

Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18 octobre 2024

Par

ROUBINET Maxime

Apport de l'Optical Genome Mapping dans l'évaluation du bilan génétique des leucémies aiguës lymphoblastiques

Thèse dirigée par Dr Nathalie GACHARD

Examineurs :

Mme. Sylvie Rogez, PU-PH, Laboratoire de Virologie, CHU de Limoges

M. Jean Feuillard, PU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

Mme. Jasmine Chauzeix, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. David Rizzo, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. Pascal Turlure, PH, Service d'Hématologie clinique, CHU de Limoges



Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

le 18 octobre 2024

Par ROUBINET Maxime

**Apport de l'Optical Genome Mapping dans l'évaluation du bilan
génétique des leucémies aiguës lymphoblastiques**

Thèse dirigée par Dr Nathalie GACHARD

Examineurs :

Mme. Sylvie Rogez, PU-PH, Laboratoire de Virologie, CHU de Limoges

M. Jean Feuillard, PU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

Mme. Jasmine Chauzeix, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. David Rizzo, MCU-PH, Laboratoire d'Hématologie, CHU de Limoges

M. Pascal Turlure, PH, Service d'Hématologie clinique, CHU de Limoges



Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

Le 1^{er} janvier 2024

Doyen de la Faculté

Monsieur le Professeur COURTIoux Bertrand

Vice-doyen de la Faculté

Monsieur LÉGER David, Maître de conférences

Assesseurs de la Faculté

Monsieur le Professeur BATTU Serge, Assesseur pour la Formation Continue

Monsieur le Professeur PICARD Nicolas, Assesseur pour l'Innovation Pédagogique

Professeurs des Universités – Hospitalo-Universitaires

M. BARRAUD Olivier	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. PICARD Nicolas	Pharmacologie
Mme ROGEZ Sylvie	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. SAINT-MARCOUX Franck	Toxicologie

Professeurs des Universités – Universitaires

M. BATTU Serge	Chimie analytique et bromatologie
M. COURTIoux Bertrand	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. DESMOULIÈRE Alexis	Physiologie
M. DUROUX Jean-Luc	Biophysique et mathématiques
Mme FAGNÈRE Catherine	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. LIAGRE Bertrand	Biochimie et biologie moléculaire
Mme MAMBU Lengo	Pharmacognosie

Mme POUGET Christelle Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. TROUILLAS Patrick Biophysique et mathématiques

Mme VIANA Marylène Pharmacie galénique

Maitres de Conférences des Universités – Hospitalo-Universitaires

Mme. CHAUZEIX Jasmine Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

Mme DEMIOT Claire-Élise (*) Pharmacologie

M. JOST Jérémy Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Maitres de Conférences des Universités – Universitaires

Mme AUDITEAU Émilie Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

Mme BEAUBRUN-GIRY Karine Pharmacie galénique

Mme BÉGAUD Gaëlle (*) Chimie analytique et bromatologie

M. BILLET Fabrice Physiologie

Mme BONAUD Amélie Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie

M. CALLISTE Claude Biophysique et mathématiques

M. CHEMIN Guillaume Biochimie et biologie moléculaire

Mme CLÉDAT Dominique Chimie analytique et bromatologie

M. COMBY Francis Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique

M. FABRE Gabin Biophysique et mathématiques

M. LABROUSSE Pascal (*) Botanique et cryptogamie

Mme LAVERDET Betty Pharmacie galénique

M. LAWSON Roland Pharmacologie

M. LÉGER David (*) Biochimie et biologie moléculaire

Mme MARRE-FOURNIER Françoise Biochimie et biologie moléculaire

M. MERCIER Aurélien	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
Mme MILLOT Marion (*)	Pharmacognosie
Mme PASCAUD-MATHIEU Patricia	Pharmacie galénique
M. TOUBLET François-Xavier	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
M. VIGNOLES Philippe (*)	Biophysique et mathématiques

(*) Titulaire de l'Habilitation à Diriger des Recherches (HDR)

Professeur associé en service temporaire

M. FOUGÈRE Édouard	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques

Mme MARCELLAUD Élodie	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche

M. DELMON Cédric	Microbiologie, parasitologie, immunologie et hématologie
M. HAMION Guillaume	Pharmacognosie, Botanique et Mycologie
Mme SONDA Amar	Chimie analytique et bromatologie

Enseignants d'anglais

M. HEGARTY Andrew	Chargé de cours
Mme VERCELLIN Karen	Professeur certifié

Remerciements

Madame le **Professeur Sylvie Rogez**, je vous remercie de me faire l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie également pour vos conseils précieux et les moments agréables partagés lors de nos échanges pendant ma période de représentant des internes. Veuillez trouver ici l'expression de mon profond respect.

Monsieur le **Professeur Jean Feuillard**, je vous remercie d'avoir accepté de juger mon travail de thèse. Merci pour vos enseignements, vos conseils mais également votre bienveillance à l'égard des internes en tant que chef de service du laboratoire d'Hématologie. Enfin, je vous remercie tout particulièrement pour votre contribution à la réalisation du projet d'internalisation de la technique dans lequel s'intègre ce travail de thèse.

Madame le **Docteur Jasmine Chauzeix**, je te remercie d'avoir accepté de participer à l'évaluation de ce travail. Merci pour tes enseignements en hématologie reçus pendant mes études à la faculté de Pharmacie de Limoges mais surtout pour ceux reçus lors de mes semestres au laboratoire. Merci pour ta confiance sur notre projet à venir que j'ai hâte de débiter.

Monsieur le **Docteur David Rizzo**, je suis heureux de te compter parmi ce jury de thèse. Je te remercie pour ta grande disponibilité et toutes les connaissances que tu as partagé avec moi notamment en biologie moléculaire. Je suis très heureux de pouvoir continuer à apprendre et travailler avec toi par la suite.

Monsieur le **Docteur Pascal Turlure**, c'est un honneur pour moi de vous compter parmi mon jury de thèse. Je vous remercie de prendre le temps d'évaluer mon travail de thèse et d'y apporter votre expertise. Je vous remercie également pour votre contribution à la réalisation du projet dans sa globalité. Croyez-en mes plus sincères remerciements.

Madame le **Docteur Nathalie Gachard**, je vous remercie de m'avoir fait l'honneur d'accepter de diriger mon travail de thèse et de m'avoir proposé ce projet passionnant et fait confiance pour le réaliser. Travailler avec vous a été un plaisir immense pour moi. Je vous remercie de me transmettre toutes vos connaissances et votre expertise depuis plus de 3 ans. Vous avez grandement contribué à ma passion pour la cytogénétique et à mon épanouissement professionnel. J'ai hâte de pouvoir continuer à travailler et apprendre avec vous. Ces quelques mots ne suffisent pas à vous exprimer toute ma gratitude. Nathalie, mille mercis !

Je tiens à remercier **toute l'équipe de Bionano** sans qui ce travail de thèse n'aurait pu être réalisé et tout particulièrement **Marie-Charlotte Lenoir, Michaela West, Consuelo Alonso, Karl Hong et Jenna Finley** pour leur accompagnement dans toutes les étapes nécessaires et leur grande disponibilité.

Je tiens également à remercier tous les biologistes et cliniciens avec qui j'ai eu la chance de travailler et qui m'ont tant appris pendant mes différents semestres.

Docteur Franck Trimoreau, je vous remercie de partager votre passion pour la cytologie mais également pour votre gentillesse et votre disponibilité.

Docteurs Estelle Guerin et Magali Donnard, merci pour vos enseignements et votre expertise en cytométrie en flux et en hémostase.

Merci aux **Professeurs Catherine Yardin et Sylvie Bourthoumieu** mais aussi aux **Docteurs Valentine Marquet et Benjamin Dauriat** de m'avoir accueilli et transmis votre savoir lors de mes passages dans le service de Génétique médicale et Cytogénétique constitutionnelle. J'ai hâte de poursuivre notre collaboration.

Docteur Anne-Sophie Lia, merci pour tes enseignements et je suis heureux de pouvoir collaborer avec toi par la suite.

Je souhaite aussi remercier tous les techniciens des différents laboratoires et secteurs dans lesquels je suis passé.

Merci tout particulièrement à **Catherine, Virginie, Mélanie et Alexia** sans qui je n'aurais jamais autant apprécié la cytogénétique. Grâce à vous les chromosomes n'ont presque plus de secrets pour moi et votre charabia est devenu le mien. Lorsque je passe la porte du secteur, je me sens comme chez moi. Merci de me supporter surtout quand je ne fais que râler et que je parle tout seul. J'espère pouvoir travailler avec chacune d'entre vous le plus longtemps possible. Merci pour tout !

Merci à tous les autres personnels du laboratoire que j'ai cotoyé. **Marie-Pierre, Mélanie, Audrey et Paco**, merci pour votre disponibilité et votre aide dans tous mes projets. **Marie-Françoise**, merci pour ta bonne humeur.

Merci à toute l'équipe de recherche de l'UMR7276 pour votre accueil pendant toute cette année. **Docteur Sophie Peron**, merci pour ton encadrement, tes conseils et ta gentillesse. **Kenza et Milène**, merci pour tous ces bons moments.

Je tiens à remercier tous les internes avec qui j'ai partagé des moments de bonheur et qui ont rendu ces 5 années d'internat inoubliables : **Sarah N**, sans toi mon internat n'aurait jamais été le même. Tu m'as guidé dans mes moments de doutes et tu m'as permis de faire les bons choix. Mais surtout tu as été une co-interne et tu es une amie exceptionnelle. Merci pour tout ! **Cassandra**, merci d'avoir rendu chacun des semestres partagés ensemble incroyables. Je suis heureux d'avoir une si bonne amie comme future collègue et j'ai hâte de créer de nombreux souvenirs avec toi. **Fifamé**, merci pour tous les moments passés ensemble pendant chaque semestre et nos discussions autour de la génétique et de nos maquettes. **Nicolas**, tu as été un co-interne au top en BVH et en hémato et j'espère partager d'autres congrès de la SFH avec toi. **Marwan**, merci pour ta bonne humeur et pour tous nos délires avec Sarah pendant le semestre de Biochimie. **Blandine et Chloé**, merci pour votre bonne humeur et pour tous ces repas partagés ensemble au self. Et merci Blandine de t'être pris la tête avec moi pour la répartition des internes ! Merci aux autres membres des Potis blastes (**Emilien, Marie-Mathilde, Léa et Mathieu**) d'avoir rendu mon premier semestre en hémato incroyable. Merci à tous mes autres co-internes d'hémato (**Lucie, Intissar, Lucas, Ines, Thibaut, François, Ludivine, Franck et Augustin**) pour tous les bons moments partagés ensemble. **Alice**, merci pour les moments partagés ensemble à la fac et pendant l'internat. **Nisrine**, merci pour ta gentillesse et j'ai hâte d'être ton futur co-interne puis collègue. **Alix**, merci d'avoir rendu notre courte aventure parisienne plus agréable, merci pour ta bonne humeur et nos discussions pendant les longues heures de route ou autour d'un verre de vin. **Marie-Sarah**, merci pour ton soutien pendant cette année et ta joie de vivre. **Maxime**, merci pour ta folie qui a rendu mes trajets de l'HME à l'internat beaucoup plus courts. **Marine**, merci pour ta gentillesse, tes connaissances en hémato et tes conseils. **Marie-Fleur**, merci pour ta bonne humeur, tes soirées escape game et ta bienveillance. Merci à **Candice, Anissa, Romane, Camille, Sami, Chieu-ân, Dorine, Julie et Martin** de m'avoir supporté tous les midis et d'avoir égayé mes journées pendant ces deux derniers semestres. Merci à **Caroline, Victor, Etienne, Sarah D., Charlotte, Séléna, Tom, Manon, Jean-Baptiste et Sébastien** pour les bons moments passés ensemble.

Je souhaite remercier tous mes amis et ma famille pour leur soutien et les moments de bonheur partagés ensemble.

Floriane, merci d'être une amie exceptionnelle et d'être toujours là pour moi dans les bons comme les mauvais moments. **Ben, Carla, Loulou, Modo, Lili, Théo et Julien**, merci d'être mon rayon de soleil de tous les jours. Merci pour votre folie, votre bonne humeur, vos conseils et votre soutien !

Merci à mon **parrain** (Jojo) et ma **marraine** (Aurélie). Merci à mes supers **tontons, tatas, cousins et cousines**. Merci **papi Alain** et **mamie Georgette** et merci à mes grand-parents qui ne sont plus là et qui me manquent : **mamie Lulu, mamie Denise, papi Aimé et papi Jean**.

Benji et Charlou, merci d'être beaucoup plus que des cousins pour moi.

Ameline, ma sœur, merci pour tout ce que tu m'apportes au quotidien, merci de prendre soin de moi, merci d'être là tout simplement. Je suis fier de toi et je t'aime.

Maman et Papa, merci pour tout votre amour et votre soutien depuis 29 ans. C'est grâce à vous que je m'épanouis. Je vous aime.

Droits d'auteurs

Cette création est mise à disposition selon le Contrat :

« **Attribution-Pas d'Utilisation Commerciale-Pas de modification 3.0 France** »

disponible en ligne : <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/fr/>



Liste des abréviations

Ac : anticorps	FISH : fluorescent in situ hybridization
ACA : anomalie cytogénétique additionnelle	FPDMM : familial platelet disorder with predisposition to myeloid malignancy
ACPA: analyse chromosomique sur puce à ADN	FROGG : french speaking OGM group from GFCH
add : addition de matériel	GFCH : groupe francophone de cytogénétique hématologique
ADNg : ADN génomique	GWAS : genome-wide association study
ALAL : leucémie aiguë de lignage ambigu	HDAC : histone désacétylase
amp : amplification	HeH : hyperdiploïdie élevée
AT : ataxie-télangiectasie	Ho-Tr : hypodiploïdie sévère/para-triploïdie
BET: bromodomain and extraterminal	i : isochromosome
bHLH : basic helix-loop-helix	iAMP21 : amplification intrachromosomique du chromosome 21
BS : Bloom syndrome	ICC : international consensus classification
c : intra cytoplasmique	Ig : immunoglobuline
CAR-T : chimeric antigen receptor T	inv : inversion
CD : cluster de différenciation	ISCN : international system for human cytogenomic nomenclature
CGH : comparative genomic hybridization	ITK : inhibiteur de tyrosine kinase
CMF : cytométrie en flux	LA : leucémie aiguë
CMMRD : constitutional mismatch repair deficiency	LAL : leucémie aiguë lymphoblastique
CNV : copy number variation	LAM : leucémie aiguë myéloblastique
CQ : contrôle qualité	LBL : lymphome lymphoblastique
CSH : cellules souches hématopoïétiques	LFS : syndrome de Li-Fraumeni
cth : chromothripsis	LH : hypodiploïdie sévère
cx : complexe	LMMJ : leucémie myélomonocytaire juvénile
del : délétion	LMO : LIM-only domain
der : dérivé	LOH : perte d'hétérozygotie
DS : syndrome de Down	mar : marqueur
dup : duplication	MLPA : multiplex ligation-dependent probe amplification
ETP : early-T precursor	MMR : mismatch repair
FA : fanconi anemia	
FAB : French-American-British	

MPAL : leucémie aigüe de phénotype mixte
MPO : myéloperoxydase
MRD : maladie résiduelle détectable
N/C : rapport nucléo-cytoplasmique
NBS : Nijmegen breakage syndrome
NF1 : neurofibromatose de type 1
NFRP : NOTCH1, FBXW7, RAS et PTEN
NGS : séquençage de nouvelle génération
NH : para-haploïdie
NS : syndrome de Noonan
OGM : optical genome mapping
OMS : organisation mondiale de la santé
p : bras court d'un chromosome
PAR : pseudoautosomal region
PAX5-alt : altération de PAX5
Ph : chromosome Philadelphie
q : bras long d'un chromosome
r : réarrangement
R/R : réfractaire ou en rechute
RNAseq : séquençage de l'ARN

RR : risque relatif
RT-MLPA : MLPA après transcription inverse
RT-qPCR : PCR quantitative après transcription inverse
RVA : rare variant assembly
s : surface
SMD : syndrome myélodysplasique
SNC : système nerveux central
SNP : single nucleotide polymorphism
SNV : single nucleotide variation
SV : anomalie chromosomique de structure
t : translocation
TCR : récepteur des cellules T
TdT : terminal deoxynucleotidyl transferase
UHMW : très haut poids moléculaire
VAF : fréquence allélique
WGS : whole genome sequencing
WT : allèle sauvage (wild-type)
WTS : whole transcriptome sequencing

Table des matières

Introduction	19
I. Leucémies aiguës lymphoblastiques	20
I.1. Généralités.....	20
I.2. Epidémiologie.....	21
I.3. Facteurs de risque et de prédisposition.....	22
I.3.1. Prédisposition génétique aux LAL.....	22
I.3.1.1. Anomalie chromosomique constitutionnelle : Syndrome de Down	23
I.3.1.2. Syndromes associés à des variants pathologiques constitutionnels.....	23
I.3.1.3. Prédisposition associée à des polymorphismes	26
I.3.2. Autres facteurs de risque génétiques.....	27
I.3.2.1. Clones pré-leucémiques.....	27
I.3.2.2. Epigénétique.....	28
I.3.3. Facteurs de risque environnementaux.....	28
I.4. Physiopathologie des LAL : apport de la génétique	29
I.4.1. Anomalies génétiques primaires et secondaires.....	29
I.4.2. Hétérogénéité clonale et rechute	30
I.5. Présentation clinique	31
I.6. Diagnostic biologique	31
I.6.1. Cytologie et cytochimie	32
I.6.2. Immunophénotypage	33
I.6.3. Génétique.....	35
I.6.3.1. Génétique des LAL-B.....	35
I.6.3.1.1. Anomalies primaires cytogénétiques et moléculaires	38
I.6.3.1.2. Anomalies secondaires cytogénétiques et moléculaires.....	46
I.6.3.1.3. Anomalies associées à la rechute	47
I.6.3.2. Génétique des LAL-T.....	48
I.6.3.2.1. Dérégulation de l'expression des facteurs de transcription	51
I.6.3.2.2. Anomalies génétiques secondaires récurrentes.....	56
I.6.3.2.3. Anomalies associées à la rechute	59
I.7. Stratification pronostique	59
I.8. Traitement et survie.....	61
I.8.1. Traitement courant.....	61
I.8.2. Thérapies innovantes et perspectives.....	62
I.8.2.1. Immunothérapies	62
I.8.2.2. Autres thérapies ciblées.....	64
II. Techniques pour l'exploration génétique des LAL en routine : de la cytogénétique à l'Optical Genome Mapping.....	68
II.1. Techniques cytogénétiques et moléculaires actuelles de routine	68
II.2. Présentation de l'Optical Genome Mapping.....	70
II.2.1. Principe de la technique	70
II.2.2. Principe de l'interprétation	72
II.2.3. Avantages et limites	75
II.2.4. Apport dans les LAL.....	77
III. Objectifs	79
IV. Matériels & Méthodes.....	80



IV.1. Sélection des patients et des échantillons.....	80
IV.2. Stockage et conservation des échantillons.....	80
IV.3. Optical Genome Mapping.....	80
IV.3.1. Technique	80
IV.3.2. Interprétation et rendu des résultats	81
IV.4. Comparaison des résultats.....	83
IV.4.1. Techniques conventionnelles	83
IV.4.2. Techniques complémentaires.....	84
IV.4.3. Critères de comparaison	84
V. Résultats.....	86
V.1. Caractéristiques des échantillons et patients.....	86
V.1.1. Caractéristiques des LAL-B.....	86
V.1.2. Caractéristiques des LAL-T.....	88
V.2. Stockage et qualité des prélèvements	88
V.3. Qualité des données brutes obtenues.....	88
V.4. Interprétation et réglage des filtres.....	89
V.4.1. Réarrangements équilibrés (translocations et inversions)	90
V.4.2. CNV et aneuploïdies.....	93
V.4.2.1. CNV simples et complexes	93
V.4.2.2. Aneuploïdies	101
V.4.3. Réarrangements génomiques catastrophiques (chromoanagenesis).....	106
V.4.4. Apport du pipeline De Novo	108
V.4.4.1. Analyse de la région PAR1	108
V.4.4.2. Analyse du niveau de ploïdie	109
V.4.5. Pourcentage par rapport à la population de référence.....	113
V.5. Comparaison de l'OGM aux techniques conventionnelles et additionnelles	115
V.5.1. Faisabilité des techniques et taux d'échec.....	115
V.5.2. Sensibilité pour la détection d'anomalies récurrentes et pronostiques	116
V.5.2.1. Détection des anomalies primaires des LAL-B.....	116
V.5.2.2. Détection des anomalies primaires des LAL-T.....	124
V.5.2.3. Détection des délétions secondaires pronostiques des LAL-B.....	126
V.5.3. Sensibilité pour la détection des anomalies clonales et sous-clonales.....	128
V.5.4. Concordance des résultats.....	130
V.5.5. Résolution de l'OGM.....	134
V.5.5.1. Taille minimale des anomalies détectées par OGM	134
V.5.5.2. Précision des résultats de cytogénétique grâce à l'OGM	135
V.5.5.3. Détection d'anomalies additionnelles.....	136
V.5.5.4. Evaluation de la complexité génomique par OGM	138
VI. Discussion.....	139
VI.1. Bilan de l'étape de stockage spécifique à l'OGM.....	139
VI.2. Bilan de l'étape d'interprétation de l'OGM	140
VI.2.1. Réglage des filtres	140
VI.2.2. Identification et interprétation des anomalies	142
VI.2.3. Proposition de compte-rendu	145
VI.3. Bilan de l'informativité et des performances de l'analyse OGM.....	146
VI.4. Impact des résultats de l'OGM sur le pronostique dans notre série.....	149
VI.5. Perspectives et impact de l'OGM dans notre laboratoire	150

Conclusion	152
Références bibliographiques.....	153
Annexes.....	166
Serment De Galien.....	176

Table des illustrations

Figure 1 : Représentation simplifiée des hématopoïèses physiologique et leucémique.	20
Figure 2 : Cancers pédiatriques les plus fréquents en France sur la période 2012-2016 (3).	21
Figure 3 : Facteurs de risque établis ou potentiels de développer une LAL, d'après <i>Schmidt et al</i> (6).....	22
Figure 4 : Syndromes génétiques prédisposant aux LAL classés selon le rôle principal physiologique du gène impliqué, d'après <i>Bloom et al</i> (14).....	23
Figure 5 : Altérations génétiques, constitutionnelles ou somatiques, touchant les facteurs de transcriptions impliqués dans l'hématopoïèse (7).....	27
Figure 6 : Représentation simplifiée de la leucémogénèse des LAL, d'après (66).....	30
Figure 7 : Morphologie d'un lymphocyte normal (A) et de blastes de type L1 (B) ou L2 (C).	33
Figure 8 : Sous-groupes génétiques récurrents selon les profils d'expression génique (88).	38
Figure 9 : Altérations de <i>PAX5</i> dans les LAL-B, adapté de Jia et Gu (137).....	44
Figure 10 : Fréquence des anomalies génétiques récurrentes, primaires et secondaires, des LAL-T (155).....	49
Figure 11 : Classification des LAL-T en fonction du stade d'arrêt de la différenciation et des facteurs de transcriptions surexprimés (156).	51
Figure 12 : Classier moléculaire étendu proposé par <i>Simonin et al</i> (184).....	58
Figure 13 : Thérapies ciblées principales dans les LAL-B et LAL-T (198).	63
Figure 14 : Localisation chromosomique des principaux gènes altérés dans les LAL-B.	66
Figure 15 : Localisation chromosomique des principaux gènes altérés dans les LAL-T.....	67
Figure 16 : Schéma des différentes étapes de la technique Optical Genome Mapping, adapté de la brochure du système Saphyr™ (213).	72
Figure 17 : Différentes interfaces de visualisation pour l'interprétation.....	73
Figure 18 : Exemple d'une translocation équilibrée fiable.....	90
Figure 19 : Inversion associée à une délétion.	91
Figure 20 : Inversions au sein d'un réarrangement équilibré plus complexe.	92
Figure 21 : Exemple de deux translocations artefactuelles détectées par OGM.	93
Figure 22 : Visualisation des CNV simples sur le Whole genome et le Circos plot.	94
Figure 23 : Profils classiques de translocations déséquilibrées sur le Circos plot.	95
Figure 24 : Exemple de détection de la translocation d'un réarrangement déséquilibré malgré des points de cassure centromériques et/ou télomériques.	96
Figure 25 : Exemple de non détection de la translocation d'un réarrangement déséquilibré à cause des points de cassure centromériques et/ou télomériques.....	97
Figure 26 : Impact du filtre « SV masking filter ».	97
Figure 27 : CNV complexe avec un réarrangement déséquilibré non élucidé.....	98

