VHJ, Bi W, Grimwade D, Pallisgaard N, et al. Standardization and quality control studies of « real-time » quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction of fusion gene transcripts for residual disease detection in leukemia - a Europe Against Cancer program. *Leukemia*. déc 2003;17(12):2318-57.

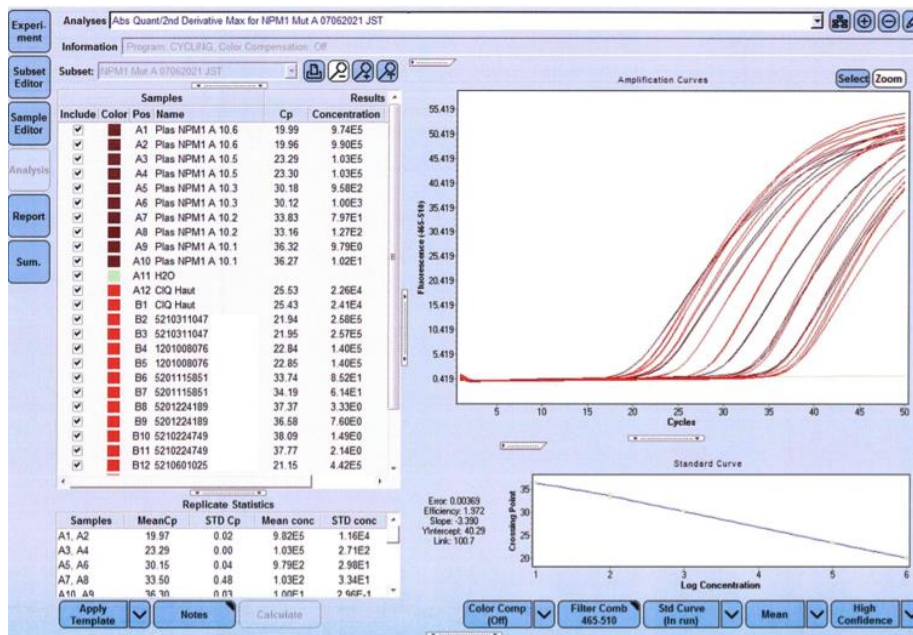
Annexe 2 : Cinétique médullaire PATIENT 1 du diagnostic à la fin de traitement. En haut : copies de NPM1 A. En bas : copies d'ABL.



Validation technique de la manipulation :

- Les courbes de fluorescence des plasmides NPM1 A et ABL sont exponentielles.
- Pente comprise entre -3.0 et -3.9 (-3.372 pour NPM1 A et -3.465 pour ABL) et efficacité entre 1.93 et 2.08 ((1.980 pour NPM1 A, 1.944 pour ABL).
- Les plasmides NPM1 et ABL et le patient, en duplicate, sont reproductibles (< 1 Cp de différence)
- Absence d'amplification de l'eau
-

Annexe 3 : Cinétique sanguine PATIENT 2 du diagnostic à la rechute. En haut : copies de NPM1 A. En bas : copies d'ABL.

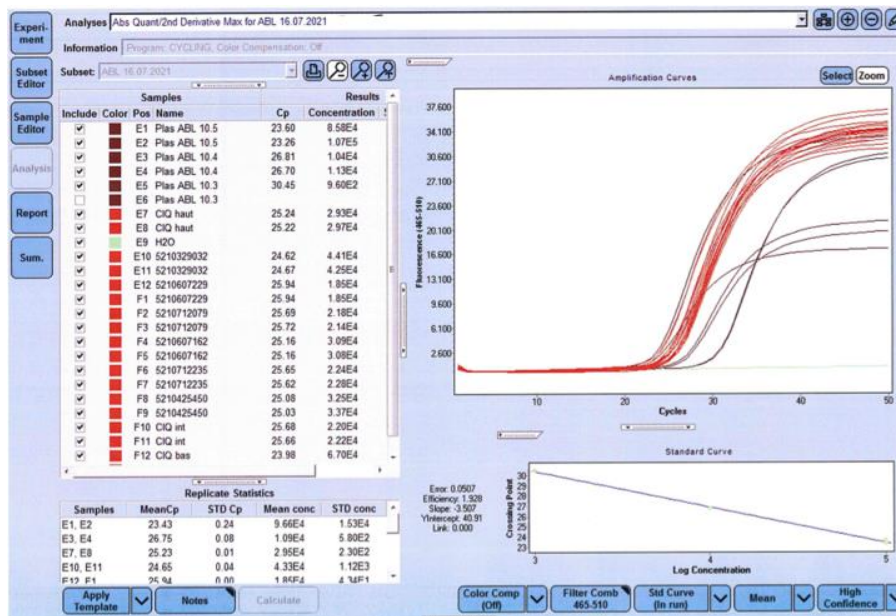


Validation technique de la manipulation :

- Les courbes de fluorescence des plasmides NPM1 A et ABL sont exponentielles.