Figure 28 : Identification des isochromosomes selon le profil CNV.....	99
Figure 29 : Détection variable des CNV complexes par OGM en fonction de la confiance.	101
Figure 30 : Exemples de fausses aneuploïdies et d'aneuploïdies associées à un réarrangement complexe.	103
Figure 31 : Détection variable des aneuploïdies par OGM en fonction de la confiance....	104
Figure 32 : Interprétation délicate des aneuploïdies du chromosome Y.	106
Figure 33 : Réarrangements catastrophiques impliquant plusieurs chromosomes.	107
Figure 34 : Réarrangements catastrophiques impliquant respectivement un seul chromosome.....	108
Figure 35 : Couverture de la région PAR1 en fonction des pipelines.	109
Figure 36 : VAF et LOH dans le cadre d'aneuploïdies pour un génome para-diploïde.....	110
Figure 37 : Normalisation à 2n d'un génome para-tétraploïde pour LIM95.....	112
Figure 38 : Détection de LOH avec le pipeline De Novo dans le cadre d'un clone hypodiploïde dupliqué.....	113
Figure 39 : Impact du filtre « % control database » sur la détection d'une délétion <i>IKZF1</i>	114
Figure 40 : Détection des anomalies primaires des LAL-B par les différentes techniques utilisées.....	116
Figure 41 : Précision par l'OGM des anomalies primaires partiellement détectées.....	117
Figure 42 : Identification par OGM d'un transcrite <i>ETV6::MGAT4C</i>	118
Figure 43 : Précision et identification de nouvelles anomalies primaires par OGM.	119
Figure 44 : Précision des aneuploïdies identifiées au caryotype (A) grâce à l'OGM (B) pour LIM14.....	120
Figure 45 : Identification du clone hypodiploïde dupliqué au caryotype et par OGM pour LIM69.....	122
Figure 46 : Sensibilité du caryotype et de l'OGM pour la détection des hyperdiploïdies. ...	123
Figure 47 : Détection des anomalies primaires des LAL-T par les différentes techniques utilisées.....	124
Figure 48 : Exemples de détection de réarrangements récurrents des LAL-T par OGM....	125
Figure 49 : Exemples de délétions récurrentes identifiées par OGM.....	126
Figure 50 : Détection des délétions intragéniques de <i>IKZF1</i> (9p21.3) par OGM.....	127
Figure 51 : Détection d'une délétion intragénique de <i>ERG</i> (21q22.2) par OGM.	128
Figure 52 : Deux résultats discordants entre l'OGM et le caryotype.....	133
Figure 53 : Exemple de délétions détectées d'une taille inférieure à 50kb.	134
Figure 54 : Organigramme d'interprétation de l'analyse OGM proposé pour les LAL.....	145
Figure 55 : Vue d'ensemble des anomalies détectées par OGM pour les échantillons de LAL- B.....	148

Table des tableaux

Tableau 1 : Leucémie aiguë de lignage ambigu, adapté de la classification OMS 2022 (86).	35
Tableau 2 : Caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-B.....	36
Tableau 3 : Classier UKALL selon le profil CNV, adapté de <i>Moorman et al</i> (146).....	47
Tableau 4 : Caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-T.....	50
Tableau 5 : Facteurs pronostiques des LAL, adapté de <i>Malard et al</i> (1).	60
Tableau 6 : Avantages et limites des techniques d'exploration génétique disponibles, adapté de <i>Akkari et al</i> (210).....	77
Tableau 7 : Comparaison des filtres recommandés par le fournisseur par rapport à ceux utilisés.....	82
Tableau 8 : Caractéristiques des échantillons et des patients.....	87
Tableau 9 : Pourcentage de clonalité des échantillons avec le caryotype, la FISH et l'OGM.	129
Tableau 10 : Précision et ajustement des résultats du caryotype grâce aux résultats d'OGM.	131
Tableau 11 : Précision par l'OGM des points de cassure suspectés au caryotype.	135
Tableau 12 : Anomalies additionnelles non cryptiques détectées par OGM et non identifiées par le caryotype ou la FISH.	136
Tableau 13 : Anomalies primaires cryptiques détectées par OGM et non identifiées en FISH.	136
Tableau 14 : Anomalies additionnelles cryptiques récurrentes détectées par OGM	137
Tableau 15 : Complexité génomique selon la cytogénétique conventionnelle ou de l'OGM.	138
Tableau 16 : Comparaison des réglages de filtres validés dans notre étude par rapport aux recommandations du fournisseur et de <i>Levy et al</i>	141

Introduction

Depuis les années 1950, plusieurs avancées ont permis d'améliorer la prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL). Au niveau thérapeutique, la mise en place d'une chimiothérapie intensive associée à une prophylaxie pour limiter les rechutes a augmenté considérablement les taux de survie. En parallèle, les premières étapes de compréhension de la biologie des LAL ont entraîné la création d'une classification morphologique puis immunophénotypique mais surtout la mise en évidence des premières altérations génétiques. Les techniques de cytogénétique, avec le caryotype puis la FISH, ont joué un rôle majeur dans la description des altérations chromosomiques récurrentes permettant une meilleure compréhension de la leucémogénèse et la création des premières classifications basées sur la génétique avec des entités génétiques distinctes corrélées à des pronostics différents.

L'importance de la génétique dans la prise en charge des LAL ne cesse d'augmenter depuis l'avènement des techniques à haute résolution basées sur le séquençage. En effet elles ont permis la mise en évidence de nombreuses sous-entités génétiques et d'altérations secondaires pronostiques. Ces techniques étant difficiles à mettre en place en routine pour la majorité des laboratoires, l'association de plusieurs analyses cytogénétiques et moléculaires est alors nécessaire pour rendre un résultat le plus informatif et complet possible. L'évaluation actuelle du bilan génétique des LAL est donc coûteuse, chronophage, complexe et souvent incomplète.

L'Optical Genome Mapping (OGM), autre technique très résolutive mais non basée sur le séquençage, a récemment été évaluée par plusieurs équipes pour l'évaluation du bilan génétique des hémopathies et particulièrement des LAL. Ces études ont mis en évidence des performances remarquables associées à une simplicité d'analyse et un coût modéré. L'OGM a donc rapidement été considérée comme une alternative intéressante par rapport aux techniques de séquençage.

Nous avons alors souhaité définir l'apport de l'OGM dans l'évaluation du bilan génétique des LAL et particulièrement dans notre pratique au laboratoire. Après une présentation des LAL et principalement des altérations génétiques décrites dans cette pathologie, nous décrirons ensuite les différentes techniques d'exploration génétique et notamment l'OGM. Nous exposerons ensuite les objectifs de cette étude, les matériels et méthodes utilisés ainsi que les résultats qui seront discutés.

I. Leucémies aiguës lymphoblastiques

I.1. Généralités

L'hématopoïèse est un processus hautement régulé par lequel les cellules souches hématopoïétiques se différencient dans la moelle osseuse ou le thymus (pour les lymphocytes T) jusqu'à obtenir les érythrocytes, les plaquettes et les différentes cellules immunitaires des lignées myéloïdes et lymphoïdes. Il s'en suit, notamment pour les lymphocytes, une étape de maturation dans les ganglions lymphatiques.

Une leucémie est une pathologie acquise résultant d'une ou plusieurs anomalies génétiques induisant la transformation maligne d'une cellule souche hématopoïétique pluripotente ayant la capacité de donner naissance à des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes ou d'un progéniteur immature. On distingue le caractère aigu ou chronique d'une leucémie en fonction de la rapidité de prolifération et du degré de maturation des précurseurs normaux d'origine. Les leucémies aiguës (LA) constituent un ensemble hétérogène d'hémopathies malignes caractérisées par l'expansion clonale de précurseurs hématopoïétiques immatures bloqués à un stade précoce de leur différenciation, appelés blastes ou cellules leucémiques (Figure 1).

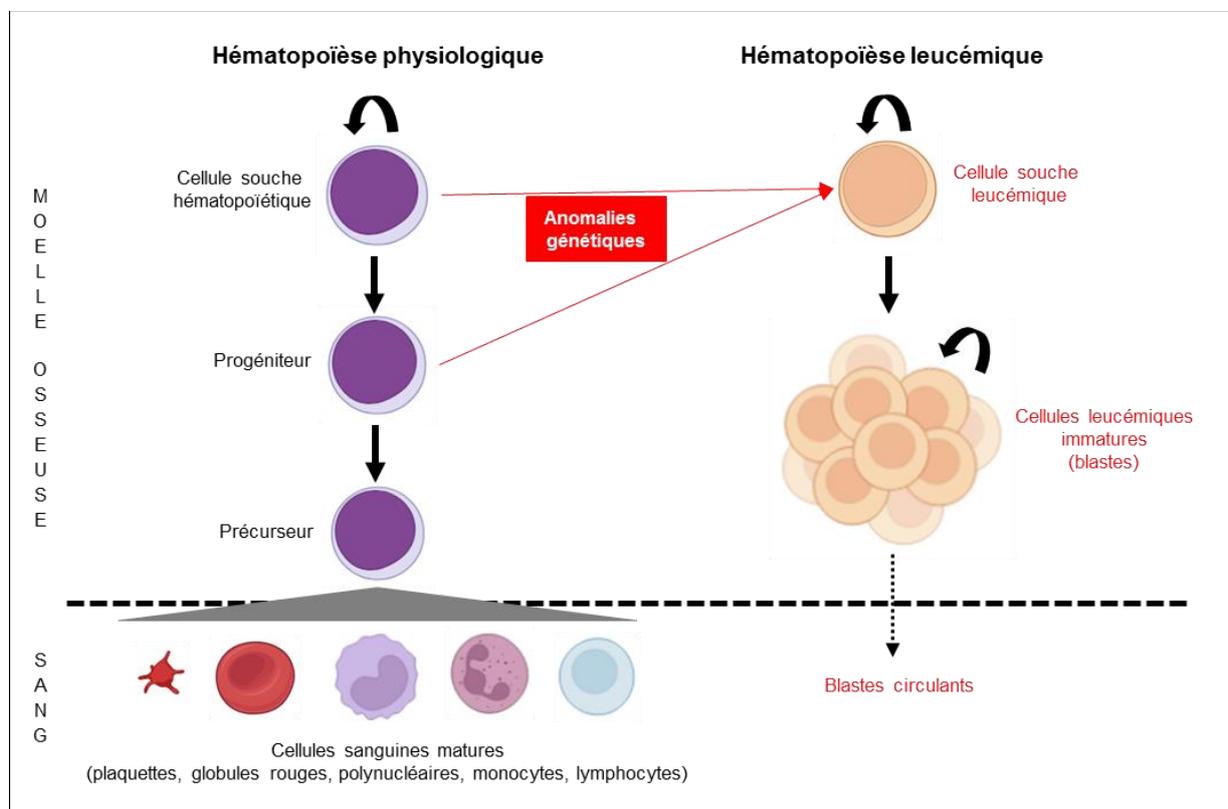


Figure 1 : Représentation simplifiée des hématopoïèses physiologique et leucémique.

Ces blastes ont une capacité accrue de prolifération donnant naissance à un clone cellulaire tumoral inhibant le développement des cellules sanguines normales, ce qui entraîne des symptômes cliniques. Selon l'origine du précurseur impliqué, lignée myéloïde (myéloblaste) ou lymphoïde (lymphoblaste), on distingue les leucémies aiguës myéloblastiques (LAM) et les **leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL)**.

Les LAL sont divisées en fonction de l'engagement de la cellule immature dans la différenciation lymphoïde B ou T en **LAL-B** et **LAL-T**. Dans les LAL, la prolifération clonale initiale a lieu dans la moelle osseuse puis envahit secondairement les autres tissus, en particulier le sang périphérique, les organes lymphoïdes (ganglions, rate pour les LAL-B ou T et thymus pour les LAL-T) et le système nerveux central. L'infiltration massive par les lymphoblastes entraîne une insuffisance médullaire qui, en l'absence de traitement, est rapidement fatale notamment en raison des complications infectieuses et hémorragiques (1). Dans le cas d'une infiltration médullaire absente ou limitée (blastes < 25%) par rapport à l'infiltration tissulaire, on parlera de **lymphome lymphoblastique (LBL)**. Les LAL et LBL font partie de la même catégorie de néoplasie hématologique dans les classifications de l'organisation mondiale de la santé (OMS) : leucémie/lymphome lymphoblastique B ou T (2).

I.2. Epidémiologie

En France, les LA sont rares et représentent environ 1% de l'ensemble des cancers. Chez l'enfant (0 à 16 ans), la LAL est néanmoins le cancer le plus important (28% des cancers) devant les tumeurs du système nerveux central (SNC) (26%) et les lymphomes (10%). Chez les adolescents (16 à 17 ans), la LAL passe à la 3^{ème} place (14% des cancers) derrière les tumeurs du SNC (17%) et les lymphomes (27%) (3) (Figure 2).

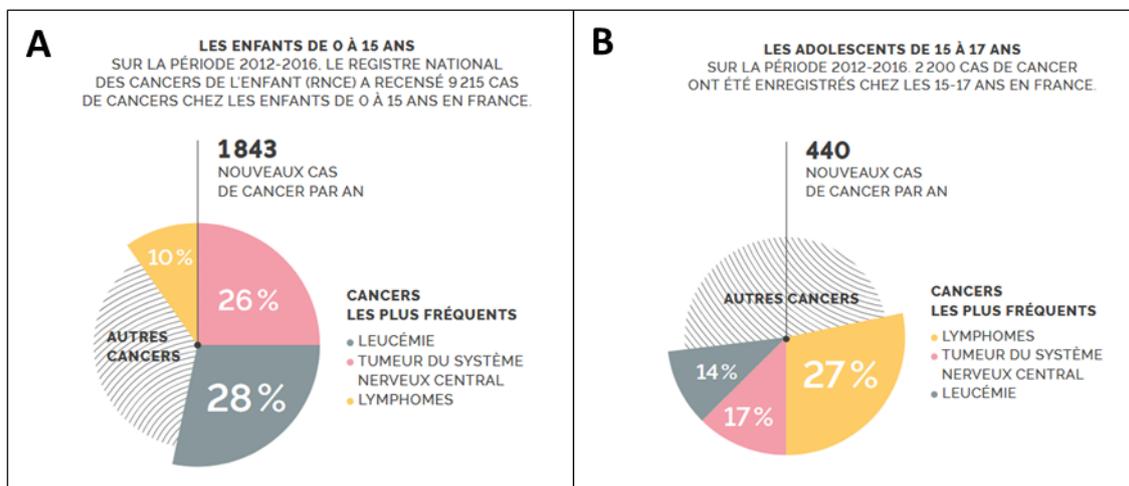


Figure 2 : Cancers pédiatriques les plus fréquents en France sur la période 2012-2016 (3). Cancers touchant les enfants de 0 à 15 ans (A) ou les adolescents de 15 à 17 ans (B).

En France, on estime à 900 le nombre de nouveaux cas de LAL en 2018 dont 517 chez l'homme (57%). Les taux d'incidence standardisés monde sont respectivement pour les hommes et les femmes de 2,0 et 1,5 pour 100 000 personnes-années (ratio hommes/femmes à 1,35) (4). Après un pic entre 1 et 4 ans, l'incidence des LAL diminue progressivement au cours de l'enfance (5-14 ans), de l'adolescence et de l'âge adulte « jeune » (15-39 ans). Elle est la plus basse entre 25 et 45 ans. Environ 60% des LAL sont diagnostiquées avant 20 ans (5).

Une légère augmentation de l'incidence des LAL est observée à des âges plus avancés mais nettement inférieure à celle des LAM, beaucoup plus fréquente chez l'adulte et les personnes âgées. En effet, les LAL représentent environ 80% des LA chez l'enfant et seulement 20%

chez l'adulte. Pour comparaison, on estime à 3428 le nombre de nouveaux cas de LAM en 2018 dont 1 787 chez l'homme (52 %). L'âge médian au diagnostic des LAM est d'environ 70 ans et l'incidence augmente avec les classes d'âges de façon non linéaire (4).

Au sein des LAL, celles de lignée B sont trois à quatre fois plus fréquentes que celles de lignée T avec respectivement 85% contre 15% chez les enfants et 75% contre 25% chez les adultes (1).

L'importance de l'incidence des LAL au sein de la population pédiatrique pose la question de la présence de prédisposition génétique ou d'autres facteurs de risque.

I.3. Facteurs de risque et de prédisposition

Des facteurs de risque génétiques et environnementaux ont été identifiés dans les LAL (Figure 3). Les facteurs génétiques concernent principalement des anomalies constitutionnelles mais des études s'intéressent également au rôle potentiel des transcrits de fusion d'origine somatique et aux modifications épigénétiques (6).

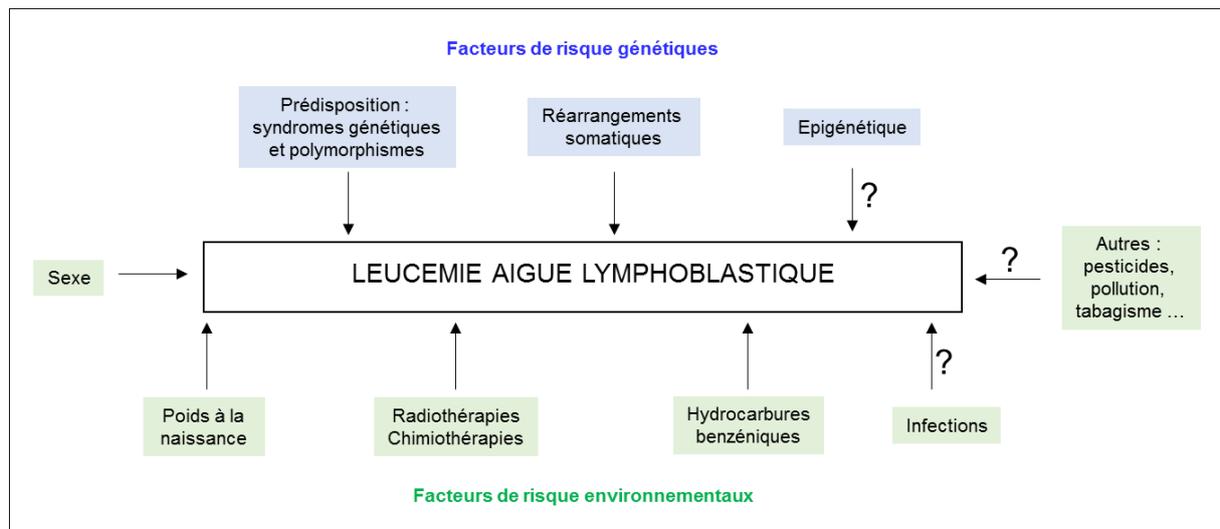


Figure 3 : Facteurs de risque établis ou potentiels de développer une LAL. d'après Schmidt et al (6).

I.3.1. Prédisposition génétique aux LAL

L'implication de la génétique constitutionnelle dans la prédisposition aux LAL peut être divisée en deux catégories (7) :

- Une prédisposition à forte pénétrance associée à une **anomalie chromosomique ou des variants pathologiques germinaux rares** et entraînant une augmentation significative du risque relatif (RR >10 fois). Ces variants pathologiques héréditaires sont associés à des syndromes et maladies génétiques constitutionnels.
- Une prédisposition à faible pénétrance liée à des **polymorphismes germinaux communs (SNP : single nucleotide polymorphism)** entraînant une augmentation faible du risque relatif (RR > 1,5 à 2).

I.3.1.1. Anomalie chromosomique constitutionnelle : Syndrome de Down

Le **syndrome de Down (DS)** est une maladie génétique due à la présence d'une trisomie 21 constitutionnelle. C'est un des premiers syndromes génétiques à avoir été associé à une augmentation du risque de leucémie aiguë pédiatrique dès les années 1930 (8) avec un risque de développer une LAM mégacaryoblastique (AMKL) 500 fois supérieur et une LAL (principalement LAL-B) 20 fois supérieur (9). Les patients DS avec une LAL étaient initialement décrits comme de moins bon pronostic du fait d'une résistance au traitement et/ou d'une mortalité liée au traitement accrue mais les études montrent maintenant un pronostic identique avec un traitement approprié et notamment des soins de support plus importants (10). On note également un profil d'anomalies génétiques somatiques associé à la LAL-B particulier avec peu d'anomalies de bon pronostic (comme *ETV6::RUNX1* et l'hyperploïdie) (11) mais une surexpression de *CRLF2* dans 50% des cas et de fréquentes mutations en lien avec la voie JAK-STAT (12).

De plus, les individus non atteints par le DS mais porteurs d'une anomalie constitutionnelle touchant le chromosome 21, principalement la translocation Robertsonienne rob(15;21) ou un chromosome 21 anormal en anneau, ring 21 ou r(21), ont un risque très augmenté (jusqu'à 2700 fois plus important) de développer une LAL-B et particulièrement avec acquisition somatique d'une amplification intrachromosomique 21 (iAMP21) (13).

I.3.1.2. Syndromes associés à des variants pathologiques constitutionnels

Les premières descriptions de LAL familiales remontent aux années 1950-1960 mais ce n'est qu'en 1990 que la compréhension du rôle de la génétique constitutionnelle a réellement commencé avec la découverte des variants germinaux de *TP53* responsables du syndrome de Li-Fraumeni (LFS). Depuis, de nombreux syndromes et maladies génétiques ont été décrits comme augmentant le risque de LAL. Pour la plupart, les altérations génétiques affectent des gènes critiques impliqués dans plusieurs processus cellulaires tels que la différenciation, la prolifération, l'apoptose, la réparation des lésions de l'ADN et la signalisation intracellulaire (14) (Figure 4). En fonction du gène altéré et de son rôle physiologique, on aura une prédisposition : i) principalement aux LAL, ii) à de nombreuses maladies hématologiques, iii) à différents cancers solides ou hématologiques.



Figure 4 : Syndromes génétiques prédisposant aux LAL classés selon le rôle principal physiologique du gène impliqué, d'après *Bloom et al* (14).

Les **syndromes prédisposant principalement aux LAL** sont associés à des variants germinaux pathologiques affectant des facteurs de transcriptions clés de la lymphopoïèse : *PAX5*, *IKZF1* et *ETV6* (14). Il est intéressant de noter que de nombreuses altérations génétiques (mutation ou délétion) acquises sont également retrouvées pour ces gènes chez des patients atteints de LAL.

- **Prédisposition associée à *PAX5***

Le facteur de transcription des cellules B, *PAX5*, est exprimé tout au long de l'ontogenèse des lymphocytes B et possède des gènes cibles importants pour la lignée B comme *CD19* et *CD79A*. *PAX5* est essentiel au développement normal des cellules B et joue donc un rôle clé dans la pathogenèse des tumeurs malignes lymphoïdes (15) avec notamment des altérations génétiques somatiques de *PAX5* retrouvées dans environ 30% des LAL-B. La prédisposition associée à des altérations constitutionnelles de *PAX5* entraîne uniquement des LAL-B. Elle est autosomique dominante avec une pénétrance incomplète. En effet, au sein des familles atteintes, de nombreux individus porteurs d'une mutation *PAX5* ne présentent pas de LAL. En revanche, tous les individus familiaux avec une LAL-B avaient également perdu le 2^{ème} allèle sauvage (wild-type, WT) de *PAX5* par une anomalie somatique (isochromosome 9q ou chromosome dicentrique 9q) (16).

- **Prédisposition associée à *IKZF1***

IKZF1, membre de la famille de facteurs de transcription IKAROS, est largement exprimé parmi les cellules hématopoïétiques. Il est important dans le développement des lignées lymphoïdes et participe à la différenciation des cellules pro-B en cellules pré-B (17). Des altérations somatiques de *IKZF1* sont fréquentes dans les LAL-B et principalement associées à celle de type *BCR::ABL1* ou *BCR::ABL1-like*. Le rôle de *IKZF1* dans la prédisposition aux LAL a été suggéré lors de la description d'une famille porteuse d'une mutation germinale avec des membres atteints de LAL-B puis par l'identification de variants germinaux de *IKZF1* chez 0,9% de patients avec LAL-B (18). Malgré le peu de cas rapportés, il semble que la pénétrance soit relativement faible.

- **Prédisposition associée à *ETV6* = Thrombopénie de type 5**

ETV6 (ETS Variant 6) code pour un répresseur transcriptionnel de la famille ETS essentiel pour l'hématopoïèse médullaire (19). La prédisposition associée à *ETV6* aux leucémies (aussi appelée thrombopénie de type 5) est un syndrome autosomique dominant caractérisé par une thrombopénie. En effet, quasiment tous les porteurs d'une mutation hétérozygote germinale de *ETV6* présentent une diminution modérée du taux de plaquettes. Environ 25 à 30% de ces porteurs développent une LA, principalement de type LAL-B avec souvent un caryotype hyperdiploïde. Certains patients développent également des hémopathies myéloïdes ou bien des cancers solides (20). A l'exception d'une mutation récurrente (p.P214L) au sein du domaine de liaison central, la majorité des autres mutations germinales se trouvent dans le domaine de liaison à l'ADN, ce qui suggère l'importance de la dérégulation transcriptionnelle de *ETV6* dans la leucémogénèse (20). De façon surprenante, le transcrit de fusion somatique *ETV6::RUNX1*, fréquent dans les LAL-B, est sous-représenté en présence de variants germinaux de *ETV6* (20).

Les **syndromes prédisposant principalement à des hémopathies** dont les LAL concernent les variants de *RUNX1* et certaines des RASopathies.

- **Prédisposition associée à RUNX1 (FPDMM, Familial platelet disorder with predisposition to myeloid malignancy)**

La FPDMM est une maladie génétique autosomique dominante causée par des variants germinaux de *RUNX1* (RUNT-related transcription factor 1). *RUNX1*, membre de la famille des facteurs de transcription CBF (core-binding factor), est indispensable à l'établissement de l'hématopoïèse définitive. C'est l'un des gènes les plus fréquemment altérés dans diverses hémopathies malignes. Plus de 80 familles porteuses de variants germinaux de *RUNX1* sont décrites (21). Ces variants entraînent une altération qualitative et quantitative des plaquettes (22) et un risque augmenté de développer une myélodysplasie (MDS), une LAM ou plus rarement une LAL-T (23).

- **Prédisposition associée aux RASopathies**

Les RASopathies sont des pathologies génétiques liées aux gènes de la voie RAS/MAPK. Deux d'entre elles entraînent une prédisposition à des hémopathies dont des LAL :

- Le **syndrome de Noonan (NS)**, maladie génétique à transmission autosomique dominante assez fréquente (1 naissance sur 1000 à 2500) (24), est dû à des mutations de gènes impliqués dans la voie MAPK, principalement *PTPN11*. Il prédispose à plusieurs hémopathies avec principalement la leucémie myélomonocytaire juvénile (LMMJ) mais également des LAL (25).

- La **neurofibromatose de type 1 (NF1)**, à transmission autosomique dominante, est également une des maladies génétiques les plus communes (1 cas pour 3000 naissances) (26). Elle est due à des variants de *NF1*, gène codant la neurofibromine qui régule négativement RAS (27). Elle prédispose principalement à la LMMJ avec un risque augmenté jusqu'à 500 fois mais également aux leucémies myélomonocytaires chroniques (LMMC), LAM et plus rarement LAL (28).

Les **syndromes prédisposant aux cancers solides et hématologiques** dont les LAL sont majoritairement dû à une altération des gènes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN. Ceux cités ci-dessous seront plus ou moins détaillés en fonction de la fréquence des LAL avec ces syndromes ou de la présence ou non de caractéristiques importantes en lien avec les LAL.

- **Syndrome de Li-Fraumeni (LFS)**

Le LFS est une maladie génétique autosomique dominante causée par des mutations germinales de *TP53* codant pour la protéine suppresseur de tumeur p53. Cette protéine est une des plus importante dans le maintien de l'intégrité du génome (29) et elle est donc la protéine la plus souvent inactivée dans tous les cancers (30). Les individus porteurs ont un risque très élevé de développer de multiples cancers solides ou hémopathies dont des LAL (31). Les LAL dans le cadre du LFS ont des spécificités : caryotype hypodiploïde fréquent, perte du 2^{ème} allèle *TP53*, mutation *IKZF2*, âge au diagnostic plus avancé, moins bonne survie du fait du risque important d'autres cancers secondaires (32).

- **Syndrome de déficience constitutionnelle des gènes MMR (CMMRD, constitutional mismatch repair deficiency)**

Le CMMRD est une maladie génétique autosomique récessive causée par des mutations homozygotes ou hétérozygotes composites des gènes MMR (mismatch repair) : *MSH2*, *MSH6*, *MLH1*, *PMS2* et plus rarement *EPCAM*. Il est associé à une forte augmentation du risque de cancers pédiatriques dont des hémopathies avec principalement des lymphomes T ou LAL-T (33).

- **Ataxie-télangiectasie (AT)**

L'AT est une maladie génétique autosomique récessive rare causée par des mutations bialléliques du gène *ATM*. Elle est associée à une forte incidence de cancer (10 à 25%) dont 85% de LAL et lymphomes (34).

- **Syndrome de Nijmegen (NBS, Nijmegen breakage syndrome) (35)**
- **Syndrome de Bloom (BS) (36)**
- **Anémie de Fanconi (FA) (37)**

La connaissance de ces syndromes est importante pour une **prise en charge adaptée des patients** développant une LAL (38). Cela va tout d'abord permettre de prédire et d'éviter des **toxicités liées au traitement**. Par exemple, les individus porteurs de syndromes associés à une altération du mécanisme de la réparation des dommages de l'ADN, les doses de chimiothérapies doivent être réduites pour limiter le risque de complications. A l'inverse, les individus avec AT, NBS ou LFS seront beaucoup plus sensibles aux traitements par radiothérapie (39). Ensuite, l'information génétique pourra identifier des patients **résistants à certains traitements ou au contraire plus sensibles** notamment à des nouvelles thérapies. Par exemple, les patients avec CMMRD auront des résistances à certaines chimiothérapies dont le mécanisme dépend du MMR (40) alors qu'ils seraient plus sensibles à des inhibiteurs de checkpoint du fait du taux important d'infiltration tumorale (41). Enfin, le diagnostic d'un syndrome génétique prédisposant aux leucémies permettra de mettre en place un **conseil génétique afin de proposer une surveillance précoce et accrue** à tous les membres atteints et détecter précocement les tumeurs pour une meilleure prise en charge (42).

I.3.1.3. Prédisposition associée à des polymorphismes

Les polymorphismes ou SNP sont des variants génétiques communs, c'est-à-dire retrouvés dans une proportion non négligeable de la population générale (>1%) (43). Ils sont considérés comme non pathologiques et donc non responsables d'une maladie génétique spécifique. En revanche, certains peuvent être retrouvés plus ou moins fréquemment en lien avec des pathologies.

Au cours des dernières années, de nombreuses études d'association pangénomique (GWAS, genome-wide association study) ont cherché si la présence de SNP pouvait contribuer au développement des LAL. Bien que les SNP retrouvés dans ces études induisent une augmentation du risque très faible par rapport à celle des syndromes génétiques rares, leur identification peut apporter des informations importantes pour la compréhension de la biologie des LAL (14).

Les GWAS ont permis de mettre en évidence des loci associés à une susceptibilité plus importante de développer une LAL et pour la plupart impliquant des gènes ayant des rôles essentiels dans l'hématopoïèse comme **IKZF1**, **ARID5B**, **CEBPE**, **GATA3**, **ERG**, **IKZF3**, **ETV6** et **CDKN2A**, entre autres (14). Il est alors important de remarquer qu'un même gène peut être altéré par des variants germinaux rares ou des polymorphismes mais également par des anomalies somatiques qui seront décrites en détail ultérieurement. (Figure 5).

Un élément important est que ces SNP ont un **effet additif** : alors que la présence d'un seul SNP confère un risque relatif faible (environ 1.5), la combinaison de quatre SNP (**ARID5B**, **IKZF1**, **CEBPE** et **PIP4K2A**) multiplie par 9 le risque de développer une LAL (44).

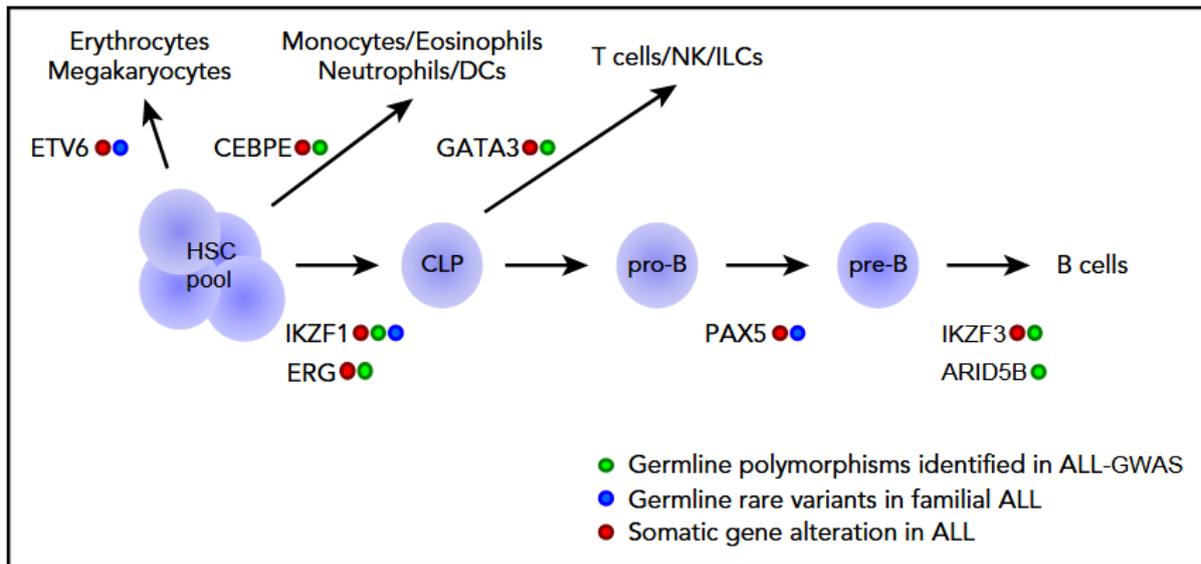


Figure 5 : Altérations génétiques, constitutionnelles ou somatiques, touchant les facteurs de transcriptions impliqués dans l'hématopoïèse (7).

De nombreux facteurs de transcriptions impliqués dans l'hématopoïèse sont associés à la prédisposition aux LAL par des variants génétiques rares ou des polymorphismes. La présence également d'altérations somatiques sur ces gènes montre leur importance la leucémogénèse.

I.3.2. Autres facteurs de risque génétiques

I.3.2.1. Clones pré-leucémiques

Les LAL et principalement les LAL-B sont divisées en de nombreux sous-types définis par leurs altérations génomiques acquises dont les plus fréquentes sont des aneuploïdies et des transcrits de fusion. Des études ont montré que ces anomalies peuvent être acquises dès le stade prénatal, *in utero* (45), et être retrouvées avec un faible nombre de copies (10^{-3} à 10^{-5}), chez 1 à 5% des nouveau-nés (46). Elles entraînent alors la formation de clones pré-leucémiques porteurs de ce premier « *hit* ». Cependant, ces clones ne donneraient lieu à une LAL que chez environ 0.2% des porteurs (47). Cela s'expliquerait par la présence le plus souvent de ces transcrits dans des cellules différenciées incapables d'auto-renouvellement, à la différence des cellules souches hématopoïétiques (CSH) et des progéniteurs précoces. De plus, un deuxième « *hit* » serait nécessaire pour la progression de ces clones pré-leucémiques en réelles LAL (48). Des études complémentaires sont encore nécessaires pour établir le risque relatif de ces clones pré-leucémiques.

I.3.2.2. Epigénétique

A la différence de la génétique qui correspond à l'étude des gènes, de la structure et de la séquence d'ADN, l'épigénétique concerne l'étude des changements, appelés marques épigénétiques, qui affectent l'expression des gènes mais sans modification de la séquence d'ADN (49). Ces marques épigénétiques peuvent être transmises lors des divisions cellulaires et peuvent donc être héritées. Contrairement aux anomalies génétiques, elles sont cependant réversibles. Les anomalies épigénétiques sont principalement liées à la méthylation de l'ADN et à des modifications des histones impactant la condensation de la chromatine.

Plusieurs études suggèrent que les lésions oncogéniques contribuent au développement du cancer en modifiant épigénétiquement la cellule initiatrice du cancer mais qu'elles ne sont pas nécessaires à la progression (50). C'est également le cas pour les hémopathies malignes avec une reprogrammation des progéniteurs ou CSH. Les modifications sont préservées pendant le développement tumoral, même si l'oncogène primaire n'est plus présent, et peuvent rester latentes jusqu'à l'apparition d'une nouvelle stimulation endogène ou environnementale à laquelle les cellules reprogrammées sont plus sensibles (50). C'est par exemple le cas pour le transcrit *ETV6::RUNX1* capable de modifier épigénétiquement une sous-population cellulaire immature et donc d'induire un programme aberrant de différenciation avec transformation tumorale ultérieure (51).

Les marques épigénétiques peuvent également provenir de l'exposition aux facteurs environnementaux.

I.3.3. Facteurs de risque environnementaux

De nombreuses études portent sur l'association entre le risque de LAL et des facteurs environnementaux. Une augmentation du risque a été reconnue pour les facteurs suivants : **sexe masculin** (52), **poids à la naissance très élevé** (53), exposition aux rayonnements ionisants à fortes doses (**radiothérapies**) (54), **chimiothérapies** et **hydrocarbures benzéniques**. En revanche, les résultats n'ont pas encore permis de conclure sur une augmentation du risque avec les facteurs suivants : faibles doses de rayonnements ionisants, champs magnétiques de faible fréquence, exposition aux pesticides, pollution et tabagisme (6).

Après observation du pic d'âge et des « clusters » occasionnels de LAL pédiatriques, **le rôle des infections et de la réponse immune** a également été associé au risque de développer une LAL selon deux modèles :

- Le **mélange de populations de Kinlen** (55), basé sur l'apparition d'épidémie dans une population non exposée à la suite de la délocalisation d'un groupe important d'individus. Cependant, cette hypothèse, très controversée, ne repose que sur un seul virus transformant non rapporté dans la LAL à ce jour (1).

- L'hypothèse d'**infection retardée de Greaves** (56) est un modèle en deux étapes ou « *double hit* ». La première étape est la formation d'un clone pré-leucémique, comme vu précédemment, *in utero*. Puis, en l'absence d'exposition aux infections courantes *in utero* ou en début de vie, l'acquisition du deuxième « *hit* » proviendrait d'une réponse immune aberrante suite à une infection retardée. Cette hypothèse a été appuyée (57,58) ou critiquée en fonction des études (59) mais le système immunitaire et l'exposition ou non aux infections semblent bien jouer un rôle dans la leucémogénèse.

Les facteurs de risque et de prédispositions aux LAL sont multiples et ne sont pas encore totalement élucidés. Les syndromes génétiques constitutionnels sont très importants de par leur impact clinique sur les individus porteurs mais aussi par l'augmentation importante du risque ($RR > 10$) de développer des LAL qu'ils confèrent. A l'inverse, les autres facteurs génétiques et environnementaux confirmés n'augmentent pour la majorité que très peu le risque ($RR < 2$). Leur compréhension est tout de même importante puisqu'elle permet d'avancer encore plus sur la biologie de la LAL et sur la leucémogénèse.

I.4. Physiopathologie des LAL : apport de la génétique

I.4.1. Anomalies génétiques primaires et secondaires

Comme vu précédemment, le développement d'une LAL est un processus multifactoriel. Cependant, le mécanisme principal est l'acquisition de diverses et multiples altérations génétiques. Elles se produisent principalement au sein de progéniteurs lymphoïdes, destinés à s'engager dans la voie de différenciation B ou T, ou parfois dans des CSH ou des lymphocytes immatures naïfs (60). Au cours des dernières années, les nouvelles techniques d'étude génomique à haute résolution ont transformé notre compréhension de la génétique dans la leucémogénèse de la LAL (Figure 6). On distingue deux grands types d'anomalies génétiques dans la LAL : les anomalies initiatrices primaires et les anomalies secondaires coopératrices (61).

Les **anomalies primaires initiatrices** confèrent une capacité d'auto-renouveau à la cellule leucémique, normalement limitée aux CSH, et bloquent la différenciation cellulaire à un stade précis. Elles ont été les premières décrites grâce à la cytogénétique conventionnelle et sont donc bien connues à ce jour (62). En effet, ce sont pour la majorité des **altérations chromosomiques** facilement identifiable au caryotype : des aneuploïdies (gain ou perte de chromosomes) et des translocations récurrentes. L'utilisation de la FISH (fluorescent *in situ* hybridization) depuis de nombreuses années, en complément du caryotype, a permis de mettre en évidence d'autres translocations et oncogènes. L'ensemble de ces réarrangements chromosomiques perturbent des gènes régulant l'hématopoïèse normale et le développement lymphoïde (par exemple *RUNX1* et *ETV6*), activent des oncogènes ou activent de manière constitutive des tyrosines kinases (par exemple, *ABL1*). Ces anomalies sont aussi pour la plupart associées à l'évolution de la maladie et donc utilisées dans la stratification pronostique. Elles ont permis d'établir les premiers sous-groupes de LAL au sein des classifications. Elles sont donc d'une importance capitale pour la pathogénèse mais aussi pour la prise en charge des LAL (63). Cependant, elles entraînent la formation d'un clone pré-leucémique mais sont insuffisantes à elles seules au développement de la LAL dans des modèles expérimentaux. De plus, plusieurs cas de LAL n'ont pas d'anomalie primaire mise en évidence (63).

Des **anomalies secondaires coopératrices** sont donc nécessaires à la leucémogénèse et à la transformation du clone pré-leucémique en véritable LAL. Ce sont des **petites anomalies de structures ou des mutations** qui ont pu être mises en évidence grâce aux analyses haute résolution du nombre de copies de l'ADN et aux techniques de séquençage de nouvelle génération (64). Plus de 50 régions récurrentes avec anomalie du nombre de copies (CNV, copy number variation) ont été identifiées. Les délétions sont plus fréquentes que les gains ou amplifications et sont généralement de petite taille, n'impliquant qu'un gène. Les anomalies secondaires sont plus ou moins associées à certains sous-groupe de LAL ainsi qu'au lignage B ou T. De plus, leur nombre varie notamment en fonction de l'âge au diagnostic : les LAL avec réarrangement de *KMT2A*, fréquentes avant l'âge de 1 an, ont en moyenne 1 anomalie

additionnelle ou moins alors que les LAL avec transcrit *ETV6::RUNX1* ou *BCR::ABL*, retrouvés plus tard dans l'enfance, ont en moyenne 6 à 8 anomalies additionnelles. La plupart ciblent des gènes suppresseurs de tumeurs, des facteurs de transcriptions ou d'autres gènes importants pour la régulation de la lymphopoïèse, le cycle cellulaire et la signalisation. Elles permettent notamment d'augmenter considérablement le potentiel prolifératif des cellules pré-leucémiques et donc la transformation maligne (63). Le fait que des altérations de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et la différenciation soient fréquemment associées suggère que ces deux processus doivent être ciblés indépendamment et simultanément pour déclencher le développement de la LAL (65). Seulement certaines ont un rôle bien établi dans la leucémogénèse, comme les mutations activatrices de *NOTCH1*, en partie à cause du manque de modèle expérimentaux murins (63).

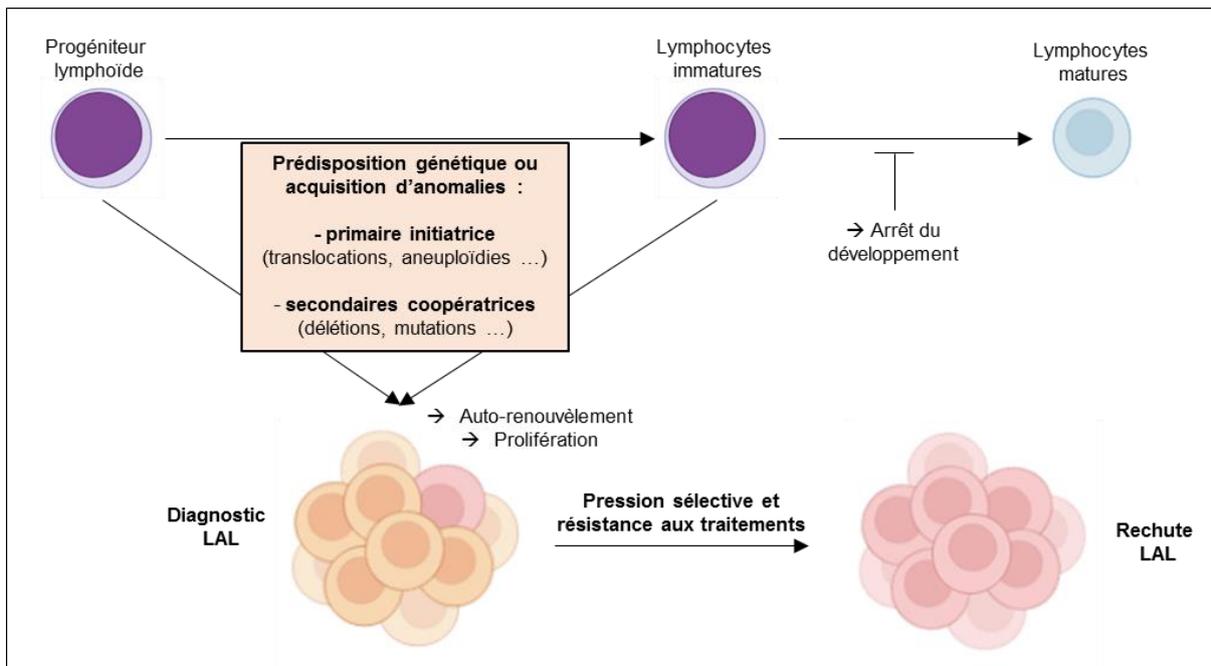


Figure 6 : Représentation simplifiée de la leucémogénèse des LAL, d'après (66).

I.4.2. Hétérogénéité clonale et rechute

De nombreuses études ont montré que la majorité des cas de LAL présentent des modifications et des acquisitions d'altérations génétiques au cours de l'évolution de la maladie. Il existe donc une évolution clonale hétérogène au cours de la progression de la maladie avec des évolutions linéaires ou non. Dans la plupart des cas, le clone à la rechute reste lié génétiquement au clone identifié au diagnostic par la présence de certaines anomalies communes. On peut identifier trois situations principales (67) :

- Dans environ 10% des cas, le clone à la rechute est identique à celui du diagnostic et dans environ 30% des cas, il s'agit d'une évolution clonale avec des anomalies additionnelles.
- Dans la majorité des cas (environ 50%), la rechute est due à un clone pré-leucémique possédant au moins une anomalie identique à celle du clone principal au diagnostic. Il est souvent initialement présent en tant que sous-clone très minoritaire au diagnostic.
- Le moins souvent, la rechute peut correspondre à une nouvelle LAL sans lien génétique avec la première.

Les altérations émergentes à la rechute ou additionnelles confèrent donc probablement une résistance au traitement. C'est le cas pour celles impliquant les gènes *NT5C2* (68) et *PRPS1* (69) associées à une résistance à la mercaptopurine ou les gènes *CREBBP* (70) et *NR3C1* (71) associés à une résistance aux glucocorticoïdes. D'autres gènes candidats associés au risque de rechute ont été identifiés, notamment *TP53* (72).

Au final, la LAL est très hétérogène génétiquement avec des anomalies plus ou moins associées au diagnostic ou à la rechute.

I.5. Présentation clinique

La LAL est le plus souvent d'apparition soudaine bien que certains cas puissent évoluer progressivement sur quelques mois. Les symptômes sont dus à l'infiltration leucémique médullaire et extramédullaire, et leur profondeur varie selon le degré d'envahissement. Les symptômes les plus courants sont la fièvre causée par la leucémie ou une infection secondaire à la neutropénie, la fatigue résultant de l'anémie, des douleurs osseuses et articulaires ainsi que des hémorragies liées à la thrombopénie. Les sites extramédullaires fréquemment atteints sont les ganglions lymphatiques, le foie, la rate et le système nerveux central (SNC). Plus rarement, la LAL peut infiltrer les tissus orbitaux, les testicules, les amygdales et les végétations adénoïdes. Les LBL ou LAL-T sont souvent associées à une masse médiastinale, avec ou sans épanchement pleural, entraînant des difficultés respiratoires et d'autres signes du syndrome de compression de la veine cave supérieure. De rares patients avec LBL-B présentent des lésions cutanées, des adénopathies ou des lésions osseuses discrètes (73).

La présentation clinique de la LAL étant peu spécifique conduit généralement à la réalisation d'un bilan sanguin détectant les cytopénies mais surtout l'infiltration blastique. De multiples analyses biologiques sont ensuite nécessaires pour poser le diagnostic définitif et réaliser une prise en charge optimale.

I.6. Diagnostic biologique

La numération formule sanguine (NFS) réalisée en routine détecte les cytopénies (anémie, neutropénie et thrombopénie) avec le plus souvent une leucopénie mais parfois une hyperleucocytose. D'autres anomalies peuvent être retrouvées sur le bilan de routine comme une hyperuricémie et une augmentation du taux de LDH (lactate déshydrogénase) en corrélation avec la charge leucémique et le degré de lyse tumorale (73). Ces éléments biologiques associés ou non à la présence de blastes dans le sang doivent faire suspecter une LA. La réalisation d'un myélogramme est alors indispensable pour confirmer le diagnostic et réaliser différents examens biologiques complémentaires permettant la caractérisation des blastes sur le plan cytologique, immunophénotypique et génétique. Cette caractérisation est nécessaire à la classification et à la stratification pronostique pour la prise en charge de la LAL.

I.6.1. Cytologie et cytochimie

L'étude morphologique en cytologie est nécessaire pour évaluer l'infiltration blastique et différencier la LAL de la LAM avec l'aide de la myéloperoxydase (MPO) toujours négative pour les LAL. La MPO est positive dans la plupart des LAM et négative dans les leucémies aiguës de lignée ambiguë (MPAL, mixed-phenotype acute leukemia). Hormis la MPO, il n'y a pas d'autres tests de cytochimie utiles à la classification des LAL.

Le pourcentage de blastes médullaires permet de distinguer une LAL d'un LBL. En effet, dans les cas où il y a une infiltration tissulaire et au moins 25% de blastes médullaires, le diagnostic de LAL sera retenu par rapport à LBL (74). Lorsque le pourcentage de blastes médullaire est inférieur mais qu'une infiltration tissulaire est présente, le diagnostic sera alors celui d'un LBL. Les LAL se présentant rarement avec moins de 20% de blastes, taux requis pour un diagnostic de LA (dans le sang et/ou la moelle osseuse), le diagnostic définitif dépendra de la présence d'une infiltration extramédullaire ou de la présence d'une anomalie génétique récurrente comme recommandé par la classification de l'OMS (2).

La première classification des LA, incluant les LAM et LAL, par le **système FAB** (French-American-British) (75) était basée principalement sur les caractéristiques morphologiques des blastes. Cette classification FAB divise les LAL en trois groupes selon quatre critères principaux (76) qui sont le rapport nucléo-cytoplasmique (N/C), la présence de nucléoles, la régularité de la membrane nucléaire et la taille de la cellule par rapport à un lymphocyte normal (Figure 7A) et aux hématies :

- **L1** (le plus fréquent) : les blastes sont de taille petite à intermédiaire avec un cytoplasme peu abondant (haut rapport nucléo-cytoplasmique, N/C), une chromatine condensée et des nucléoles indistincts ou absents (Figure 7B).
- **L2** : les blastes sont de taille plus grande avec un rapport N/C plus modéré, un cytoplasme légèrement basophile, une chromatine plus fine et des nucléoles proéminents (Figure 7C).
- **L3** (le plus rare) : les blastes sont de grande taille avec un cytoplasme basophile abondant (haut rapport N/C) et parfois vacuolisé, une chromatine agglutinée et des nucléoles plus ou moins proéminents. Cette morphologie de blaste doit faire suspecter un lymphome de Burkitt plutôt qu'une LAL. Le diagnostic différentiel sera fait par les analyses complémentaires.