- Pente comprise entre -3.0 et -3.9 (-3.390 pour NPM1 A et -3.450 pour ABL) et efficacité entre 1.93 et 2.08 ((1.972 pour NPM1 A, 1.949 pour ABL).
- Les plasmides NPM1 et ABL et le patient, en duplicate, sont reproductibles (< 1 Cp de différence)
- Absence d'amplification de l'eau

Annexe 4 : Cinétique sanguine et médullaire PATIENT 3 du diagnostic à MRD3. En haut : copies de NPM1 A. En bas : copies d'ABL.



Validation technique de la manipulation :

- Les courbes de fluorescence des plasmides NPM1 A et ABL sont exponentielles.
- Pente comprise entre -3.0 et -3.9 (-3.318 pour NPM1 A et -3.507 pour ABL) et efficacité entre 1.93 et 2.08 ((2.002 pour NPM1 A, 1.928 pour ABL).

- Les plasmides NPM1 et ABL et le patient, en duplicate, sont reproductibles (< 1 Cp de différence)
- Absence d'amplification de l'eau

“ Au moment d’être admis(e) à exercer la médecine, je promets et je jure d’être fidèle aux lois de l’honneur et de la probité.

Mon premier souci sera de rétablir, de préserver ou de promouvoir la santé dans tous ses éléments, physiques et mentaux, individuels et sociaux.

Je respecterai toutes les personnes, leur autonomie et leur volonté, sans aucune discrimination selon leur état ou leurs convictions. J’interviendrai pour les protéger si elles sont affaiblies, vulnérables ou menacées dans leur intégrité ou leur dignité. Même sous la contrainte, je ne ferai pas usage de mes connaissances contre les lois de l’humanité.

J’informerai les patients des décisions envisagées, de leurs raisons et de leurs conséquences.

Je ne tromperai jamais leur confiance et n’exploiterai pas le pouvoir hérité des circonstances pour forcer les consciences.

Je donnerai mes soins à l’indigent et à quiconque me les demandera. Je ne me laisserai pas influencer par la soif du gain ou la recherche de la gloire.

Admis(e) dans l’intimité des personnes, je tairai les secrets qui me seront confiés. Reçu(e) à l’intérieur des maisons, je respecterai les secrets des foyers et ma conduite ne servira pas à corrompre les mœurs.

Je ferai tout pour soulager les souffrances. Je ne prolongerai pas abusivement les agonies. Je ne provoquerai jamais la mort délibérément.

Je préserverai l’indépendance nécessaire à l’accomplissement de ma mission. Je n’entreprendrai rien qui dépasse mes compétences. Je les entretiendrai et les perfectionnerai pour assurer au mieux les services qui me seront demandés.

J’apporterai mon aide à mes confrères ainsi qu’à leurs familles dans l’adversité.

Que les hommes et mes confrères m’accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses; que je sois déshonoré(e) et méprisé(e) si j’y manque. ”



www.conseil-national.medecin.fr

MISE EN PLACE DE LA QUANTIFICATION DE LA MUTATION NPM1 DE TYPE A AU CHU DE LA REUNION. EVALUATION DU KIT IPSOGEN® NPM1 MUTA MUTAQUANT.

Résumé

Introduction : La mutation du gène NPM1 (Nucleoplasmine) représente l'une des mutations acquises les plus fréquemment observées dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) (30%), en particulier au sein des LAM à caryotype normal. Parmi les nombreux types de mutants NPM1, la mutation de type A est la plus fréquente et représente 80% des mutants.

La mise à jour 2016 de la classification OMS des hémopathies malignes en a fait une entité à part entière, classée parmi les LAM avec anomalies génétiques récurrentes, de par ses caractéristiques cliniques, biologiques et pronostiques.

La quantification de la mutation NPM1 constitue une cible moléculaire robuste pour la MRD (Measurable Residual Disease), outil désormais indispensable pour guider l'attitude thérapeutique et détecter précocement les rechutes au cours du suivi. La technique de référence pour la quantification des mutations NPM1 est la RT-qPCR sur ADN complémentaire.