D'autres variantes morphologiques ont été décrites mais sans impact pronostique : les blastes peuvent présenter des granules rose pâle ou azurophiles (LAL granulaire), des inclusions géantes, des projections cytoplasmiques (LAL à cellules en miroir). De plus, une éosinophilie associée peut orienter sur une anomalie génétique spécifique, t(5;14)(q31;q32) avec réarrangement *IL3::IGH* ou bien un réarrangement impliquant *FGFR1*.

Cette classification basée sur la morphologie est cependant très limitée et ne permet notamment pas de distinguer les LAL-B et LAL-T. Une **classification de l'OMS** a donc été proposée en 1997 prenant en compte en plus de la morphologie, les caractéristiques immunophénotypiques et génétiques (77). Trois sous-types de LAL étaient initialement définis : LAL-B, LAL-T et leucémie de Burkitt. Le dernier sous-type a ensuite été retiré et classé avec les hémopathies B matures en tant que lymphome de Burkitt lors de la révision en 2008 de la classification OMS (74). Les révisions suivantes de cette classification portent sur les anomalies génétiques décrites au fur et à mesure et seront donc traitées dans la partie correspondante du manuscrit.

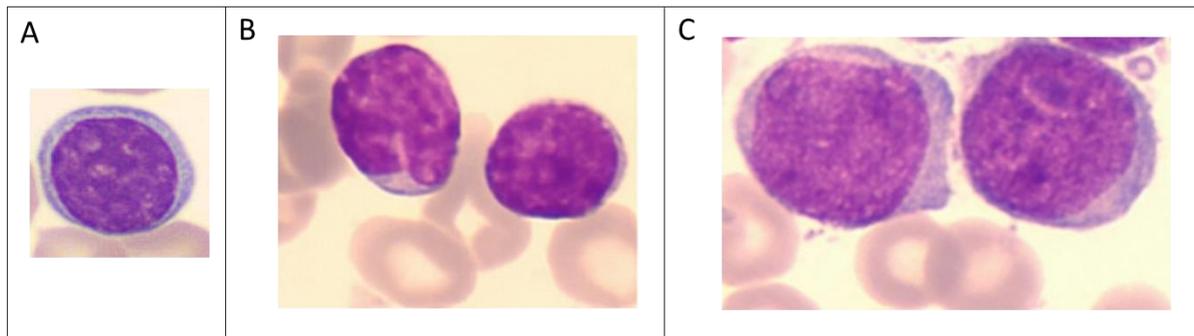


Figure 7 : Morphologie d'un lymphocyte normal (A) et de blastes de type L1 (B) ou L2 (C).

Les images sont obtenues par observation microscopique avec objectif x100.

I.6.2. Immunophénotypage

Les cellules hématopoïétiques possèdent, à la surface (s) ou en intra cytoplasmique (c), des marqueurs ou clusters de différenciation (CD) pouvant être reconnus par des anticorps (Ac). Ces marqueurs sont utilisés en cytométrie en flux (CMF) pour l'identification des cellules normales ou pathologiques comme les blastes. Le Consortium EuroFlow a standardisé l'utilisation de la CMF en routine hématologique (78).

La CMF occupe une place majeure dans le diagnostic puisqu'elle permet de confirmer la nature blastique (immature) des cellules tumorales, de différencier les LAL des LAM, d'établir le lignage (LAL-B ou T) et le niveau de différenciation, de définir un phénotype aberrant utilisé pour le suivi de la maladie résiduelle (MRD, measurable residual disease) et de détecter des cibles antigéniques pour l'immunothérapie.

La CMF a permis d'obtenir **la classification EGIL** (European Group for the Immunological Characterization of Leukaemias) (79), basée sur l'immunophénotype des blastes et leur stade de différenciation, avec 4 sous-types de LAL-B et 4 sous-types de LAL-T. Un autre marqueur, la terminal deoxynucleotidyl transférase (**TdT**), est très important puisqu'il est exprimé par les blastes lymphoïdes mais absent des blastes myéloïdes et des cellules matures.

Une **LAL de lignage B** est définie par la présence d'au moins deux des marqueurs B principaux : **CD19, CD22 et cCD79a**. La présence ou l'absence de marqueurs B additionnels permet ensuite de différencier les sous-types selon la maturation :

- **BI ou pro-B** : CD19, CD22, cCD79a
- **BII ou commune** : CD19, CD22, cCD79a et **CD10**
- **BIII ou pré-B** : CD19, CD22, cCD79a, CD10 et **clgM** (chaîne lourde mu)
- **BIV ou mature** : CD19, CD22, cCD79a, CD10 et **slg** ou chaîne légère

Comme dit précédemment, le phénotype BIV ou mature correspond le plus souvent au lymphome de Burkitt qui n'est plus classé avec les LAL. Cependant le diagnostic différentiel entre LAL et Burkitt peut parfois être difficile du fait d'une hétérogénéité phénotypique des LAL et de la présence très rarement dans les LAL-B d'un réarrangement *IG::MYC* caractéristique des lymphomes de Burkitt. La TdT est alors utile puisqu'elle est négative pour le Burkitt et positif pour la LAL. L'analyse précise des caractéristiques morphologiques, phénotypes et génétiques permet alors de faire la différence.

Une expression aberrante de marqueurs myéloïdes (CD13 et CD33) est détectée dans environ 40% des cas, en général en association avec certaines anomalies génétiques. Cette expression n'a pas d'impact pronostique (80) mais sert pour l'étude de la MRD.

De plus, le CD20, marqueur spécifique du lymphocyte à partir du stade pré-B, est exprimé dans environ un tiers des LAL-B. Malgré des résultats conflictuels, de nombreuses études associent son expression à un pronostic défavorable avec un risque augmenté de rechutes (81).

Une **LAL de lignage T** est définie par la présence des marqueurs T principaux : **cCD3 et sCD7**. La présence ou l'absence de marqueurs T additionnels permet ensuite de différencier les sous-types selon la maturation :

- **TI ou pro-T** : cCD3 et sCD7
- **TII ou pré-T** : cCD3, sCD7 et **CD2, CD5, CD4 et/ou CD8**
- **TIII ou corticale** : cCD3, sCD7, CD2, CD5, CD4 et/ou CD8 et **CD1a**
- **TIV ou mature** : cCD3, sCD7, CD2, CD5, CD4 et/ou CD8 et **sCD3**

Une nouvelle entité de LAL-T, appelée **ETP (early-T precursor)-LAL** (82), est maintenant décrite dans les classifications récentes. Elle provient de précurseurs T très immatures ayant conservé leur potentiel de différenciation multi lignage. Elle est retrouvée respectivement chez 15 et 35% des LAL-T pédiatriques et adultes. Elle est caractérisée par l'absence de CD4, CD8 et CD1a mais par **l'expression faible du CD5 et d'au moins un marqueur myéloïde ou de CSH** (CD34, CD33, CD13, CD11b, CD65 et/ou HLA-DR). L'identification de cette entité est importante puisqu'elle est associée à un plus mauvais pronostic même si l'intensification du traitement pourrait améliorer la survie (83). Cette entité, définie par le phénotype, est large et peut inclure des LAL TI et TII.

Comme pour la LAL-B, des marqueurs myéloïdes aberrants peuvent également être retrouvés (80).

Dans 1 à 5% des LA, il peut y avoir deux populations blastiques de lignage différent phénotypiquement ou bien co-expression de marqueurs forts de lignage myéloïde, B ou T (84). Ces deux situations ont été regroupées sous la définition de **LA de phénotype mixte (MPAL, mixed-phenotype acute leukemia)** dans la classification OMS de 2008 (74). Les caractéristiques nécessaires ainsi que les entités appartenant à ce groupe ont ensuite été révisées dans les versions suivantes de 2016 et 2022 (85,86). Les MPAL sont actuellement classées dans la catégorie des **LA de lignage ambigu (ALAL)** séparée en deux : les ALAL définies par une anomalie génétique récurrente ou les ALAL définies uniquement par le phénotype (Tableau 1).

Bien que les LAL soient relativement homogènes au niveau morphologique et phénotypique, elles présentent une hétérogénéité importante du point de vue génétique qui ne cesse de s'accroître avec l'utilisation des nouvelles techniques à haute résolution.

Tableau 1 : Leucémie aiguë de lignage ambigu, adapté de la classification OMS 2022 (86).

Leucémie aiguë de lignage ambigu définie par une anomalie génétique
Leucémie aiguë de phénotype mixte avec fusion BCR::ABL1
Leucémie aiguë de phénotype mixte avec réarrangement KMT2A
Leucémie aiguë de lignage ambigu définie par une autre anomalie génétique
Leucémie aiguë de phénotype mixte avec réarrangement ZNF384
Leucémie aiguë de lignage ambigu avec réarrangement BCL11B
Leucémie aiguë de lignage ambigu définie par l'immunophénotypage
Leucémie aiguë de phénotype mixte, B/myéloïde
Leucémie aiguë de phénotype mixte, T/myéloïde
Leucémie aiguë de phénotype mixte, autres sous-types rares
Leucémie aiguë de lignage ambigu, non spécifié autrement
Leucémie aiguë indifférencié

I.6.3. Génétique

Les LAL sont des hémopathies génétiquement hétérogènes caractérisées par de multiples anomalies chromosomiques et moléculaires qui ont enrichi les dernières classifications au fur et à mesure des mises à jour grâce à l'essor et l'apport de nouvelles techniques d'analyse. Par exemple, il existe dans la classification OMS en cours 12 sous-types de LAL-B identifiés par leur altération génétique.

I.6.3.1. Génétique des LAL-B

Les LAL-B sont divisées selon les classifications récentes OMS 2022 (2) et ICC (International Consensus Classification) 2022 (87) (Annexe 1) en sous-types génétiques caractérisés par les anomalies primaires récurrentes. Les premiers décrits grâce à la cytogénétique concernent principalement des altérations chromosomiques de type aneuploïdies ou réarrangements structurels. Ceux décrits ultérieurement ont plutôt des anomalies souvent cryptiques en cytogénétique conventionnelle voire des mutations ponctuelles. Il apparaît aussi la notion de sous-types « *like* » dont les signatures transcriptomiques sont proches de l'anomalie primaire originale. Ces anomalies primaires entraînent la dérégulation de protéines par la formation de gènes chimériques ou la surexpression de gènes en les juxtaposant avec des *enhancers* forts. Les gènes principalement touchés codent pour des facteurs de transcription hématopoïétiques, des marques épigénétiques, des récepteurs de cytokines ou des tyrosines kinases. L'identification de ces anomalies primaires selon les classifications est primordiale pour la stratification pronostique.

Les anomalies secondaires, principalement des CNV et quelques mutations ponctuelles, contribuent également à la leucémogénèse. Elles ne suffisent pas à elles seules à définir un sous-type génétique mais elles peuvent avoir un impact pronostique (1).

Les caractéristiques principales des anomalies génétiques primaires des LAL-B (prévalence, pronostic, anomalies secondaires associées, perspectives de thérapies ciblées et techniques conventionnelles utilisées pour leur détection) sont résumées dans le tableau 2. Leur détection ou non par Optical Genome Mapping, technique qui sera présentée en partie II, est également précisée.

Tableau 2 : Caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-B.
 OGM = Optical Genome Mapping, del = délétion, mut = mutation

Entité génétique (anomalie primaire)	Prévalence	Pronostic	Anomalies secondaires	Perspectives de thérapie ciblée	Techniques conventionnelles	OGM
Anomalies du nombre de chromosomes (Aneuploïdies)						
High hyperdiploidy (HeH) Nombre modal : 51 à 67 Trisomies classiques : 4,6,10,17,18,21	Enfant : 30% Adulte : 2-4%	Favorable	<i>CREBBP</i> (mut/del), voie <i>RAS</i> (mut)		Caryotype / FISH CGH/SNP-array	Oui
Low hypodiploidy (LH) / Near-triploidy (Ho/Tr) Nombre modal : 30 à 40 / 60 à 80 Pertes classiques : 3,7,9,13,17 Duplication du clone fréquente	Enfant : <1% Adulte : 5-10%	Défavorable	<i>TP53</i> (mut, souvent constitutionnelle) <i>IKZF2</i> (del), <i>RB1</i> (del)	inhibiteurs <i>BCL2</i>	Caryotype / FISH CGH/SNP-array	Oui
Near-haploidy (NH) Nombre modal : 23 à 29 Absence de perte pour : X,14,18,21 Duplication du clone fréquente	Enfant : <1%	Défavorable	<i>IKZF3</i> (del) voies <i>RAS</i> (mut)	inhibiteurs <i>BCL2</i>	Caryotype / FISH CGH/SNP-array	Oui
Anomalies de structure récurrentes et entités phéno-identiques						
iAMP21						
Amplification/Chromothripsis 21q Gène cible : <i>RUNX1</i> >3 copies (mitoses) ou 5 (noyaux)	Enfant : 2% Adulte : 1%	Défavorable	<i>CRLF2::P2RY8</i> <i>RB1</i> (del) voie <i>RAS</i> (mut) +X, caryotype complexe	inhibiteurs <i>MEK1/2</i>	FISH CGH/SNP-array	Oui
BCR::ABL1 (Ph+) / t(9;22)(q34;q11)	Enfant : 3% Adulte : 30%	Défavorable	délétions : <i>IKZF1</i> , <i>CDKN2A/B</i> , <i>PAX5</i>	ITK (recommandé)	Caryotype / FISH RT-qPCR	Oui
BCR::ABL1-like (Ph-like) - réarrangements famille <i>ABL</i> : (<i>ABL1</i> , <i>ABL2</i> , <i>CSF1R</i> , <i>PDGFRA/B</i>) - réarrangements famille <i>JAK-STAT</i> : (<i>CRLF2</i> , <i>JAK2</i> , <i>EPOR</i>)	Enfant : 10-15% Adulte : 25-30%	Défavorable	<i>IKZF1</i> (del)	ITK inhibiteurs <i>JAK</i>	FISH RNAseq	Oui
Réarrangements <i>KMT2A</i>						
(<i>KMT2A-r</i>) / t(v;11q23) <i>KMT2A::AFF1</i> / t(4;11)(q21;q23) Autres partenaires : <i>MLLT1</i> , <i>MLLT3</i> ... Entité <i>KMT2A</i> -like décrite (rare)	Nourrissons : 80% Enfant : 5-10% Adulte : 10-15%	Défavorable	voie <i>RAS</i> (mut)	inhibiteurs <i>BCL2</i> , ménine, <i>DOTL1</i>	Caryotype / FISH RT-qPCR	Oui
ETV6::RUNX1 / t(12;21)(p13;q22)	Enfant : 25% Adulte : 1%	Favorable	del12p (<i>ETV6</i>), del9p (<i>PAX5</i> , <i>CDKN2A/B</i>), del6q, +21, <i>WHSC1</i> (mut)		FISH RT-qPCR	Oui
ETV6::RUNX1-like Réarrangements <i>ETV6</i> , <i>RUNX1</i> ou autres gènes	Enfant : 3% Adulte : <1%	Favorable	Anomalies <i>ETV6</i> et <i>IKZF1</i> , +21		FISH RNAseq	Oui
TCF3::PBX1 / t(1;19)(q23;p13) Souvent der(19)t(1;19)	3-5%	Intermédiaire	gain 1q del9p ou i(9q)		Caryotype / FISH RT-qPCR	Oui
TCF3::HLF / t(17;19)(q22;p13) Clinique : CIVD, hypercalcémie Souvent der(19)t(17;19)	<1% (jeunes adultes)	Défavorable	<i>PAX5</i> (del)	inhibiteurs <i>BCL2</i>	FISH RT-qPCR	Oui
IGH::IL3 / t(5;14)(q31;q32) Hyperéosinophilie	<1% (jeunes adulte, homme)	Intermédiaire	<i>IKZF1</i> (del)		FISH RT-qPCR	Oui

Tableau 2 (suite) : Caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-B.
 OGM = Optical Genome Mapping, del = délétion, mut = mutation

Entité génétique (anomalie primaire)	Prévalence	Pronostic	Anomalies secondaires	Perspectives de thérapie ciblée	Techniques conventionnelles	OGM
Nouvelles entités (B-others) : autres réarrangements ou mutations ponctuelles						
Réarrangements DUX4 Partenaires : /GH, ERG (rare) ins(14;4)(q32;q35q35) / t(4;14)(q35;q32) Phénotype particulier : CD2+, CD371+	Enfant : 5% Adulte : 5-10%	Favorable	délétion : ERG (50%), IKZF1		RNAseq Immunohistochimie	Limité (del ERG)
Réarrangements ZNF384 / t(v;12p13) Partenaires : EP300, TCF3, TAF15, CREBBP ... Phénotype MPAL fréquent	3-5% (jeunes adultes)	Intermédiaire (meilleur avec EP300)			RNAseq	Oui
Réarrangements MEF2D t(1q22;v) et del(1)(q21q22) Partenaires : BCL9, HNRNPUL1, DAZAP1 ...	3-5% (jeunes adultes, femme)	Intermédiaire à défavorable	del9p	inhibiteurs HDAC	FISH RNAseq	Oui
Réarrangement NUTM1 / t(v;15q14) Partenaires : ACIN1, CUX1, BRD9, ZNF618 ...	Nourrissons : 4% Enfant : <1%	Favorable			FISH RNAseq	Oui
Réarrangements MYC Partenaires : /GH, IGL, IGH Peut être secondaire	<1%	Défavorable	Gain 1q Réarrangements BCL2 et/ou BCL6		Caryotype / FISH	Oui
Réarrangements CEBPA/B/D/E/G Partenaire : /GH Peut être secondaire	1%	Intermédiaire (variable)			Limité	Oui
Entité provisoire : /GH::CEBPE/ZEB2 H1038R						
Altérations de PAX5 (PAX5-alt) - Réarrangements PAX5 / t(v;9p13) / dic(9p13) Partenaires : ETV6, NOL4L ... - Gains : PAX5-ITD et PAX5amp - Mutations (horx P80R)	Enfant : 10% Adulte : 5%	Intermédiaire	del9p (PAX5, CDKN2A/B)		RNAseq, NGS FISH (fusion et amp)	Oui, hors mutations
Réarrangement UBTF et délétion CDX2 del(17)(q21.3) : UBTF::ATXN7L3 del(13)(q12.2) : surexpression CDX2	2% (jeunes adultes, femme)	Défavorable	Gain 1q		RNAseq	Oui
PAX5 P80R	Enfant : 2% Adulte : 4%	Intermédiaire à favorable	PAX5 (mut/del), CDKN2A/B (del), voies RAS et JAK/STAT (mut)		NGS	Non
IKZF1 N159Y	<1%	Non décrit	+21		NGS	Non

I.6.3.1.1. Anomalies primaires cytogénétiques et moléculaires

Ces anomalies primaires ont été définies en deux temps. Tout d'abord par les techniques cytogénétiques et moléculaires classiques pour les aneuploïdies et les réarrangements de structure qui sont des entités à part selon l'OMS. Puis, plus récemment par l'avènement des techniques de séquençage et l'étude des profils d'expression génique (Figure 8) pour les nouveaux sous-types, souvent rassemblés sous le terme de « B-others », qui commencent à faire leur entrée dans les classifications OMS et ICC. La fréquence de certaines anomalies entre les LAL-B pédiatriques et adultes est variable. En effet, les anomalies de pronostic favorable (Hyperdiploïdie et *ETV6::RUNX1*) sont majoritaires en pédiatrie alors que celles de pronostic défavorables le sont chez l'adulte (*BCR::ABL 1*/like et *KMT2A-r* principalement).

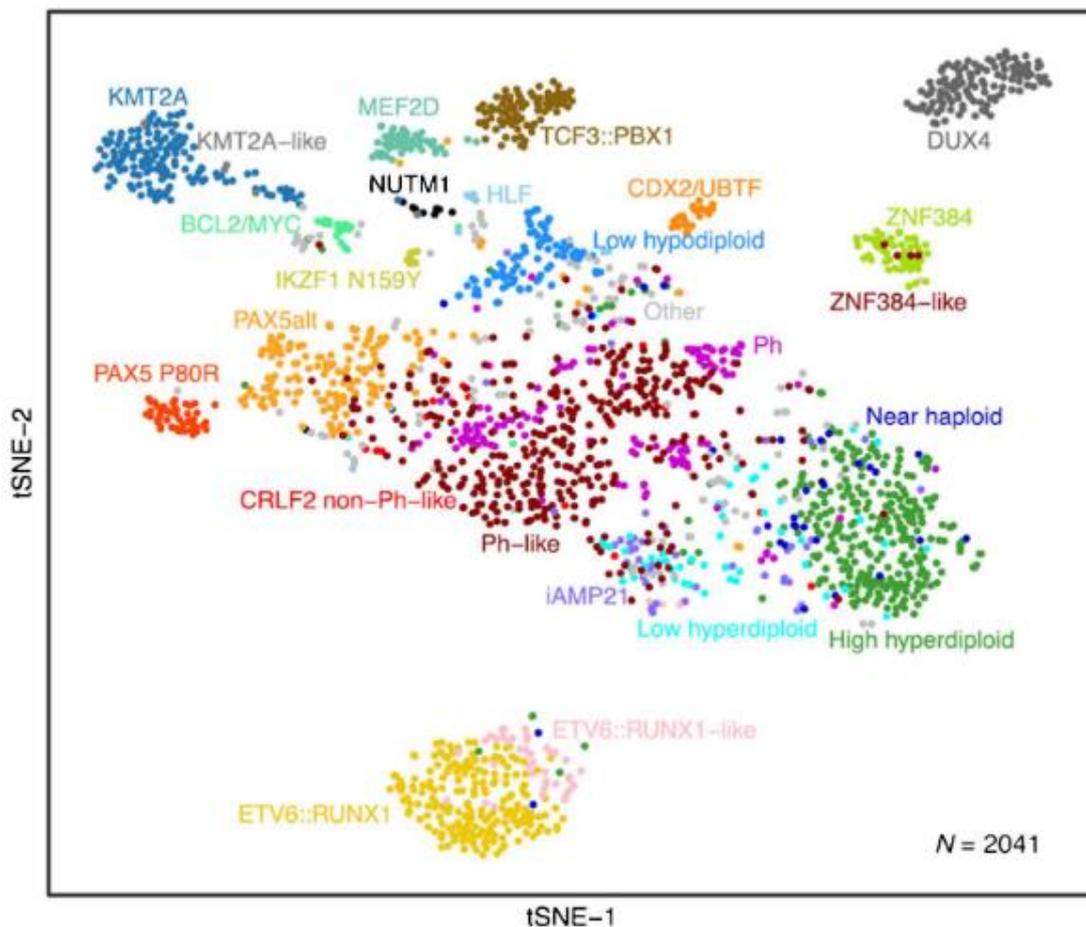


Figure 8 : Sous-groupes génétiques récurrents selon les profils d'expression génique (88).

La visualisation des données transcriptomiques de 2041 LAL, grâce à la méthode tSNE (t-distributed stochastic neighbor) de réduction de dimension, met en évidence des clusters correspondant aux différentes entités génétiques.

Anomalies du nombre de chromosomes (aneuploïdies) :

Deux entités sont reconnues dans la classification OMS selon le nombre modal de chromosomes : l'hyperdiploïdie élevée et l'hypodiploïdie. L'ICC divise cette dernière en deux sous-entités : hypodiploïdie faible et para-haploïdie.

- **Hyperdiploïdie élevée (HeH, high hyperdiploidy)**

Elle correspond à un nombre modal de chromosomes allant de 51 à 67 (un caryotype diploïde normal en possédant 46). C'est l'entité de type cytogénétique la plus fréquente chez la pédiatrie avec environ 30% des cas et elle est associée à un **pronostic favorable** (89). Sa fréquence est en revanche beaucoup plus faible chez l'adulte, de 2 à 4%(90). Afin de considérer cette anomalie comme principale, on ne doit pas retrouver une autre anomalie stratifiante associée, notamment un remaniement *BCR::ABL 1*. On retrouve en général plus de 54 chromosomes avec un profil caractéristique : gain des chromosomes X, 4, 6, 10, 14, 17, 18 et 21. Un nombre modal plus élevé ainsi que la présence des trisomies 4, 10, 17 et 18 sont associés à un meilleur pronostic (91) alors que l'absence des trisomies 17 et/ou 18 ainsi que la présence de trisomies 5 et/ou 20 sont associées à un moins bon pronostic(92). La présence de mutations dans le régulateur épigénétique *SETD2* entraînent également un moins bon pronostic (93). De plus, bien que les HeH soient globalement de bon pronostic, environ 15% des cas rechutent et les altérations du régulateur épigénétique *CREBBP* sont une des causes mises en évidence car en proportion importante dans ce groupe au diagnostic et encore plus à la rechute (94). Des mutations souvent sous-clonales de gènes de la voie RAS sont également fréquentes (95).

- **Hypodiploïdie**

L'hypodiploïdie dans la LAL-B est définie par un nombre de chromosomes inférieur ou égal à 40. On parlera d'**hypodiploïdie sévère (LH, low hypodiploidy)** et de **para-haploïdie (NH, near-haploidy)** pour 30 à 40 chromosomes et 23 à 29 chromosomes respectivement. Les pertes chromosomiques ne sont pas aléatoires et ciblent principalement les chromosomes 2, 3, 4, 7, 9, 12, 13, 15 et 17. Un phénomène particulier, une endoréplication (réplication de l'ADN du noyau sans division), se produit souvent pour ces deux sous-types entraînant la présence de tétrasomies et de disomies uniparentales (UPD). Ceci entraîne un diagnostic difficile lorsque le clone hypodiploïde n'est pas observé. En général, le clone dupliqué est plus fréquent au diagnostic et le clone hypodiploïde initial à la rechute. Dans le cas où le clone dupliqué est visible, il faut arriver à le distinguer de l'HeH car le pronostic est opposé. Mais cela est possible en analysant le profil chromosomique avec principalement des trisomies pour l'HeH et des tétrasomies pour les hypodiploïdies. Le sous-type LH est également appelé **hypodiploïdie sévère/para-triploïdie (Ho-Tr)** car avec la duplication du clone, le nombre modal est de 60 à 80 chromosomes (96).

Les deux types d'hypodiploïdies (LH et NH), de **mauvais pronostic** (96), sont rares chez l'enfant (0.5%) mais la fréquence augmente avec l'âge (6 à 9% chez l'adulte) (90). Elles présentent des différences au niveau du profil moléculaire : i) les NH sont associées à des altérations des voies *RAS* et tyrosine kinase (71%) et du facteur de transcription *IKZF3* (13%) alors que ii) les LH sont caractérisés par la présence d'une mutation de *TP53* (91%), constitutionnelle dans la moitié des cas, et des altérations de *IKZF2* (53%) et de *RB1* (41%) (97).

Anomalies chromosomiques de structure :

Dans ces anomalies, on retrouve, hormis un cas particulier d'amplification, des translocations induisant la formation de gènes de fusions.

- **Amplification intrachromosomique du chromosome 21 (iAMP21)**

Ce groupe représente 2% et 1% des LAL-B pédiatriques et adultes respectivement, avec principalement des enfants plus âgés et jeunes adultes. Il est de **mauvais pronostic** mais amélioré par un traitement plus intensif (98). L'iAMP21 se définit par un chromosome 21 anormal généré par une instabilité chromosomique (breakage-fusion-bridge et chromothripsis) à l'origine d'amplifications, inversions et délétions du bras long (21q). La région principalement amplifiée concerne le gène *RUNX1* en 21q22.1, les sondes de FISH ciblant ce gène sont donc un outil de diagnostic important pour ce groupe puisque le chromosome 21 anormal ou der(21) n'est pas toujours identifiable au caryotype. Un profil d'amplification spécifique en FISH est nécessaire pour parler d'iAMP21 : au moins 3 signaux supplémentaires de *RUNX1* sur le der(21) en FISH métaphasique et/ou au moins 5 signaux *RUNX1* dont 4 en clusters au minimum en FISH interphasique (c'est-à-dire sur noyaux) (99). La mise en évidence récemment de formes atypiques, avec une amplification *RUNX1* sur un autre chromosome ou un nombre de signaux inférieurs, pourrait conduire à des modifications de cette définition (100). Des anomalies cytogénétiques additionnelles (ACA) sont présentes dans 80% des iAMP21 avec principalement un gain du chromosome X (+X) et des anomalies de structure des régions 1q, 7q, 9p, 11q et 12p au sein souvent d'un caryotype complexe (98). Des anomalies secondaires moléculaires sont également fréquentes avec délétions des gènes *RB1*, *IKZF1*, *ETV6*, *CDKN2A/B* et *SH2B3* ; fusion *P2RY8::CRLF2* ou encore des mutations dans la voie RAS (101). Ces dernières sont une perspective de thérapie ciblée et des résultats précliniques avec un inhibiteur de MEK1/2, le selumetinib, sont encourageants (102). Comme vu dans la partie sur les prédispositions, la présence d'une anomalie constitutionnelle impliquant le chromosome 21 est associée à un haut risque de développer une LAL-B iAMP21 (13).

- **t(9;22)(q34;q11)/BCR::ABL1**

La translocation entre les chromosomes 9 et 22, impliquant le gène *BCR* (22q11) et la tyrosine kinase *ABL1* (9q34) et entraînant la formation du **chromosome Philadelphie (Ph)**, a d'abord été décrite comme l'évènement génique responsable de la leucémie myéloïde chronique (LMC). Mais elle est également présente dans les LAL alors nommées **LAL Ph+**. Ce réarrangement entraîne l'activation constitutive d'*ABL1*. Relativement rare en pédiatrie (3%), cette anomalie cytogénétique est la plus fréquente chez les adultes avec une incidence de 20-25%, augmentant avec l'âge jusqu'à 50% pour les plus de 50 ans. L'immunophénotype est souvent celui d'une LAL-B commune avec une possible expression aberrante de marqueurs myéloïdes (CD13 et/ou CD33). La t(9;22) peut se retrouver dans les MPAL. Deux transcrits *BCR::ABL1* principaux sont retrouvés, le m-BCR (66%) et M-BCR (33%). La t(9;22) est associée à un **mauvais pronostic** qui a été largement amélioré par l'ajout des inhibiteurs de tyrosine kinase (ITK) à l'arsenal thérapeutique (103). Des ACA sont observés dans plus de 60% des cas avec la duplication du Ph, une trisomie 8, des pertes totales ou partielles des chromosomes 7 et 9 mais également des hyperdiploïdies (104). Les CNV sont également fréquents dans ce groupe avec principalement les délétions de *IKZF1*, *CDKN2A/B* et *PAX5*. L'impact sur le pronostic des ACA et des CNV est controversé selon les études (105).

- **t(v;11q23)/KMT2A-r**

Les réarrangements de *KMT2A* (*KMT2A-r*) (11q23), anciennement appelé **MLL**, impliquant de multiples partenaires, représentent environ 10% des cas de LAL-B totaux (106). Leur fréquence est la plus importante chez les nourrissons (80%) puis chez les adultes plus âgés (15%). Les LAL-B *KMT2A-r* ont en général une forte hyperleucocytose, un phénotype pro-B

avec expression de marqueurs myéloïdes. Elles sont de **mauvais pronostic** (107). Les *KMT2A-r* peuvent se retrouver dans les MPAL. Les partenaires les plus fréquents, par ordre de fréquence, avec les translocations respectives sont : *AFF1/t(4;11)(q21;q23)*, *MLLT1/t(11;19)(q23;p13.3)*, *MLLT3/t(9;11)(p22;q23)* et *MLLT10/t(10;11)(p12;q23)* (105). En plus du nombre très importants de partenaires possibles, certaines translocations sont cryptiques au caryotype. L'utilisation de la FISH est donc obligatoire pour la détection des *KMT2A-r* et elle requiert une expertise suffisante devant des résultats de FISH atypiques comme des délétions isolées de la partie 3' de *KMT2A* visibles dans 10% des cas (108). Les LAL *KMT2A-r* ont un taux de mutation somatique extrêmement faible par rapport à d'autres entités, particulièrement chez les nourrissons, et les mutations présentes touchent principalement les voies PI3K et Ras (109). Les ACA et CNV sont peu fréquents dans ce groupe avec surtout une +X (90) et des délétions de *CDKN2A/B* (110). L'ajout de blinatumomab à la chimiothérapie a montré une efficacité chez les nourrissons (111) et des perspectives de thérapies ciblées existent avec par exemple les inhibiteurs de *BCL2* (car surexpression de *BCL2* induite par les transcrits de fusion), de ménine (interaction avec le transcrite de fusion nécessaire à la leucémogénèse) et de *DOT1L* (rôle dans la surexpression de *BCL2* via méthylation)(112).

- **t(12;21)(p13;q22)/ETV6::RUNX1**

La t(12;21) représente environ 25% des LAL-B pédiatriques et elle est exceptionnelle après 25 ans. Son phénotype est B commun avec fréquemment une expression de marqueurs myéloïdes aberrants (2). Elle entraîne la fusion entre les gènes *ETV6* (12p13), anciennement *TEL*, et *RUNX1* (21q22), anciennement *AML1*. Elle est cryptique au caryotype et nécessite donc l'utilisation de la FISH ou RT-qPCR (PCR quantitative après transcription inverse) pour son identification en routine. Elle est de **pronostic favorable** avec de très bonnes réponses au traitement (89). Des ACA sont retrouvés dans 90% des cas, sans impact pronostique, avec principalement une délétion 12p (incluant la perte de la deuxième copie d'*ETV6*) mais également délétion 9p (*PAX5* et/ou *CDKN2A/B*), délétion 6q, trisomie 21, duplication du dérivé 21 et tétraploïdie (113). Des mutations de *WHSC1* sont particulièrement retrouvées dans ce groupe et celles du régulateur épigénétique *TBL1XR1* ont été associées à un pronostic moins favorable (93).

- **t(1;19)(q23;p13)/TCF3::PBX1**

La t(1;19) fusionne les gènes *TCF3* (19p13.3), anciennement appelé *E2A*, et *PBX1* (1q23.3) (114). Retrouvée dans 3 à 5% des LAL-B pédiatriques, elle est associée principalement à un phénotype pré-B (2). Cette translocation présente une particularité en cytogénétique : le plus souvent elle est déséquilibrée avec au caryotype seulement le dérivé 19, der(19)t(1;19) et donc deux chromosomes 1 normaux. Elle a d'abord été associée à un mauvais pronostic avec un risque élevé de rechute au niveau du SNC mais avec l'intensification des traitements elle est maintenant de **pronostic intermédiaire**. Pour les ACA, elle est associée à la présence de gains 1q expliqués par la présence du der(19) mais également de délétions 9p souvent sous la forme d'un isochromosome 9q, i(9)(q10) (90). Bien que visuellement identifiable au caryotype, la confirmation en FISH ou moléculaire est nécessaire car des t(1;19) proches mais n'impliquant pas les gènes *TCF3* et *PBX1* sont retrouvées secondairement dans les LAL-B HeH ou Ph+. Rarement, d'autres partenaires de *TCF3* sont également possibles comme *ZNF384* (12p13.3).

- **t(17;19)(q22;p13)/TCF3::HLF**

Une deuxième entité concerne aussi le gène *TCF3* mais avec *HLF* (17q22) comme partenaire. Bien que très rare, moins de 1% des LAL-B, cette entité a été incluse dans la classification OMS du fait de son **mauvais pronostic**. On la retrouve surtout chez les adolescents et jeunes adultes avec parfois des présentations cliniques particulières : hyperleucocytose, hypercalcémie, coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) et atteinte du SNC (105). Difficilement visualisable au caryotype, l'identification de la t(17;19) nécessite la FISH ou des techniques moléculaires (114). Comme pour la t(1;19), dans certains cas, seul le dérivé 19, der(19)t(17;19), est présent. De plus, cette entité est souvent associée à une haploinsuffisance de *PAX5* par délétion (115). Malgré son pronostic, des perspectives de traitement ont été proposées avec le venetoclax ou encore le blinatumomab (Ac monoclonal bispécifique anti CD19) pour permettre à terme une allogreffe de CSH (116).

- **t(5;14)(q31;q32)/IGH::IL3**

La t(5;14) juxtapose le locus *IGH* (14q32) au gène de l'interleukine-3 (IL-3) induisant une surproduction d'IL-3 responsable d'une hyperéosinophilie importante. L'étude morphologique nécessite alors une attention particulière. La plupart des patients sont des jeunes adultes de sexe masculin. Des délétions de *IKZF1* sont fréquentes. Cette entité est considérée de **pronostic intermédiaire** mais la survie dépend également de l'impact de l'hyperéosinophilie induisant de multiples dommages viscéraux (117).

Autres réarrangements avec gènes de fusion :

Les réarrangements suivants, majoritairement cryptiques au caryotype, ont principalement été identifiés grâce aux techniques de séquençage. Ils forment de nouvelles entités reconnues, ayant des profils d'expression génique différents des précédentes entités décrites (Figure 8). Ces entités sont incluses pour la plupart dans l'ICC 2022 (87), bien que souvent comme entité provisoire dans l'attente d'informations additionnelles. L'OMS 2022 les classe pour l'instant dans le groupe des « B-ALL with other defined genetic abnormalities » (2).

- **Réarrangements de *DUX4* (*DUX4-r*)**

Les *DUX4-r* représentent au moins 4% et 6% des LAL-B pédiatriques et adultes avec principalement des jeunes adultes. Ils sont de **pronostic favorable**. Le gène *DUX4* est localisé dans une région sub-télomérique et répétée de l'ADN (D4Z4), avec 10 à 100 copies en moyenne, en 4q35 et 10q26. Cela rend la détection d'un réarrangement complexe. C'est un facteur de transcription régulant le développement embryonnaire qui n'est pas exprimé dans les cellules B normales (118). Les réarrangements consistent en l'insertion d'une copie de *DUX4* au sein du locus *IGH*. De rares fusion avec *ERG* sont également décrites (119). Dans les deux cas, cela aboutit à la surexpression de *DUX4* par les régions régulatrices du gène partenaire. Cette surexpression de *DUX4* entraîne une dérégulation du facteur de transcription *ERG* (21q22). Cela est dû à la fixation du *DUX4* sur un site alternatif d'initiation de la transcription localisé dans l'intron 6 de *ERG* et l'expression d'une isoforme altérée de *ERG* (*ERG-alt*). Très souvent, une délétion intragénique de *ERG* clonale ou sous-clonale est également retrouvée. Elle se produit secondairement suite à l'augmentation de l'accessibilité de la chromatine et donc de la susceptibilité du locus à l'action des enzymes RAG (120). Les *DUX4-r* sont identifiables par RNA-seq ou bien par immunohistochimie (121). Cependant, la détection d'une délétion de *ERG* est un bon marqueur car présente dans plus de la moitié des

cas. L'immunophénotypage peut également être utile car ce groupe est associé à la positivité du CD2 et du CD371 (122). Des délétions de *IKZF1* sont fréquentes et ne modifient pas le bon pronostic de ce remaniement. Il en est de même pour les mutations notamment de *MYC* qui sont particulièrement retrouvées dans ce groupe (123).

- **Réarrangements de *ZNF384* (*ZNF384-r*)**

En général de phénotype B-I et avec expression de marqueurs myéloïdes, les *ZNF384-r* sont observés chez environ 4% des enfants et des adultes, surtout jeunes. Ils sont également retrouvés dans presque 50% des MPAL chez l'enfant (124). Le gène *ZNF384* (12p13.3) a plus de 20 partenaires identifiés mais les plus fréquents sont *EP300* (22q13.2), *TCF3* (19p13.3), *TAF15* (17q12) et *CREBBP* (16p13.3). Ils sont considérés de **pronostic intermédiaire** même si certains partenaires, notamment *EP300*, auraient un meilleur pronostic (125). La dérégulation épigénétique observée pour les fusions avec *EP300* et *CREBBP* a motivé l'étude de thérapie ciblée et des résultats précliniques montrent une sensibilité aux inhibiteurs d'histone désacétylase (HDAC) (126).

- **Réarrangements de *MEF2D* (*MEF2D-r*)**

Les *MEF2D-r* représentent 2 à 4% des LAL-B pédiatriques et adultes, principalement de sexe féminin, adolescentes ou jeunes adultes. Le phénotype peut être pro-B ou pré-B. Ils sont de **pronostic intermédiaire à défavorable** selon le partenaire. Les partenaires les plus fréquents sont *BCL9* (1q21) et *HNRNPUL1* (19q13.2) mais d'autres sont possibles comme *DAZAP1* (19p13), *CSF1R* (5q32), *FOXJ2* (12p13) ou *SS18* (18q11). *MEF2D*, situé en 1q22, est proche de *PBX1*. Les réarrangements *MEF2D-r* impliquant *HNRNPUL1* et *DAZAP1* ressemblent au caryotype à la t(1;19) impliquant *TCF3* et *PBX1*. La confirmation du réarrangement en FISH ou par une autre méthode est donc requise. La plupart des *MEF2D-r* présentent également une délétion 9p (délétion *CDKN2A/B*). Comme ils sont caractérisés par une surexpression d'*HDAC9*, l'utilisation d'inhibiteurs d'HDAC est envisagée avec des résultats précliniques positifs (127).

- **Réarrangements de *NUTM1* (*NUTM1-r*)**

Les *NUTM1-r*, de **pronostic favorable**, ne sont retrouvés que chez les enfants et particulièrement les nourrissons. Au moins 10 partenaires de *NUTM1* (15q14) ont été décrits mais les plus fréquents sont *ACIN1* (14q11), *CUX1* (7q22), *BRD9* (5p15) et *ZNF618* (9q32) (128).

- **Réarrangements de *MYC* (*MYC-r*)**

Les *MYC-r* sont très rares et représentent moins de 1% des LAL-B (7). Les partenaires sont les gènes des immunoglobulines, *IGH* et *IGL* le plus souvent et plus rarement *IGK*. Dans la majorité des cas, le réarrangement impliquant *MYC* (8q24) est la seule anomalie primaire présente et elle est de **mauvais pronostic**. Dans le reste des cas, soit il est secondaire, soit il est associé à des réarrangements de *BCL2* (18q21) et/ou *BCL6* (3q27) comme décrit dans les lymphomes B double et triple *hit*. Ces derniers cas étant souvent exclues des protocoles, leur pronostic n'est pas établi mais semble très mauvais. Le gain de la région 1q est l'ACA principale retrouvée dans ce groupe (129).

- **Réarrangements des gènes de la famille *CEBP***

Des réarrangements de gènes de la famille *CEBP* avec *IGH* sont retrouvés dans 1% des LAL-B. Ils sont considérés de **pronostic intermédiaire** mais ne font pas partis des classifications

OMS ou ICC pour l'instant (105). Ils ont également été décrits comme évènement secondaire et n'ont donc pas de pronostic dans ce cas (130). Les gènes de la famille concernés sont *CEBPA* (19q13), *CEBPB* (20q13), *CEBPD* (8q11), *CEBPE* (14q11) et *CEBPG* (19q13) (131).

Il est à noter que les cas avec fusion ***IGH::CEBPE*** forment un cluster au niveau de l'expression avec le groupe des LAL-B ayant une mutation ***ZEB2 H1038R*** (132). Une entité provisoire de LAL-B ayant l'une ou l'autre de ces anomalies a été ajoutée à l'ICC 2022. Elles sont très rares (<1%), souvent associées à une mutation de *NRAS*. Des études approfondies sont encore nécessaires pour caractériser ce sous-type. La présence de mutation *ZEB2* est pour l'instant associée à une mauvaise survie et un haut risque de rechute (133).

- **Réarrangements de *PAX5* (*PAX5-r*)**

Le gène *PAX5* (9p13.2) est fréquemment altéré dans les LAL-B avec différentes anomalies possibles : délétion, amplification, mutation et translocations (134) (Figure 9). Les délétions de *PAX5* sont des évènements secondaires. En revanche, les translocations (*PAX5-r*) peuvent être des anomalies primaires et sont présentes dans environ 3% et 1% des LAL-B pédiatriques et adultes respectivement. Au sein des nombreux partenaires possibles, les plus fréquents sont *ETV6* (12p13), *NOL4L* (20q11), *AUTS2* (7q11), *ELN* (7q11), *FOXP1* (3p14) et *POM121* (7q11). Ces *PAX-r* font partis d'un groupe plus large regroupant les altérations de *PAX5* (***PAX5-alt***) de profil d'expression similaire. Cette entité, de **pronostic intermédiaire**, a été ajoutée à l'ICC 2022 et comprend, en plus des fusions, les duplications en tandem (*PAX5-ITD*), les amplifications (*PAX5amp*) et des mutations ponctuelles hormis la mutation P80R classée à part (voir ci-dessous). Elle est retrouvée chez les adultes (5%) et un peu plus fréquemment en pédiatrie (10%). L'ACA la plus fréquente dans le groupe *PAX5-alt* est une délétion 9p (délétion de *PAX5*, *CDKN2A/B* et *MTAP*) (135). Concernant les fusions, deux exceptions ne sont pas à classer dans les *PAX5-alt* : i) la fusion avec *JAK2* (*JAK2::PAX5*), anomalie primaire classée dans le groupe Ph-like (voir ci-dessous) ; ii) la fusion avec *ZCCHC7* (*PAX5::ZCCHC7*) qui est une anomalie secondaire retrouvée dans les LAL-B *ETV6::RUNX1* ou *DUX4* principalement (136).

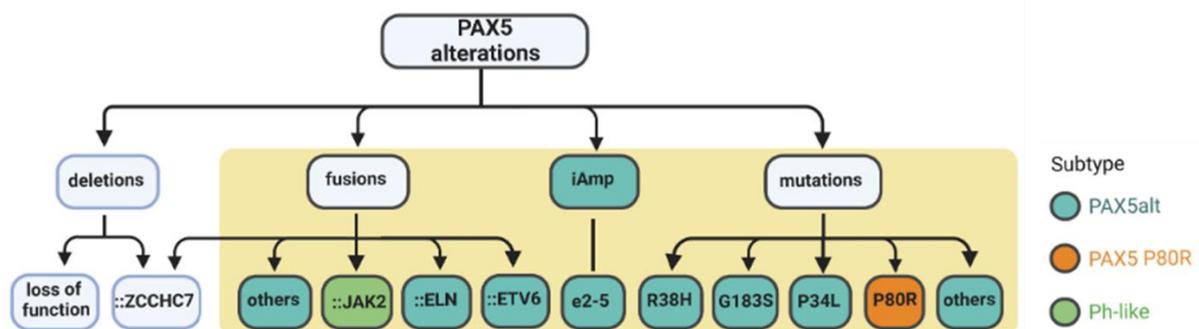


Figure 9 : Altérations de *PAX5* dans les LAL-B, adapté de Jia et Gu (137).

Elles sont divisées en évènement secondaires (délétion et fusion avec *ZCCHC7*) et primaires (autres fusions, amplifications et mutations). Les anomalies primaires sont regroupées dans l'entité *PAX5-alt* hormis la fusion avec *JAK2* (entité Ph-like) et la mutation P80R.

- **Réarrangement de *UBTF* et délétion *CDX2* (*CDX2/UBTF*)**

Ce sous-groupe récemment rapporté et ajouté à l'ICC 2022 est défini par un profil d'expression particulier et l'association de deux microdélétions : l'une en 17q21.3 entraîne la fusion *UBTF::ATXN7L3* et l'autre en 13q12.2 provoque la surexpression de *CDX2*. Il représente 2%

des LAL-B adultes avec principalement des jeunes adultes et des femmes. Il est très rare en pédiatrie (0.2%). L'ACA principale est un gain 1q. Il est décrit de **mauvais pronostic** avec des échecs d'induction, des MRD et des taux de rechutes élevés (138).

Entités définies par une mutation ponctuelle :

Les mutations ponctuelles acquises ne sont pas un évènement fréquent primaire dans les LAL-B. Cependant, l'utilisation récente des techniques de séquençage commence à mettre en évidence de rares entités définies par une mutation spécifique particulière et ayant des profils d'expression différentes des autres entités. Dans cette catégorie, on trouve notamment le sous-type avec mutation de *ZEB2* décrit précédemment car en lien avec *IGH::CEBPE*.

- **PAX5 P80R**

Ce sous-groupe représentant 3% des LAL-B est caractérisé par une mutation spécifique au niveau du domaine de liaison à l'ADN du facteur de transcription *PAX5*. Il est associé à un **pronostic intermédiaire à favorable**. La mutation P80R de *PAX5* altère le développement de la cellule B normale et favorise les cellules B portant l'altération bi-allélique de *PAX5* (136). Ainsi, dans la plupart des cas, il y a une altération bi-allélique de *PAX5* avec mutation ou délétion du second allèle. L'altération du 2^{ème} allèle peut aussi se présenter sous la forme de chromosomes dicentriques, dic(9;20) et dic(7;9). Les anomalies secondaires principales sont des délétions de *CDKN2A* ou des mutations des voies *RAS* ou *JAK/STAT* (139).

- **IKZF1 N159Y**

Les altérations de *IKZF1*, majoritairement des délétions mais parfois des mutations, sont reconnues comme des évènements secondaires fréquents dans les LAL-B et souvent associées à certains sous-groupes de pronostic défavorable (140). Parmi les différentes mutations de *IKZF1* identifiées, la N159Y bien que rare présente un profil d'expression génique différent ayant permis de la mettre à part. Elle représente moins de 1% des LAL-B (118). Contrairement à celle de *PAX5*, le deuxième allèle n'est pas touché par une autre altération. La majorité des cas ont une trisomie 21 associée en ACA (136).

Sous-types phéno-identiques à des entités déjà établies :

L'étude des **signatures d'expression génique** a permis de mettre en évidence des clusters liés aux anomalies primaires (Figure 8). Mais de nombreux cas de LAL-B appartenant à un cluster ne présentent pas l'anomalie spécifique. Ces cas ont alors été regroupés dans des sous-types ayant une expression similaire à l'entité originale en utilisant le suffixe « *like* ». La poursuite des analyses a permis pour la plupart d'identifier l'évènement génétique caractérisant ces sous-types.

- **Ph-like/BCR::ABL1-like**

Ce groupe, présent dans la classification OMS, est assez fréquent puisqu'il représente environ 12% et 25% des LAL-B pédiatriques et adultes respectivement, touchant principalement les jeunes adultes. Il partage une signature d'expression d'activation des kinases avec les LAL-B Ph+ mais sans t(9;22) ou transcrit de fusion *BCR::ABL1*. Comme pour les Ph+, les délétions de *IKZF1* sont fréquentes. Les Ph-like sont associées à un **mauvais pronostic** avec des MRD élevées (141). Cependant, leur identification a permis d'introduire des thérapeutiques ciblées et d'améliorer la survie pour certains patients (140).