Au CHU sud Réunion, parmi les cent trente-trois LAM diagnostiquées entre janvier 2015 et juillet 2020, vingt sont des LAM NPM1 (15%) et dix-sept sont des mutations NPM1 de type A (85%). La quantification des LAM NPM1 de type A, actuellement externalisé en métropole à l'hôpital Cochin à Paris, représente une activité significative. Ceci justifie sa mise en place à La Réunion, et permettrait ainsi d'obtenir des délais de rendu de résultats plus courts et optimiser le suivi des patients.

Méthode : ce travail évalue la faisabilité de la mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type A au CHU de La Réunion par l'utilisation du kit Ipsogen® NPM1 MutA MutaQuant (QIAGEN) sur l'appareil de qPCR du laboratoire (LightCycler® 480 de Roche Diagnostics). Trois axes de travail ont été menés : la validation analytique de la RT-qPCR, la reprise du suivi moléculaire de trois patients pour comparaison avec notre centre de référence et l'évaluation des performances du kit commercial dans les conditions de travail de notre laboratoire de biologie moléculaire.

Résultats : Nos manipulations ont validé les critères de validation analytique de la RT-qPCR. Le suivi moléculaire des trois patients est concordant avec les données de notre centre de référence. L'évaluation de l'exactitude, par l'intermédiaire des Evaluations Externes de Qualité (EEQ) auxquelles participent 23 laboratoires en France, montre des résultats discordants avec le groupe de pairs.

Conclusion : La mise en place de la quantification de la mutation NPM1 de type A par le kit NPM1 MutA Mutaquant d'Ipsogen est faisable au CHU Sud Réunion dans les conditions actuelles. Cependant, des études supplémentaires sont nécessaires pour expliquer la non-conformité de nos EEQ et satisfaire aux exigences d'accréditation du COFRAC.

Discipline : Biologie médicale

Mots-clés : NPM1, LAM, MRD, RT-qPCR

IMPLEMENTATION OF THE QUANTIFICATION OF THE NPM1 TYPE A MUTATION AT THE CHU DE LA REUNION. EVALUATION OF THE IPSOGEN® NPM1 MUTA KIT

Abstract

Introduction : Mutation of the Nucleoplasmin (NPM1) gene represents one of the most frequently observed acquired mutations in acute myeloid leukemia (AML) (30%), particularly in AML with normal karyotype. Among the many types of NPM1 mutants, the type A mutation is the most frequent and accounts for 80% of mutants.

The 2016 update of the WHO classification of hematologic malignancies made it a separate entity, classified as AML with recurrent genetic abnormalities, based on its clinical, biological, and prognostic features.

Quantification of the NPM1 mutation constitutes a robust molecular target for MRD (Measurable Residual Disease), which is now an indispensable tool to guide the therapeutic attitude and to detect early relapses during the follow-up. The reference technique for the quantification of NPM1 mutations is RT-qPCR on complementary DNA.

At CHU Sud Réunion, among the one hundred and thirty-three AMLs diagnosed between January 2015 and July 2020, twenty are NPM1 AMLs (15%) and seventeen are NPM1 type A mutations (85%). The quantification of NPM1 type A AMLs, currently outsourced in metropolitan France to the Cochin Hospital in Paris, represents a significant activity. This justifies its implementation in Reunion Island, and would thus allow to obtain shorter delays for results and to optimize the follow-up of patients.

Method : This work evaluates the feasibility of the implementation of the quantification of the NPM1 type A mutation at the University Hospital of La Réunion by using the Ipsogen® NPM1 MutA MutaQuant kit (QIAGEN) on the laboratory's qPCR apparatus (LightCycler® 480 from Roche Diagnostics). Three axes of work were carried out: the analytical validation of the RT-qPCR, the resumption of the molecular follow-up of three patients for comparison with our reference center and the evaluation of the performances of the commercial kit in the working conditions of our molecular biology laboratory.

Results : Our manipulations validated the analytical validation criteria of RT-qPCR. The molecular follow-up of the three patients is consistent with the data from our reference center. Accuracy evaluation, through External Quality Assessments (EQA) in which 23 laboratories in France participate, shows discordant results with the peer group.

Conclusion : The implementation of NPM1 type A mutation quantification by Ipsogen's NPM1 MutA Mutaquant kit is feasible at CHU Sud Réunion under the current conditions. However, additional studies are necessary to explain the non-conformity of our EEQs and to meet the COFRAC accreditation requirements.

Discipline : Biology

Keywords : NPM1, AML, MRD, RT-qPCR