Plus de 70 anomalies génétiques rentrant dans cette catégorie ont été identifiées et les principales ont été regroupées en deux sous-types reconnus et inclus dans la classification ICC 2022 :

- Les Ph-like avec fusion impliquant des gènes de la famille *ABL* (**ABL-class Ph-like**) incluant **ABL1** (9q34), **ABL2** (1q25), **CSF1R** (5q32), **PDGFRA** (4q12) et **PDGFRB** (5q32). Elles représentent 19% des Ph-like avec surtout des enfants (140). Elles sont sensibles à l'imatinib et aux autres de tyrosine kinase (ITKs) (142). Leur mise en évidence en routine est donc importante pour une prise en charge améliorée et elle est possible par la FISH. Cependant, cela nécessite l'utilisation de multiples sondes supplémentaires.

- Les Ph-like avec anomalies impliquant la voie de signalisation *JAK-STAT* (**JAK-STAT class Ph-like**) incluant la dérégulation de **CRLF2** (Xp22/Yp11), les réarrangements de **JAK2** (9p24) et **EPOR** (19p13.2). Elles représentent 70% des Ph-like et peuvent être sensibles aux inhibiteurs de JAK comme le ruxolitinib (140).

La dérégulation de *CRLF2* est la plus fréquente (50% des Ph-like) avec deux mécanismes possibles : la juxtaposition avec *IGH* par translocation, t(X;14)(p22;q32) ou t(Y;14)(p11;q32), ou la fusion avec *P2RY8* suite à une délétion cryptique au sein de la région pseudo-autosomale (PAR1). Ces événements cryptiques peuvent être mis en évidence par la FISH. Les réarrangements de *CRLF2* peuvent également être secondaires dans les LAL-B avec *iAMP21* ou altération de *PAX5* (*PAX5alt*) (143).

Les réarrangements impliquant *JAK2* et *EPOR* sont moins fréquents. Leurs partenaires principaux sont *PAX5* et *IGH* respectivement. L'utilisation de la FISH en routine peut également identifier ces cas (140).

- **ETV6::RUNX1-like**

Ce groupe au profil similaire aux LAL-B *ETV6::RUNX1* a été ajouté aux classifications OMS et ICC 2022. Plusieurs gènes de fusions impactant *RUNX1*, *ETV6* ou d'autres gènes ont été décrits. Il est souvent caractérisé par l'association d'anomalies ciblant *ETV6* et *IKZF1*. Il représente 3% des LAL-B pédiatriques et moins d'1% des adultes. Il est également de **pronostic favorable** (119).

- **KMT2A-like et ZNF384-like**

Ces deux sous-groupes présents dans l'ICC 2022 sont rares et non complètement caractérisés (136).

I.6.3.1.2. Anomalies secondaires cytogénétiques et moléculaires

Comme vu précédemment, l'anomalie primaire n'est en général pas suffisante au développement de la LAL et un ou plusieurs événements secondaires sont nécessaires à la leucémogénèse. Ce sont principalement des CNV, le plus souvent des délétions, qui concernent les gènes suivants : *EBF1* (5q33.3), *IKZF1* (7p12.2), *PAX5* (9p13.2), *CDKN2A/B* (9p21.3), *ETV6* (12p13.2), *BTG1* (12q21.3), *RB1* (13q14.2) et la région PAR1 (Xp22/Yp11). Ces gènes sont par exemple impliqués dans le développement des cellules B (comme *IKZF1*, *PAX5* ou *EBF1*) ou dans la régulation du cycle cellulaire (*CDKN2A/B*) (144). Ils sont le plus souvent cryptiques au caryotype mais parfois sous la forme de délétion de grande taille voir de monosomie. De nombreuses études ont cherché à établir un impact pronostique à ces

CNV, isolés ou associés et notamment dans les cas de LAL-B sans anomalie primaire identifiée (145). Deux classifieurs pronostics sont principalement utilisés aujourd'hui :

- Le **classifieur UKALL (UKALL-CNA)** proposé par *Moorman et al* en 2014 (146) : il classe les patients en trois groupes de risque favorable, intermédiaire ou défavorable en fonction du profil CNV des 8 gènes principaux cités ci-dessus (Tableau 3). Il est utilisé en association avec le risque défini par les anomalies cytogénétiques afin d'obtenir une stratification génétique globale.

- Le **profil IKZF1^{plus}** proposé par *Stanulla et al* (147) : Il est défini par l'association d'une délétion de *IKZF1* et d'au moins une délétion de *CDKN2A/B* ou *PAX5* ou *PAR1* en l'absence de délétion de *ERG*. L'association de ce profil à un pronostic plus péjoratif n'est cependant pas confirmée par toutes les études. Son utilisation conjointe avec la stratification par la MRD semble permettre d'identifier les patients à très haut risque (148). Le score MRplus associant le classifieur UKALL et le profil *IKZF1^{plus}* a également été proposé (149).

Tableau 3 : Classifieur UKALL selon le profil CNV, adapté de *Moorman et al* (146).

Stratification pronostique selon le profil CNV (<i>IKZF1</i> , <i>CDKN2A/B</i> , <i>PAX5</i> , <i>ETV6</i> , <i>BTG1</i> , <i>EBF1</i> , <i>RB1</i> et <i>PAR1</i>)
Risque favorable
Absence de délétion
Délétion isolée de <i>ETV6</i> , <i>PAX5</i> ou <i>BTG1</i>
Délétion <i>ETV6</i> + délétion isolée de <i>BTG1</i> , <i>CDKN2A/B</i> ou <i>PAX5</i>
Risque intermédiaire
Tous les autres profils non mentionnés
Risque défavorable
Délétion isolée de <i>IKZF1</i> , <i>PAR1</i> ou <i>RB1</i>
Délétions de <i>IKZF1</i> + <i>CDKN2A/B</i> + <i>PAX5</i>

Les ACA principales (105), impliquant les gènes précédents pour la plupart, sont :

- des délétions ou monosomies : del(6q), del(7p)/-7, del(9p)/-9, del(12p), del(13q)/-13, del(17p)/-17.
- des gains chromosomiques : +X et +21.

D'autres ACA sont retrouvées préférentiellement pour certaines entités (voir détail ci-dessus).

I.6.3.1.3. Anomalies associées à la rechute

L'évolution clonale menant à la rechute est complexe, comme vu précédemment, avec soit l'acquisition d'anomalies secondaires ou bien l'émergence d'un clone minoritaire pré-leucémique. Certaines anomalies sont particulièrement retrouvées à la rechute. C'est le cas notamment des altérations épigénétiques contribuant probablement à des mauvaises réponses thérapeutiques. Les mutations de *CREBBP* sont en effet retrouvées dans 20% des LAL-B en rechute, même pour des groupes initialement de bon pronostic comme les HeH, et elles entraînent une résistance aux glucocorticoïdes (70). Les mutations gain de fonction du gène *NT5C2* induisent quant à elles une résistance à la mercaptopurine (68). D'autres

mutations impactant les gènes suivants sont également enrichis dans les cas de rechutes : *WHSC1*, *TP53*, *USH2A*, *NRAS*, *IKZF1*, *PMS2* et *MSH6* (150,151).

I.6.3.2. Génétique des LAL-T

La leucémogénèse conduisant à la transformation des cellules T est un processus multi-étapes dans lequel de multiples altérations génétiques coopèrent pour altérer les mécanismes physiologiques contrôlant la croissance cellulaire, la prolifération, la survie et la différenciation durant la lymphopoïèse T (152). La génétique des LAL-T est donc très hétérogène avec des anomalies récurrentes identifiées dans au moins dix processus différents mais trois sont essentiels et dérégulés dans la majorité des cas : l'expression de facteurs de transcriptions du lignage T, le voie de signalisation *NOTCH1/MYC* et le contrôle du cycle cellulaire (*CDKN2A/B*) (153).

L'activation constitutive de la **voie NOTCH** par des mutations activatrices de *NOTCH1* ou perte de fonction de *FBXW7* est la dérégulation la plus souvent retrouvée dans les LAL-T (jusqu'à 80% des cas). La **délétion du locus 9p21 (*CDKN2A/B*)** avec perte des gènes suppresseurs *INK4A* et *ARF*, codant respectivement pour les protéines p16 et p14, est également présente dans plus de 70% des cas. Ces deux altérations (*NOTCH1* et *CDKN2A/B*) sont très souvent associées ce qui suggère leur coopération et le rôle majeur dans la leucémogénèse T (1). Elles sont cependant considérées comme des événements **secondaires** (appelés **anomalies de type B**) et ne permettent pas de caractériser des sous-groupes génétiques au sein des LAL-T. D'autres anomalies génétiques secondaires, moins fréquentes, ont également été identifiées et seront discutées. Ce sont principalement des CNV ou mutations permettant la dérégulation des autres voies de signalisation ou processus majeurs.

La **dérégulation de l'expression de facteurs de transcription** clés du lignage T, principalement suite à des altérations chromosomiques, est considérée comme l'évènement **primaire (anomalie de type A)**. Le plus souvent ces réarrangements placent le facteur de transcription sous le contrôle d'un *enhancer* fort spécifique de la lignée T localisé au sein des loci codant pour les récepteurs des cellules T (*TCR*), en 7q34 (*TRB*) ou 14q11 (*TRA-TRD*). D'autres réarrangements structurels induisant la dérégulation sont également possibles. Les principaux facteurs de transcription dérégulés incluent (152,154) :

- des membres de la famille bHLH (basic helix-loop-helix) : *TAL1*, *TAL2*, *LYL1* et *OLIG2* (aussi appelé *BHLHB1*)
- des membres de la famille LMO (LIM-only domain) : *LMO1*, *LMO2* et *LMO3*
- des membres de la famille Homeobox : *TLX1* (*HOX11*), *TLX3* (*HOX11L2*), *HOXA* et *NKX2*
- autres : *MYC*, *MYB*, *SPI1*, *BCL11B*

Contrairement aux LAL-B et LAM dont le nombre d'entités génétiquement distinctes a augmenté avec la classification OMS 2022, aucune n'a été introduite dans cette même classification. L'OMS estime en effet qu'il n'y a pas encore suffisamment d'éléments permettant de définir des sous-types génétiques de relevance clinique malgré les avancées dans la compréhension de la génétique des LAL-T (2). Cela est notamment dû au fait que les techniques de diagnostic cytogénétique et moléculaire de routine ne permettent pas la détection de certains évènements oncogéniques. La seule entité à part est l'ETP, définie selon les critères d'immaturation immunophénotypique. L'ICC en revanche a proposé 8 entités provisoires basées sur la dérégulation des facteurs de transcription vus précédemment : *HOXA*, *SPI1*, *TLX1*, *TLX3*, *NKX2*, *TAL1/TAL2*, *LMO1/2* et les autres bHLH (*LYL1* et *OLIG2*)

(87). De plus, une entité génétique d'ETP avec réarrangement de *BCL11B* est séparée des autres ETP. Cette distinction est également présente dans l'OMS mais les réarrangements de *BCL11B* sont classés avec les ALAL car retrouvés dans des LA de lignage variables mixtes ou ambigus.

Bien qu'il n'y ait pas encore de classification génétique consensuelle ayant un impact pronostique et clinique, nous allons nous intéresser aux données génétiques majeures décrites actuellement (Figure 10) :

- Tout d'abord l'impact de la dérégulation des facteurs de transcription décrits comme l'anomalie primaire. De nombreuses études ont montré que leur dérégulation conduit à des signatures d'expression génique distinctes et en corrélation avec le stade d'arrêt de différenciation durant le développement T.
- Ensuite les autres anomalies secondaires qui montrent un intérêt pour la stratification pronostique ou pour le traitement car elles constituent des cibles thérapeutiques actionnables.

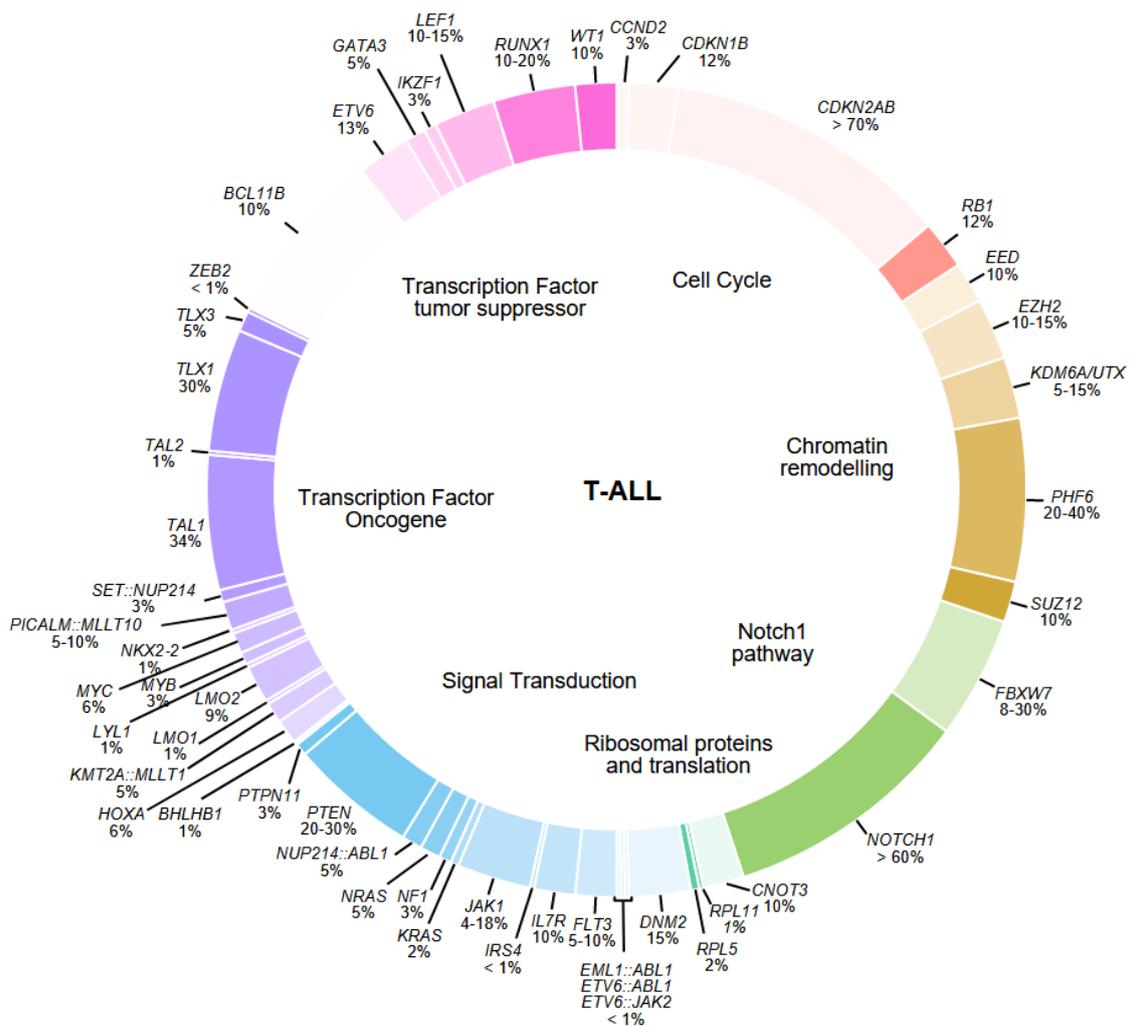


Figure 10 : Fréquence des anomalies génétiques récurrentes, primaires et secondaires, des LAL-T (155).

A noter que l'impact pronostique de certaines anomalies génétiques sera donné à titre indicatif selon les connaissances actuelles puisqu'il n'y a pas, à ce jour, de réelle valeur établie dans la prise en charge.

Les caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-T définies dans la littérature (prévalence, pronostic, anomalies secondaires associées et techniques conventionnelles utilisées pour leur détection) sont résumées dans le tableau 4. Leur détection ou non par Optical Genome Mapping, technique qui sera présentée en partie II, est également précisée.

Tableau 4 : Caractéristiques principales des entités génétiques des LAL-T.
OGM = Optical Genome Mapping, del = délétion, mut = mutation

Entité génétique selon le facteur de transcription dérégulé	Prévalence	Pronostic	Anomalies secondaires	Techniques conventionnelles	OGM
ETP-LAL et autres LAL-T immatures					
Altérations secondaires : voies <i>RAS</i> , <i>JAK/STAT</i> , facteurs de transcriptions hématopoïétiques et régulateurs épigénétiques Faible fréquence des altérations <i>NOTCH1</i> et <i>CDKN2A/B</i>					
Activation de <i>BCL11B</i> - Réarrangements : <i>ZEB2</i> , <i>ARID1B</i> , <i>CDK6</i> ... - Amplification en tandem	ETP : 6%	Indéterminé	Mutations : <i>FLT3</i> , <i>DNMT3A</i> , <i>TET2</i> , <i>WT1</i>	Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression d'<i>HOXA</i> - <i>HOXA10::TRB</i> / t(7;7)(p15;q34) ou inv(7;7)(p15;q34) - Réarrangements <i>KMT2A</i> / t(v;11q23) - Réarrangements <i>NUP98</i> / t(v;11p15) - <i>SET::NUP214</i> / t(9;9)(q34;q34) ou del(9)(q34q34) - <i>PICALM::MLLT10</i> / t(10;11)(p13;q14) - Réarrangements <i>HOXA13</i> , <i>ETV6</i> , <i>ZFP36L2</i>	Immatures : 45% Autres : 25%	Souvent défavorable mais variable	Voie <i>RAS</i> (mut) Délétions : <i>TCF7</i> , <i>TP53</i>	Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression de <i>SPI1</i> / t(v;11p11) Partenaires : <i>TCF7</i> , <i>SFPMN1</i> , <i>BCL11B</i> ...	<5% (pédiatrie)	Semble défavorable		RNAseq	Oui
LAL-T corticales					
Altérations secondaires très fréquentes de <i>NOTCH1</i> , <i>CDKN2A/B</i> et fréquentes de <i>BCL11B</i> , <i>PTPN2</i>					
Surexpression de <i>TLX1</i> - <i>TRA::TLX1</i> / t(10;14)(q24;q11) - <i>TRB::TLX1</i> / t(7;10)(q34;q24)	Enfant : 5-10% Adulte : 20-30%	Favorable	Fusion <i>NUP214::ABL1</i> (amplification possible) avec impact péjoratif Mutations : <i>PHF6</i> , <i>WT1</i>	Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression de <i>TLX3</i> - <i>TRD::TLX3</i> / t(5,14)(q35;q11) - <i>BCL11B::TLX3</i> / t(5;14)(q35;q32) - Autres partenaires décrits	Enfant : 20-25% Adulte : <5%	Favorable	Mutations : <i>PHF6</i> , <i>WT1</i>	Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression de <i>NKX2</i> - Réarrangements <i>NKX2-1</i> / t(v;14q13) - Réarrangements <i>NKX2-2</i> / t(v;20q11) - Réarrangements <i>NKX2-5</i> / t(v;5q35), plutôt LAL-T immatures - Autres mécanismes décrits mais rares	<5% (pédiatrie)	Favorable	<i>LEF1</i> (del)	RNAseq	Oui
Surexpression de <i>MYB</i> - <i>TRB::MYB</i> / t(6;7)(q23;q34), parfois décrite comme secondaire - Duplications en tandem secondaires (10% LAL-T)	<5% (enfant très jeune)	Indéterminé		Caryotype / FISH RNAseq	Oui
LAL-T matures					
Altérations secondaires : inactivation <i>PTEN</i> , délétion 6q, translocations <i>MYC</i>					
Surexpression de <i>TAL1</i> - <i>STIL::TAL1</i> / del(1)(p32p32) (30%) - <i>TRA::TAL1</i> / t(1;14)(p32;q11) - <i>TRB::TAL1</i> / t(1;7)(p32;q34) - Mutations (rares)	Enfant : 30-40% Adulte : 10%	Indéterminé		Caryotype / FISH RNAseq	Oui, hors mutations
Surexpression de <i>TAL2</i> <i>TRB::TAL2</i> / t(7;9)(q34;q32)	<5%	Indéterminé		Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression de <i>LMO1</i> <i>TRD::LMO1</i> / t(11;14)(p15;q11)	5%	Indéterminé		Caryotype / FISH RNAseq	Oui
Surexpression de <i>LMO2</i> - <i>TRD::LMO2</i> / t(11;14)(p13;q11) - del(11)(p13p12), mutations	10%	Indéterminé		Caryotype / FISH RNAseq	Oui, hors mutations

I.6.3.2.1. Dérégulation de l'expression des facteurs de transcription

La dérégulation des facteurs de transcription importants, souvent par surexpression, permet de définir des sous-types génétiques de LAL-T, plus ou moins consensuels en fonction des études, qui présentent des profils d'expression génique distincts. Ces sous-types sont très fortement corrélés aux différents stades de différenciation immunophénotypique des cellules T (Figure 11). Les sous-types retrouvés majoritairement dans un même stade de différenciation présentent des similarités. Ils seront donc décrits en fonction des stades du plus immature au plus mature.

Les réarrangements chromosomiques responsables de la surexpression des facteurs de transcription sont très nombreux, souvent rares et avec de multiples partenaires. Les gènes principaux et les partenaires les plus fréquents seront donc cités.

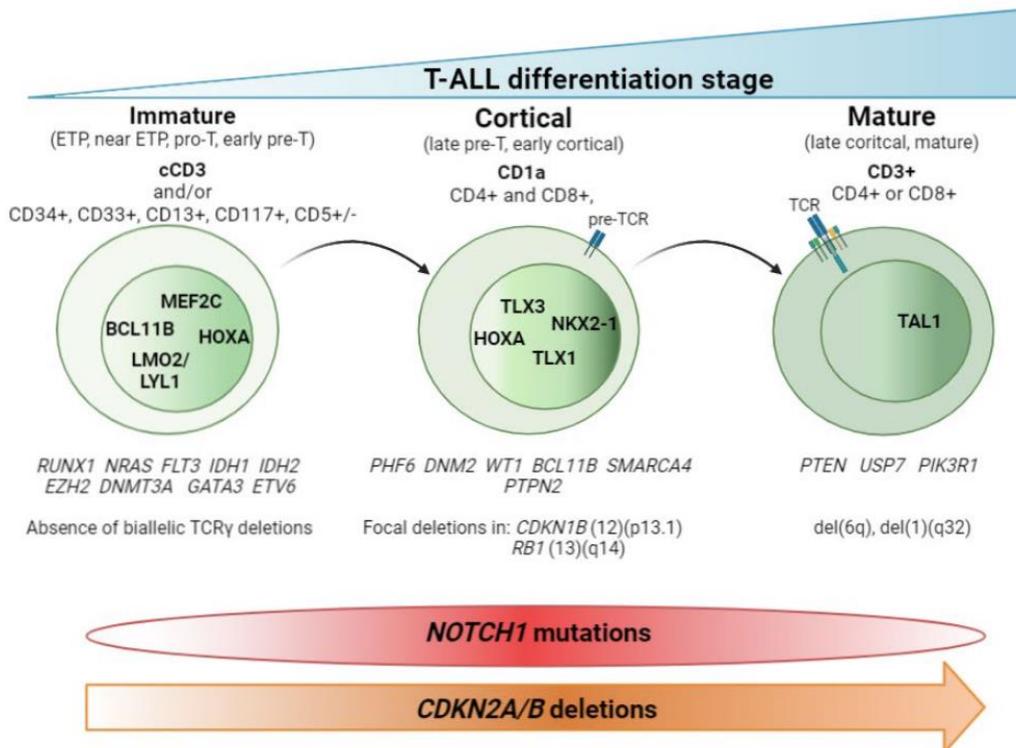


Figure 11 : Classification des LAL-T en fonction du stade d'arrêt de la différenciation et des facteurs de transcriptions surexprimés (156).

Les anomalies secondaires fréquemment associées en fonction du stade sont également indiquées.

Sous-types génétiques des ETP et autres LAL-T immatures :

Les LAL-T immatures sont principalement rassemblées au sein de l'entité ETP-LAL mais elles incluent également des LAL TI (pro-T) et TII (pré-T). Le terme de « near-ETP » est également retrouvé pour décrire le phénotype dans le cas où l'expression du CD5 est trop élevée pour répondre à la définition des ETP (c'est-à-dire positif dans plus de 75% des cellules leucémiques). Une surexpression des facteurs de transcriptions **LYL1/LMO2** et **MEF2C** est fréquente dans les LAL-T immatures (156).

Les ETP-LAL expriment fortement des marqueurs myéloïdes (*LYL1*, *LMO2*, *CD34*, *CCND2*, *KIT*, *GATA2*, *CEBPA* ...) et à l'inverse faiblement des gènes liés à la différenciation T (*CD1*, *CD4*, *CD8*, *TCF7*, *LEF1* ...). Ce profil étant plus proche d'une CSH que d'un précurseur T, les

ETP pourraient être un sous-groupe des ALAL dans les classifications et c'est le cas d'une entité particulière d'ETP avec activation de *BCL11B*. La dérégulation d'autres facteurs de transcriptions comme *HOXA*, *MEF2C*, *SPI1* et *LYL1* est retrouvée dans les ETP ou LAL-T immatures (157).

- **ETP et activation de *BCL11B***

Les LA avec activation de *BCL11B* ont un phénotype variable caractérisé par la co-expression de marqueurs myéloïdes et lymphoïdes T et sont donc classées de façon globale avec les ALAL par l'OMS. L'activation de *BCL11B* (14q32) est présente dans 6% des ETP (157). Elle se produit principalement au cours de 4 translocations :

- La t(2;14)(q22;q32)/*ZEB2::BCL11B* entraînant une fusion avec le partenaire. La protéine chimérique résultante contient tous les domaines fonctionnels de *BCL11B* dont la transcription passe sous le contrôle du promoteur de *ZEB2* (158)
- La t(6;14)(q25;q32)/*ARID1B::BCL11B* ou ins(6;14)(q25.3;q32q32)
- La t(7;14)(q21;q32)/*CDK6::BCL11B*
- La t(8;14)(q24;q32)/*BENC::BCL11B*.

Les 3 dernières translocations ne produisent pas de transcrite chimérique de fusion mais entraînent une activation de *BCL11B* grâce à sa juxtaposition avec les régions régulatrices des gènes partenaires. A côté de ces 4 translocations, un autre mécanisme d'activation de *BCL11B* a été décrit, il consiste en une amplification en tandem d'une région non codante appelée BETA (*BCL11B* enhancer tandem amplification) à proximité de *BCL11B* générant également un super-*enhancer* en cis (159).

Les anomalies secondaires suivantes sont particulièrement associées à cette entité : mutations de *FLT3* (duplication en tandem, ITD et/ou mutations dans le domaine tyrosine kinase TKD), *DNMT3A*, *TET2* et/ou *WT1*. Du fait de la présence de mutations ITD ou TKD de *FLT3* et de l'activation de la voie *JAK/STAT* par la surexpression de *BCL11B*, les LA de cette entité seraient sensibles aux ITK et inhibiteurs de *JAK/STAT* (158,159).

- **Surexpression d'*HOXA***

HOXA correspond à l'un des 4 complexes de gènes HOX chez l'homme. Ce complexe contient 11 gènes HOX, tous localisés sur le chromosome 7 en 7p15. La surexpression de *HOXA* provient de différentes altérations génomiques, affectant *HOXA* lui-même ou d'autres gènes comme *KMT2A* ou *MLLT10*, avec toutes pour conséquence une activation en cis ou trans du locus et une surexpression ectopique de *HOXA*. Lors de l'activation en cis, le gène cible passe sous la dépendance d'un *enhancer* proche ou dans le gène partenaire. L'activation en trans, plus complexe, est due à l'activité de la protéine chimérique associée à un remodelage de la chromatine. Les LAL-T ETP sont associées à une surexpression au minimum des gènes *HOXA11* et *HOXA13* (160).

Cette surexpression de *HOXA* est observée dans environ 25% des LAL-T de façon générale et 45% de celles avec un phénotype immature, ETP ou near-ETP. Le pronostic est variable ou non défini mais semble plutôt défavorable surtout dans les cas d'ETP (154,157). Plusieurs mécanismes sont possibles (161) :

- Les plus fréquents (5% des LAL-T) sont les **remaniements de *HOXA10*** en 7p15 avec le *TRB* en 7q34 au cours d'une translocation dans le chromosome 7, t(7;7)(p15;q34), ou d'une inversion du 7, inv(7)(p15q34). Ils aboutissent à un transcrite de fusion *HOXA10::TRB*.

- Les **réarrangements de *KMT2A***, t(v;11q23) : les principaux partenaires décrits dans les LAL-T sont *MLLT1* (19q13.3) et *AFDN* (6q27). Ils sont de pronostic intermédiaire.

- La **fusion *SET::NUP214*** : elle est la conséquence de 2 anomalies cryptiques, la translocation t(9;9)(q34;q34) et la délétion del(9)(q34q34). Cette fusion est associée à des résistances à la chimiothérapie et aux corticoïdes mais sans impact sur la survie.

- Les **réarrangements de *NUP98*** : *NUP98*, situé en 11p15, code pour un membre du complexe protéique formant le pore nucléaire qui régule le transport des ARN et des protéines. Initialement décrits dans les pathologies myéloïdes, ces remaniements présentent maintenant plus de 30 partenaires de *NUP98* répartis dans deux catégories, les gènes de la famille *HOX* et les autres gènes dits variants car dépourvus d'homéodomaine. Tous ces réarrangements aboutissent à une protéine chimérique se comportant comme un super facteur de transcription. Les principaux partenaires décrits dans les LAL-T, tous dans la catégorie des gènes variants, sont *NSD1* (5q35), *SETBP1* (18q12), *CCDC28* (6q24), *IQCG* (3q29), *ADD3* (10q25) et *RAP1GDS1* (4q21). Étant donné la localisation terminale de *NUP98* sur le bras court du chromosome 11, lorsque le partenaire est situé lui aussi en position terminale (*NSD1*, *IQCG* ou *ADD3*), la translocation est cryptique. Tous les réarrangements de *NUP98* sont de pronostic défavorable dans les LAL-T.

- La **fusion *PICALM::MLLT10***, anciennement appelée *CALM::AF10*, issue de la translocation t(10;11)(p13;q14). Fréquemment rapportée dans les LAL-T, on peut trouver aussi cette fusion plus rarement dans les LAM, les MPAL ou les ALAL. La qualité des chromosomes dans les LAL-T n'étant pas optimale, cette translocation est souvent suspectée au caryotype et nécessite une confirmation en FISH. Elle est associée à un pronostic défavorable. D'autres partenaires de *MLLT10* sont également décrits, notamment *DDX3X* (162).

- Les **réarrangements de *ZFP36L2*** (2p21) : ce gène code pour une protéine se liant aux ARN et régulant négativement l'expression de *NOTCH1*. Il a été décrit récemment dans les LAL-T ETP ou MPAL (163). Probablement non visibles par les techniques de cytogénétique standard, les réarrangements ont été mis en évidence par des techniques de séquençage haut débit et correspondent à des délétions ou des fusions.

- Les **réarrangement de *ETV6*** (12p13) : en plus des délétions et mutations d'*ETV6* présentes dans 33% des LAL-T ETP, les techniques de séquençage exomiques ont également décrits des fusions d'*ETV6* associées à une surexpression de *HOXA* (163).

- Les **réarrangements de *HOXA13*** (7p15) : il s'agit de translocations impliquant *BCL11B* (14q32.2), *ERG* (21q22) ou *CDK6* (7q21) au cours desquelles la région *HOX* passe sous le contrôle de l'*enhancer* du gène partenaire.

Des délétions secondaires de *TCF7* et de *TP53* sont retrouvées particulièrement dans le groupe *HOXA* (164) et des mutations de la voie *RAS* sont également fréquentes.

- **Surexpression de *SPI1***

Anciennement appelé *PU.1*, *SPI1* est situé en 11p11. La surexpression de *SPI1* est générée par des transcrits de fusion et protéines chimériques issus de translocations. Les principales sont la t(5;11)(q31;p11)/*TCF7::SPI1*, la t(1;11)(p36.1;p11)/*SPMN1::SPI1* et la t(11;14)(p11;q32)/*BCL11B::SPI1*. D'autres translocations plus rares ont été également décrites dans les LAL-T. Les fusions de *SPI1* sont rares (<5%) et plutôt observées en pédiatrie avec un pronostic défavorable d'après les données actuelles (165).

Il est également à noter que les ETP-LAL ont un profil d'anomalies secondaires assez différent des autres LAL-T. En effet, les anomalies de *NOTCH1* et *CDKN2A/B* sont beaucoup moins fréquentes voire rares. A l'inverse on va retrouver beaucoup plus d'anomalies ciblant la voie Ras (*NRAS*, *KRAS*, *BRAF*, *FLT3*), la voie JAK/STAT (*JAK1/3*, *IL7R*), des facteurs de transcriptions hématopoïétiques (*GATA3*, *ETV6*, *RUNX1*, *IKZF1*) ou bien l'épigénétique (*EZH2*, *EED*, *SUZ12*, *SETD2*, *DNMT3A*, *IDH1/2*) (157,166).

De plus, les LAL-T immatures et particulièrement les ETP expriment fortement *BCL2*. L'utilisation du vénétoclax en association à d'autres thérapies est donc une stratégie prometteuse (167).

Sous-types génétiques des LAL-T corticales :

Les LAL-T corticales (TIII), définies principalement par la positivité du CD1a peuvent être divisées en sous-types caractérisées par la surexpression de *TLX1*, *TLX3* et *NKX2* principalement due à des réarrangements. Les altérations secondaires de *NOTCH1* et *CDKN2A/B* sont quasiment toujours retrouvées dans ces sous-types. Les délétion/mutation de *BCL11B* et délétion de *PTPN2* sont également plus souvent présentes (157,164).

- **Surexpression de *TLX1* et *TLX3***

Les réarrangements de *TLX1* avec *TRA* ou *TRB* représentent 5 à 10% des LAL-T pédiatriques et jusqu'à 30% chez l'adulte. Ils consistent en des translocations : t(10;14)(q24;q11) générant le transcrit *TRA::TLX1* et t(7;10)(q34;q24) générant le transcrit *TRB::TLX1*. Ils sont associés à un pronostic favorable (161).

A l'inverse, les réarrangements de *TLX3* sont plus fréquents en pédiatrie (20-25%) que chez l'adulte (<5%). Leur pronostic est variable selon les études mais le plus souvent favorable sauf si associé à une amplification de *ABL1*. Différents partenaires de *TLX3* ont été décrits mais les principaux réarrangements de *TLX3* sont trois translocations induisant une surexpression de *TLX3* par juxtaposition avec l'*enhancer* ou les séquences régulatrices du gène partenaire (154,157,161) :

- La translocation t(5;14)(q35;q11)/*TRD::TLX3*

- La translocation t(5;14)(q35;q32)/*BCL11B::TLX3* : Elle induit une perte de l'expression de *BCL11B*. Ce réarrangement est donc à bien différencier de ceux décrits dans le cadre de l'entité avec activation de *BCL11B* précédemment.

- La translocation t(5;7)(q35;q21)/*CDK6::TLX3*

Des mutations de *PHF6* et *WT1* sont décrites avec *TLX1* et *TLX3* (154). De plus, la présence d'une fusion *NUP214::ABL1* secondaire est exclusivement retrouvée dans ces groupes et elle est souvent amplifiée. Une étude a montré un impact péjoratif de la présence de cette fusion (164).

- **Surexpression de *NKX2***

La surexpression de *NKX2*, principalement décrite en pédiatrie, est rare (<5%) et semble être de pronostic favorable. Trois gènes sont impliqués, *NKX2-1* en 14q13, *NKX2-2* en 20q11 et *NKX2-5* en 5q35, souvent dans des translocations avec des partenaires différents comme les *TCR*, *IGH*, *BCL11B*, *CDK6* ou *DIO2*. La surexpression peut être également due à des altérations au sein du gène voire des mutations démasquant des *enhancers*. Des délétions

secondaires de *LEF1* sont souvent associées (157,161). Contrairement à *NKX2-1* et *NKX2-2* majoritaires dans les LAL-T corticales, les réarrangements de *NKX2-5* sont plutôt retrouvés dans les LAL-T immatures associés à une surexpression de *MEF2C* (168).

- **Surexpression de *MYB***

MYB, localisé en 6q23, est exprimé physiologiquement dans les stades immatures capables de proliférations. Son expression s'éteint dans les stades plus matures. Dans le cadre des LAL-T, sa surexpression participe donc au blocage de la différenciation et promeut la prolifération (169). Deux mécanismes principaux de surexpression sont décrits :

- La translocation t(6;7)(q23;q34)/*TRB::MYB* : elle est rare (<5% des LAL-T) mais observée chez des enfants particulièrement jeune (<3 ans) par rapport à l'âge moyen observé dans les LAL-T. Ne retrouvant pas d'autre évènement primaire associé, *Clappier et al* ont proposé en 2007 un nouveau sous-type décrit par ce réarrangement (169). En 2021, *Bardelli et al* ont cependant mis en évidence une association de la translocation à un réarrangement de *TLX1/TLX3*, *NKX2* ou *HOXA* (170).

- La duplication en tandem de *MYB* : elle est présente dans environ 10% des LAL-T, légèrement plus souvent en pédiatrie, en association avec des entités précédentes (*TLX1/TLX3*, *NKX2* ou *HOXA*).

De plus, des mutations somatiques de *MYB* sont retrouvées dans 2-3% des LAL-T et un cas d'amplification extra-chromosomique a été décrit (170).

Sous-types génétiques des LAL-T matures :

Les LAL-T matures (sCD3+) présentent des altérations de gènes des familles bHLH (*TAL1* et *TAL2*) et LMO (*LMO1*, *LMO2* et *LMO3*). Les protéines *TAL* et *LMO* appartiennent au même complexe transcriptionnel et sont donc souvent co-dérégulées. Les LAL-T ayant des altérations de ces gènes ont une signature d'expression génique similaire et sont donc souvent regroupées dans la catégorie appelée TAL/LMO.

Les LAL-T TAL/LMO ont une incidence plus faible de mutations *NOTCH1*. En revanche, elles sont associées à des anomalies secondaires qui semblent impacter le pronostic de façon défavorable : inactivation de *PTEN*, délétion 6q et translocations de *MYC* (157). Les délétions 6q, del(6q)(q14q16), sont hétérogènes mais emportent dans 90% des cas le suppresseur de tumeur *CASP8AP2* (6q15). Les translocations de *MYC*, retrouvées dans environ 5% des cas, forment un groupe particulier avec absence de mutation *NOTCH1* mais inactivation fréquente de *PTEN*.

- **Surexpression de *TAL1* / *TAL2***

La surexpression de *TAL1* caractérise 30-45% et 10-15% des LAL-T pédiatriques et adultes respectivement (157). Elle est principalement due à une délétion cryptique (<100 kb), del(1)(p32p32)/*STIL::TAL1*, qui place *TAL1* sous la dépendance de l'enhancer de *STIL*. C'est une des anomalies les plus fréquentes dans les LAL-T (environ 30% des cas). D'autres mécanismes plus rares d'activation de *TAL1* sont possibles : (i) des translocations avec un gène de récepteur des cellules T, t(1;14)(p32;q11)/*TRA::TAL1* et t(1;7)(p32;q34)/*TRB::TAL1* ; (ii) des mutations. Dans de rares cas également, c'est *TAL2* qui est dérégulé suite à une translocation avec le *TRB*, t(7;9)(q34;q32)/*TRB::TAL2* (161). Le pronostic des dérégulations de *TAL1* ou *TAL2* est indéterminé (intermédiaire (87) ou défavorable (154) selon les études).

- **Surexpression de *LMO1* / *LMO2* / *LMO3***

Les réarrangements impliquant *LMO1* (11p13) et *LMO2* (11p15) représentent 5 et 10% des LAL-T respectivement. La dérégulation peut provenir : i) de translocations avec le *TRD*, t(11;14)(p15;q11)/*TRD::LMO1* et t(11;14)(p13;q11)/*TRD::LMO2* ; ii) d'une délétion cryptique au niveau de *LMO2*, del(11)(p13p12) ; iii) de mutations touchant le promoteur ou l'*enhancer*. De rares réarrangements impliquant *LMO3* ont aussi été rapportés, notamment avec le *TRB*, t(7;12)(q34;p12), *TRB::LMO3*. L'impact pronostic n'est pas établi (161).

I.6.3.2.2. Anomalies génétiques secondaires récurrentes

En plus des altérations de *NOTCH1* et *CDKN2A/B*, d'autres anomalies secondaires (mutations) ou CNV sont fréquemment observées et induisent la dérégulation de divers processus. Leur étude est importante puisqu'elle offre de nouvelles options de thérapies ciblées en cours de validation dans les essais cliniques (171) (Annexe 2). De plus, prise isolément leur impact clinique est faible mais leur association permet d'obtenir des classifications moléculaires qui semblent pronostiques dans les études récentes.

Anomalies secondaires et perspectives de thérapies ciblées :

- **Voie *NOTCH1***

L'activation de la signalisation de *NOTCH1* est un processus majeur dans les LAL-T comme décrit précédemment. Les mutations activatrices de *NOTCH1* sont présentes dans 60% des LAL-T. Cette fréquence en fait donc un candidat important pour la thérapie. Des premières études semblent montrer un effet des **inhibiteurs de *NOTCH1*** comme les inhibiteurs de γ -Secretase (GSI). On peut également cibler d'autres acteurs de la voie *NOTCH* comme l'E3 ubiquitin ligase SPL2 ou la protéine SERCA (157,172). *MYC* étant une cible directe de *NOTCH1*, les LAL-T avec mutation de *NOTCH1* surexpriment *MYC*. Les **inhibiteurs de BET** (Bromodomain and extraterminal), pouvant réduire cette expression, ont montré des résultats intéressants sur des modèles précliniques (173).

- **Cycle cellulaire**

Plus de 70% des LAL-T ont une altération de *CDKN2A/B*, régulateurs négatifs de CDK4/6 (kinases dépendantes des cyclines D), entraînant une activation du cycle cellulaire. Le **inhibiteurs de CDK4/6** sont donc des options thérapeutiques en cours d'évaluation (173). De plus, une sensibilité augmentée aux analogues des nucléosides est souvent retrouvée en cas d'activation du cycle cellulaire. La nélarabine (analogue à une purine) ayant déjà obtenue une autorisation, sera discutée dans la partie traitement.

- **Signalisation *IL7R/JAK/STAT***

La signalisation induite par le récepteur à l'IL-7 (*IL-7R*) est nécessaire à la prolifération et à la survie des stades immatures de cellules T. Les acteurs suivants sont ceux de la voie *JAK/STAT* avec notamment *JAK1/3* et *STAT5*. Plusieurs anomalies sont responsables de l'activation de cette signalisation : mutations de *IL7R* (10%), *JAK3* (7%), *JAK1* (4%), *STAT5B* (1%) ou bien l'inactivation de régulateurs négatifs comme *PTPN2* ou *DNM2* dans 10 à 20% des LAL-T (157). La voie *IL7R/JAK/STAT* est donc également une cible actionnable notamment par l'utilisation des **inhibiteurs de JAK** comme le ruxolitinib (*JAK1/2*) ou tofacitinib

(*JAK3*). Dans les cas avec mutations, des niveaux élevés d'expression de la kinase PIM1, effecteur de la voie *JAK/STAT*, sont également retrouvés ce qui en ferait une cible actionnable par inhibition (**inhibiteur de PIM1**) dans environ 30% des LAL-T. En dehors de la présence de mutations, l'*IL7R* (ou *CD127*) est exprimé dans la majorité des LAL-T (70%) et principalement dans les corticales. L'utilisation des inhibiteurs est donc également envisagée pour les LAL-T l'exprimant même en absence de mutation. Une synergie avec le vénétoclax est également supposée (174).

- **ABL-class et SRC-family kinases**

La surexpression de *ABL1* est présente dans 8% des LAL-T. Contrairement aux LAL-B, la t(9;22)(q34;q11) est rare dans les LAL-T (<1%). L'altération la plus fréquente (6% des LAL-T) est la fusion *NUP214::ABL1*. Cette fusion provient d'une délétion en 9q34 entraînant la formation d'un épisode (175). La zone excisée comprend *ABL1* en 9q34.12 (la cassure en 5' se situant dans l'intron 1 d'*ABL1*) et *NUP214*, anciennement appelé *CAN*, en 9q34.13 (avec des points de cassure variables allant de l'intron 23 à l'intron 34). Ce fragment excisé se circularise pour former un épisode qui se multiplie ensuite au cours des divisions cellulaires, générant ainsi une amplification (jusqu'à 50 copies). Lorsque l'amplification est conséquente, elle est visible en cytogénétique sous forme de double minute. Sinon, seule la FISH peut visualiser les épisodes. Lorsque l'épisode est réintégré dans le génome, on peut visualiser une région de coloration homogène au caryotype (HSR, Homogeneously Staining Region). Très rarement, il a aussi été décrit des translocations impliquant d'autres partenaires, *ETV6* avec la translocation t(9;12)(q34;p13)/*ETV6::ABL1* et *EML1* avec la translocation t(9;14)(q34;q32)/*EML1::ABL1*.

Ces altérations avec surexpression de *ABL1* sont typiquement associées aux groupes *TLX1* et *TLX3* et sensibles aux **ITK** (imatinib, dasatinib). Ces inhibiteurs pourraient également être utilisés dans des cas plus rares ou d'autres tyrosines kinases sont impliquées (*ABL2*, *PDGFRA* et *PDGFRB*) (142). L'activation constitutive de ces tyrosines kinases entraîne l'activité de la protéine LCK (SRC family). Des niveaux élevés d'expression de *LCK* sont également retrouvés en l'absence de fusion d'une tyrosine kinase. Les **inhibiteurs de LCK**, sous-groupe d'ITK, comme la dasatinib ou bosutinib pourrait être utilisés dans 30% des LAL-T indépendamment de la présence d'une fusion ou non (157,176).

- **Signalisation PI3K/AKT/mTOR**

L'activation de la signalisation PI3K/AKT/mTOR est également fréquente dans les LAL-T. L'altération la plus fréquente est l'inactivation du régulateur négatif principal *PTEN*, par délétion ou mutation, qui est retrouvée dans 10 à 15% des cas et quasiment exclusivement dans le groupe TAL/LMO. Plus rarement des mutations activatrices dans le complexe PI3K (*PIK3CD*, *PIK3R1*) ou de l'effecteur *AKT1* sont retrouvées. L'activation de la voie *PI3K* est liée à une résistance aux glucocorticoïdes mais la présence d'une altération de cette voie serait à l'inverse actionnable par des **inhibiteurs de PI3K ou de mTOR** (157,177).

- **Voie RAS/MAPK**

L'activation de la voie *RAS/MAPK* est présente dans environ 15% des LAL-T au diagnostic, principalement immatures (ETP, *HOXA*), mais son incidence augmente à la rechute jusqu'à 40%. Elle est due à des mutations de *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *FLT3* mais également des régulateurs négatifs *NF1* et *PTPN11*. Elle entraîne une résistance au méthotrexate mais elle serait actionnable par des **inhibiteurs de MEK1/2** comme le selumetinib ou trametinib en cours d'essais (157,178).

- **Régulation épigénétique**

Les régulateurs épigénétiques les plus fréquemment rapportés dans la LAL-T sont *PHF6*, les membres du complexe PRC2 (*EED*, *EZH2* et *SUZ12*) et *KDM6A* (157). L'inactivation de *PHF6* est présente dans environ 15% et 30% des LAL-T pédiatriques et adultes respectivement, souvent dans les groupes *TLX1* et *TLX3* et associée à des altérations de la voie *JAK/STAT* (179). Elle serait actionnable par l'utilisation de la **5-azacytidine** (agent déméthylant) et également en combinaison avec le vénétoclax (180). Une altération d'au moins un membre du complexe PRC2 est retrouvée dans environ 25% des LAL-T, principalement immatures, également associée à des anomalies *JAK/STAT*. Cette altération pourrait être actionnable par des **inhibiteurs de BET** (181). Des mutations pertes de fonctions de *KDM6A*, aussi appelé *UTX*, sont présentes dans 5 à 15% des LAL-T.

Anomalies secondaires pronostiques et classifieurs moléculaires de stratification :

Le nombre d'anomalies secondaires, principalement des mutations et des CNV, dans les LAL-T est très important. La quasi-totalité des LAL-T présente au minimum un de ces anomalies et plusieurs associées dans la majorité des cas. De nombreuses études s'intéressent donc à l'impact pronostique de ces anomalies, souvent en association.

Concernant le profil mutationnel, un premier classifieur moléculaire a montré l'impact de la présence ou l'absence des mutations/altérations de ***NOTCH1/FBXW7*, *RAS* et *PTEN(NFRP)*** dans la stratification pronostique (182). La présence de mutations de *NOTCH1* et/ou *FBXW7* (N/F) en l'absence de mutations de *RAS* et *PTEN* (R/P) étant associée à un meilleur pronostic alors que l'absence de mutation N/F et/ou la présence de mutation de R/P sont associées à un moins bon pronostic. Ces données ont pu être confirmées par d'autres études que ce soit pour les LAL-T pédiatriques ou adultes (183). L'équipe française de l'hôpital Necker à l'origine du classifieur NFRP vient de publier une nouvelle étude ayant permis l'extension de ce classifieur (184). Des altérations de ***NOTCH1/FBXW7*, *PHF6* et *EP300*** sont associées à un pronostic favorable alors que des altérations des voies ***RAS*, *PI3K*, de *TP53*, *IDH1/2*, *IKZF1* et *DNMT3A*** sont associées à un risque plus élevé de rechutes. Le nouveau classifieur propose d'associer 4 situations différentes, de risque favorable ou défavorable, à d'autres facteurs pronostiques comme la MRD (Figure 12).

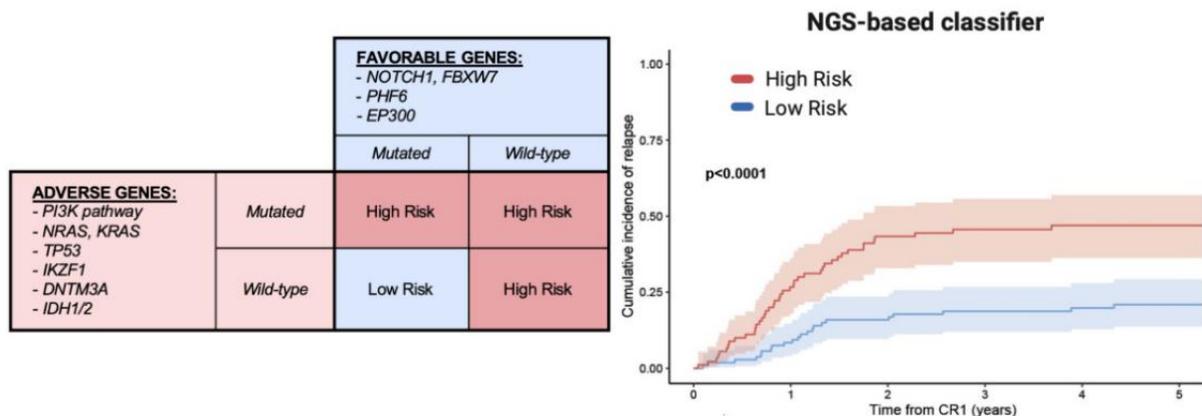


Figure 12 : Classifieur moléculaire étendu proposé par *Simonin et al.* (184).

D'autres études s'intéressent plutôt aux CNV ou à d'autres anomalies chromosomiques non spécifiques (caryotype complexe, chromothripsis, aneuploïdie) comme marqueurs pronostiques. *Balducci et al* ont publié récemment les résultats d'une étude par SNP-array sur plus de 300 LAL-T pédiatriques et adultes (185). Les altérations les plus fréquemment retrouvées étaient les délétions suivantes : 9p21 (70%, *CDKNA/B*), 13q14 (14%, *RB1*, *DLEU1*), 6q15 (11%, *CASP8AP2*), 1p33 (11%, *STIL::TAL1*), 12p13 (9%, *ETV6*, *CDKN1B*), 18p11 (9%, *PTPN2*), 1p36 (9%, *RPL22*), 17q11 (8%, *NF1*, *SUZ12*), 4q25 (7%, *LEF1*), 19p13 (6%, *DNM2*), 16q22 (6%, *CTCF*). Les autres CNV, délétions ou gain, étaient présents dans moins de 5% des cas. Ils ont pu confirmer ou bien mettre en évidence de nouveaux **facteurs de mauvais pronostic** en terme de survie et de risque de rechute : i) la **complexité génomique (≥ 15 CNV)** ; ii) les **délétions de *IKZF1*** (186), ***PTEN*** (187), ***TP53*** (188) et ***CREBBP*** ; iii) le **gain de *MLLT4*** ; iv) le **chromothripsis** (189). A noter que les délétions et gains ci-dessus font partis des CNV retrouvés dans moins de 5% des cas. En prenant en compte ces critères, ils ont identifié 22% de la cohorte comme étant de haut-risque et cela indépendamment des autres facteurs pronostiques établis. Les analyses de cytogénétique conventionnelle ont également décrit un **pronostic défavorable** pour les **caryotypes complexes** (190), dont la définition varie dans les LAL-T avec plus de 3 ou plus de 5 anomalies, et **favorable** pour les caryotypes **para-tétraploïdes** (191).

I.6.3.2.3. Anomalies associées à la rechute

Les LAL-T réfractaires ou en rechute sont encore très fréquentes et elles sont de très mauvais pronostic notamment par le manque d'option thérapeutique. La plupart des études de la génétique à la rechute se font sur les LAL B ou T confondues. L'évolution clonale conduisant à la rechute est semblable entre les LAL des deux lignages B ou T avec des altérations communes comme *CREBBP* (70), *NT5C2* (68), *NR3C1* (71) ou encore *TP53* (72) par exemple. Cependant, certaines altérations sont plus associées aux rechutes des LAL-T comme celles impliquant les voies *RAS/PTEN* et *IL7R/JAK/STAT* (192). La présence de mutations de *NT5C2*, *TP53*, *NRAS/KRAS*, *CNOT3* et/ou *IL7R* pourrait constituer un groupe de très haut risque à la rechute (193). A l'inverse, l'absence de mutations de *TP53*, *MSH6*, *USP7*, *NRAS*, *KRAS*, *CNOT3* et *IL7R* définirait un groupe de patients avec une meilleure survie à la rechute.

Au final, malgré des avancées considérables dans la compréhension de la génétique des LAL-T, la poursuite des études est nécessaire afin d'établir des consensus dans la classification mais surtout la stratification pronostique des patients. En effet, contrairement aux LAL-B, les résultats génétiques sont encore peu utilisés par rapport aux autres facteurs pronostiques qui seront détaillés par la suite. L'utilisation d'approches multi-omiques (194) (génomique, transcriptomique et protéomique) est de plus en plus recommandée pour identifier tous les acteurs actionnables et proposer des thérapies ciblées de plus en plus individualisées.

I.7. Stratification pronostique

L'identification des facteurs pronostiques est requise pour la stratification des patients afin d'établir la meilleure prise en charge possible. Elle permet de limiter les traitements et leur toxicité potentielle pour les cas les plus favorables ou au contraire de les intensifier dans les cas à risque plus élevé mais également de sélectionner les patients éligibles à une allogreffe

de CSH. Les facteurs pronostiques identifiés peuvent être divisés en trois catégories en relation avec le patient, la maladie et enfin la réponse au traitement (1,195) (Tableau 5). Ils ont d'abord été définis en pédiatrie mais sont applicables aux adultes (196). Ils sont également pour la plupart communs aux LAL-B et LAL-T.

Tableau 5 : Facteurs pronostiques des LAL, adapté de *Malard et al* (1).

	Favorable	Défavorable
Facteurs pronostiques liés au patient		
Age	1 à <10 ans	<1 an et ≥10 ans
Sexe	Féminin	Masculin
Ethnie	Caucasien	Afro-américains, Hispaniques
Facteurs pronostiques liés à la maladie		
Atteinte SNC	Non	Oui
Infiltration sanguine blastique	<50 G/L	≥50 G/L
Immunophénotypage	Lignage B	Lignage T
Caractéristiques génétiques	Hyperdiploïdy <i>ETV6::RUNX1</i> <i>DUX4-r, NUTM1-r</i>	Hypodiploïdie Ph+/Ph-like, <i>iAMP21</i> <i>KMT2A-r, MEF2D-r, MYC-r</i> <i>TCF3::HLF, CDX2/UBTF</i>
Facteurs pronostiques liés à la réponse au traitement		
Sensibilité aux glucocorticoïdes	Bonne (<1 G/L)	Mauvaise (≥1 G/L)
% blastes médullaires (J8/15)	<5%	≥5%
Maladie résiduelle (MRD)	Faible (<0,01%) ou indélectable	≥0,01%

Les **facteurs pronostiques liés au patient** concernent l'âge, le sexe et l'origine ethnique. Un sexe masculin ainsi que les ethnies afro-américaines et hispaniques sont des facteurs défavorables. Le risque plus élevé de certaines ethnies est dû à la présence plus importante d'anomalies génétiques défavorables dans ces groupes comme par exemple les *CRLF2-r* pour les hispaniques. Cependant, seul l'âge est réellement utilisé dans la stratification avec un facteur favorable entre 1 an et 10 ans et un facteur défavorable avant 1 an et après 10 ans. Pour les adultes, un risque défavorable est corrélé un âge plus avancé.

Les **facteurs pronostiques liés à la maladie** reposent sur les caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques. La présence d'une **atteinte du SNC** est un facteur défavorable. C'est également le cas d'une **forte infiltration sanguine blastique** au diagnostic avec un seuil défavorable au-dessus de $50 \cdot 10^9$ cellules/L (ou G/L). Ce seuil est parfois augmenté à 100 G/L pour les LAL-T. Le **lignage T** des blastes (LAL-T) déterminé par l'immunophénotypage est un facteur défavorable par rapport au lignage B. Au sein des LAL-T, le phénotype ETP est également plus défavorable. Enfin, les **caractéristiques génétiques** prennent de plus en plus d'importance dans la stratification des LAL-B avec l'identification d'anomalies primaires de pronostic favorable (hyperdiploïdie, *ETV6::RUNX1*, *DUX4-r* et *NUTM1-r*) ou défavorable (hypodiploïdie, *KMT2A-r*, *BCR::ABL1/Ph+*, Ph-like, *TCF3::HLF*, *iAMP21*, *MEF2D-r*, *MYC-r*, *CDX2/UBTF*). Certaines anomalies secondaires, délétion de *IKZF1* principalement, sont utilisées dans certains protocoles. En revanche, l'apport de la génétique dans la stratification des LAL-T reste encore limité en attendant des recommandations consensuelles sur le pronostic des anomalies primaires ainsi que sur l'utilisation des classiers moléculaires/génomiques proposés.

Les **facteurs pronostiques liés à la réponse précoce au traitement** correspondant à l'évaluation de la persistance ou non de cellules leucémiques après les premières étapes du traitement. Deux critères facilement mesurables peuvent être utilisés : i) la **sensibilité aux glucocorticoïdes** : le taux de blastes sanguins après une semaine de traitement aux glucocorticoïdes est associé à une bonne (<1 G/L) ou mauvaise réponse (>1 G/L) ; ii) la **réponse complète cytologique** (moins de 5% de blastes médullaires à J8-15 ou à la fin de l'induction) est favorable. Ces deux critères bien que toujours utilisés par certaines équipes sont de plus en plus supplantés par l'évaluation de la **maladie résiduelle (MRD)** qui s'est révélée être le facteur pronostic indépendant le plus important ces dernières années. Celle-ci est mesurée à différents moments importants du traitement, variables selon les protocoles mais au moins à la fin de l'induction, et la présence d'une MRD positive ($\geq 0.01\%/10^{-4}$) est un facteur défavorable suffisant à lui-seul pour déterminer la nécessité de l'intensification du traitement ou d'une allogreffe. L'évaluation de la MRD nécessite des techniques capables de discriminer une cellule leucémique parmi d'innombrables cellules normales avec un seuil de sensibilité minimum recommandé de 10^{-4} (c'est-à-dire 1 cellule leucémique pour 10000 normales). La CMF, en utilisant le profil immunophénotypique blastique identifié au diagnostic (méthode LAIP, leukemia associated immunophenotype), est l'une des options mais le seuil de sensibilité n'est pas toujours atteint. Les autres options sont des approches moléculaires, basées sur la détection de réarrangements clonaux des immunoglobulines (Ig) et/ou du TCR ou bien d'un transcrite de fusion identifié au diagnostic, avec principalement la RT-qPCR (sensibilité de 10^{-4} à 10^{-5}) et plus récemment la PCR digitale ou le séquençage de nouvelle génération (NGS, sensibilité jusqu'à 10^{-6}) mais plus difficilement accessible et avec un coût élevé (197).

I.8. Traitement et survie

Dans les années 1960, bien que l'utilisation de combinaisons de chimiothérapies permettait d'obtenir une rémission dans 80 à 90% des LAL pédiatriques, une rechute (souvent au niveau du SNC) survenait dans la quasi-totalité des cas avec des taux de survie extrêmement faible, de 10 à 20% (195). A partir de là, plusieurs avancées au cours des dernières décennies ont permis une amélioration significative du traitement des LAL : une thérapie ciblée sur le SNC, la prise en compte des facteurs pronostiques précédents et la mise en place de schéma consensuel de traitement, surtout en pédiatrie, grâce aux nombreux essais cliniques réalisés. Cette approche thérapeutique plus intensive a permis d'obtenir maintenant une survie globale dans 90% des LAL pédiatriques. Les taux de survie sont encore faibles chez les adultes mais la mise en place de l'utilisation des régimes thérapeutiques pédiatriques dans cette population tend à l'améliorer. Des progrès sont encore nécessaires et sont déjà en cours avec l'instauration des algorithmes de traitements basés sur la MRD, l'amélioration des soins de supports, et l'inclusion de nouvelles thérapies (1,155).

I.8.1. Traitement courant

La première ligne de traitement des LAL inclue classiquement quatre phases durant 2 à 3 ans : induction, consolidation, intensification et maintenance. La **phase d'induction**, d'une durée d'environ 30 jours, a pour but de détruire le maximum de cellules leucémique afin d'obtenir une rémission complète. Elle est basée sur l'association de glucocorticoïdes (prednisone ou dexaméthasone), vincristine, L-asparaginase et une anthracycline. Les toxicités de ces molécules nécessitent une surveillance particulière. Un monitoring biologique de l'activité de

l'asparaginase est également nécessaire. La **phase de consolidation** consiste en l'administration séquentielle toutes les deux semaines de cytarabine, méthotrexate à forte doses, vincristine, asparaginase, mercaptopurine et glucocorticoïdes sur une période de 12 semaines. Elle est suivie par une **phase d'intensification** avec la même combinaison utilisée pour l'induction. Enfin, la **phase de maintenance** dure environ 2 à 3 ans avec l'administration de mercaptopurine journalière, de méthotrexate chaque semaine, de glucocorticoïdes tous les 1 à 3 mois et avec ou sans vincristine (1).

A cela s'ajoute une prophylaxie durant toutes les phases pour prévenir les rechutes du SNC. L'irradiation crâniale était le standard mais du fait de ses effets secondaires importants elle est maintenant remplacée par l'utilisation de chimiothérapies intrathécales avec du méthotrexate seul ou avec cytarabine et hydrocortisone ainsi que des fortes doses de méthotrexate et cytarabine en intraveineuse.

Pour les patients à haut risque, s'ils sont éligibles et qu'un donneur est disponible, le standard pour la consolidation est l'**allogreffe de CSH**. Elle est recommandée en 1^{ère} ligne dans les LAL-B Ph+. Son utilisation a aussi été validée plus généralement chez l'adulte (>18 ans) en se basant sur les résultats de MRD dans le cas où la chimiothérapie était intensive (c'est-à-dire du type régime pédiatrique). Elle est de plus en plus envisagée dans les cas restants en se basant sur l'ensemble des paramètres pronostiques et en fonction des patients. Elle est également recommandée pour les patients réfractaires ou en rechute, surtout adultes, après la deuxième rémission complète (1).

A l'inverse, des stratégies de désintensification sont proposées pour les cas pédiatriques de bon pronostic.

I.8.2. Thérapies innovantes et perspectives

Malgré l'augmentation considérable des taux de survie grâce aux traitements de 1^{ère} ligne basés sur la poly-chimiothérapie, il est primordial de pouvoir proposer d'autres lignes de traitement pour deux raisons principales. Tout d'abord, la toxicité importante des chimiothérapies entraîne des effets indésirables importants à court terme jusqu'à la mortalité mais aussi à plus long terme avec un impact sur la qualité de vie. Les patients fragiles ne supportent donc pas les doses intensives requises et il n'est pas possible d'augmenter encore plus les doses dans les cas les plus défavorables. Ensuite, les traitements classiques sont très souvent insuffisants pour les LAL réfractaires ou en rechute (LAL R/R) du fait de l'acquisition d'altérations entraînant la résistance à certaines molécules.

De nouvelles thérapies ciblées sont déjà autorisées, d'autres montrent des résultats très prometteurs et de nombreuses sont en train d'émerger (Figure 13). On peut les diviser en deux groupes : les immunothérapies et les autres thérapies ciblées.

I.8.2.1. Immunothérapies

L'utilisation déjà importante de l'immunothérapie dans les pathologies lymphoïdes B matures a facilité son implantation dans les stratégies thérapeutiques pour les LAL-B mais des perspectives sont en cours d'étude dans les LAL-T également.

La plupart des immunothérapies sont basées sur la reconnaissance par un Ac monoclonal d'une cible antigénique exprimée par les cellules leucémiques. Ensuite, différents mécanismes sont utilisés pour la destruction de ces cellules :

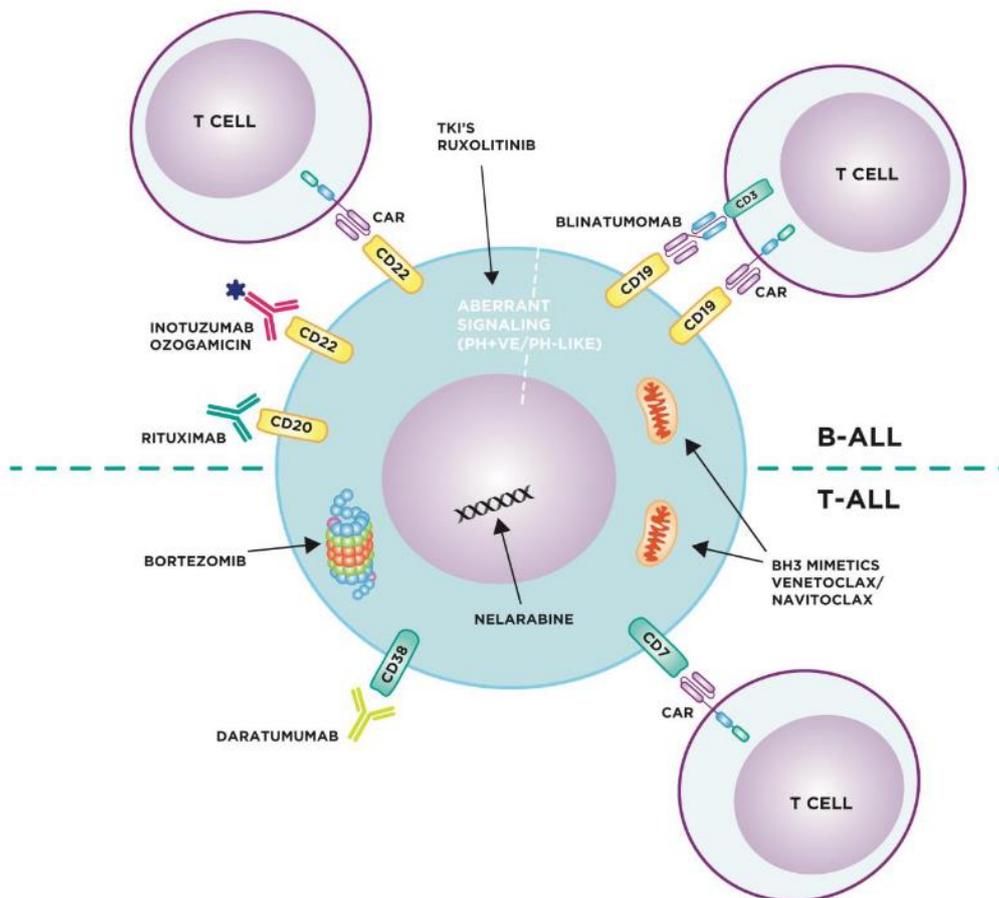


Figure 13 : Thérapies ciblées principales dans les LAL-B et LAL-T (198).

- La reconnaissance de la cible induit un signal ou une réponse immune entraînant l'apoptose. C'est le cas du **rituximab** ciblant le **CD20**, exprimé dans un tiers des LAL-B et souvent associé à un pronostic défavorable (81). Cet anti-CD20 avec des résultats prometteurs en essai clinique chez les adultes R/R est également en évaluation en 1^{ère} ligne en combinaison avec la chimiothérapie (199). De meilleurs résultats ont aussi été rapportés avec l'**ofatumumab** en essai clinique (200). Aucun des deux anti-CD20 n'est pour l'instant autorisé officiellement hors essai. Le **CD38**, exprimé notamment sur les cellules lymphoïdes, est une cible étudiée en particulier dans les LAL-T. Le **daratumumab**, anti-CD38 déjà utilisé dans le traitement du myélome, a en effet montré des résultats précliniques (201) et quelques résultats cliniques intéressants (173).

-L'Ac est lié chimiquement (Ac immunoconjugué) à une substance toxique qui induira la mort de la cellule. Une des cibles pour ce mécanisme est le **CD22**, exprimé dans 90% des LAL-B. Après liaison avec un Ac, le CD22 est rapidement internalisé ce qui rend ce mécanisme intéressant. L'**inotuzumab ozogamicin**, anti-CD22 conjugué à une calicheamicine, a été autorisé en 2017 pour les LAL-B de l'adulte R/R Ph- après de bons résultats (202) mais sa forte toxicité hépatique est à prendre en perspective. Des essais cliniques sont en cours en pédiatrie et également sur d'autres molécules ciblant le CD22 (comme l'epratuzumab) ou le CD19 (1).

D'autres immuno thérapies sont basées sur une réponse cellulaire :

- Les Ac bispécifiques : L'Ac, en plus de reconnaître une cible présente sur la cellule leucémique, reconnaît également le récepteur des cellules T ce qui permet d'engager celle-ci dans la réponse immune. C'est le cas du **blinatumomab** qui reconnaît le **CD19**, exprimé dans 90% des LAL-B, et le CD3 sur les cellules T. Il est autorisé pour les patients R/R Ph- à partir de 1 an ainsi qu'en consolidation et pour les adultes Ph- avec MRD positive (203). Les résultats des essais sont également prometteurs pour d'autres groupes comme les patients plus âgés ou les LAL-B Ph+ en combinaison avec les ITK (155).

- Les cellules CAR-T (Chimeric antigen receptor T). Ce sont des cellules T issues du patient lui-même dont le récepteur est génétiquement modifié afin de reconnaître une cible sur la cellule tumorale pour la détruire lors de la réinjection autologue des cellules au patient. Leur efficacité importante dans les LAL-B a permis l'obtention de l'autorisation de mise sur le marché (AMM) pour deux d'entre eux ciblant le **CD19** dans les cas R/R : d'abord le **tisagenlecleucel** (204) pour les patients jusqu'à 25 ans puis le **brexucabtagene autoleucel** (205) pour ceux de 26 ans et plus. Cependant, plusieurs inconvénients sont à prendre en compte : le délai de fabrication, le coût très important et les effets indésirables importants que sont les syndromes de relargage cytokinique (CRS, cytokine release syndrome) et de neurotoxicité (ICANS, immune effector cell-associated neurotoxicity syndrome) (155). Des CAR-T ciblant le CD22 ou simultanément le CD19 et le CD22 ont été développées et sont en cours d'étude (1). L'utilisation des CAR-T dans le traitement des LAL-T est moins avancé à cause de certaines difficultés : trouver une cible adéquate, obtenir suffisamment de lymphocytes T matures sans contamination par les lymphoblastes. Des CAR-T ciblant le CD5, CD7, CD1 ou CD38 sont tout de même en développement. La production de CAR-T allogénique (c'est-à-dire provenant d'un donneur sain) est également envisagée (173).

I.8.2.2. Autres thérapies ciblées

La compréhension de la génétique des LAL a permis l'émergence de nombreuses thérapies ciblées basées sur l'utilisation d'inhibiteurs dans le but de bloquer les voies de signalisation activées par les anomalies génétiques ou autres dérégulations qu'elles ont induites. D'autres thérapies ciblées agiront sur des processus biologiques bloqués ou altérés de façon commune par les cellules tumorales hématologiques ou non comme l'apoptose par exemple.

La révolution majeure a été l'utilisation des **ITK** dans les LAL-B Ph+ qui a permis d'améliorer considérablement le pronostic (206). Il est donc maintenant recommandé de les inclure dans les stratégies thérapeutiques des patients concernés dès que possible. Des essais cliniques sont en cours quant à l'utilisation des ITK ou inhibiteurs de JAK pour les patients Ph-like (155).

Comme dans d'autres hémopathies, une surexpression de BCL2 est retrouvée dans certaines LAL-B ou T. Logiquement, une sensibilité à des **inhibiteurs de BCL2** comme le vénétoclax a été observée dans plusieurs études. L'intérêt de l'utilisation de ces inhibiteurs, notamment en combinaison, est en cours d'évaluation. La surexpression de BCL2 étant corrélée à certaines entités de LAL-B (KMT2A-r, TCF3-HLF et hypodiploïdie) ou T (ETP-LAL), le vénétoclax serait d'autant plus intéressant dans ces groupes (207).

Dans les LAL-T R/R (adultes et pédiatriques), la **nélarabine** (208) est la seule nouvelle thérapie ciblée à avoir été autorisée au cours des 20 dernières années. C'est un analogue de la purine qui va inhiber la synthèse de l'ADN. Son accumulation plus importante dans les lymphoblastes de lignage T par rapport à d'autres cellules hématopoïétiques a motivé son

étude dans les LAL-T. En monothérapie, les résultats sont intéressants surtout en pédiatrie mais la toxicité est importante. Des associations sont en cours d'évaluation (173).

Le **bortezomib**, un inhibiteur du protéasome déjà utilisé dans le traitement du myélome multiple, a montré une activité intéressante dans certaines études préliminaires, plutôt dans les LAL-T et LBL-T. En inhibant la sous-unité 26S du protéasome, il altère la dégradation des protéines ce qui induit l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose.

D'autres options de thérapies ciblées sont en cours d'évaluation dans les LAL-B et LAL-T. Etant pour la plupart assez spécifique d'une entité, elles ont déjà été citées précédemment dans la partie descriptive de la génétique.

L'immunothérapie et les autres thérapies ciblées, comme c'est déjà le cas avec les ITK, seront de plus en plus incluses dans les stratégies thérapeutiques, tout d'abord dans les LAL-B ou les essais cliniques sont les plus avancés. Des progrès considérables restent à faire en particulier dans les LAL-T où l'arsenal thérapeutique est encore très limité. Afin de surmonter cette limitation, plusieurs équipes tendent à promouvoir une thérapie individualisée à chaque patient en utilisant des plateformes fonctionnelles multi-omiques et en testant la sensibilité de multiples agents thérapeutiques connus sur les cellules leucémiques du patient cultivés *in vivo* (155).

Pour conclure cette première partie, les altérations génétiques sont des acteurs majeurs pour la stratification pronostique des patients et l'utilisation des thérapies ciblées. L'évolution de leur compréhension a été permise grâce aux techniques de séquençage haute résolution. Cependant, leur détection en pratique est un challenge de par l'absence de ces nouvelles techniques très coûteuses dans la majorité des laboratoires d'hématologie de routine en France. L'hétérogénéité, l'augmentation importante du nombre d'anomalies et leur répartition sur l'ensemble du génome (Figures 14 et 15) nécessitent alors l'utilisation simultanée, dans ces laboratoires, de multiples techniques cytogénétiques et moléculaires de routine bien que souvent insuffisamment résolutive. Pour pallier à cela, l'intérêt d'une nouvelle technique, l'Optical Genome Mapping, a émergé au cours des dernières années.

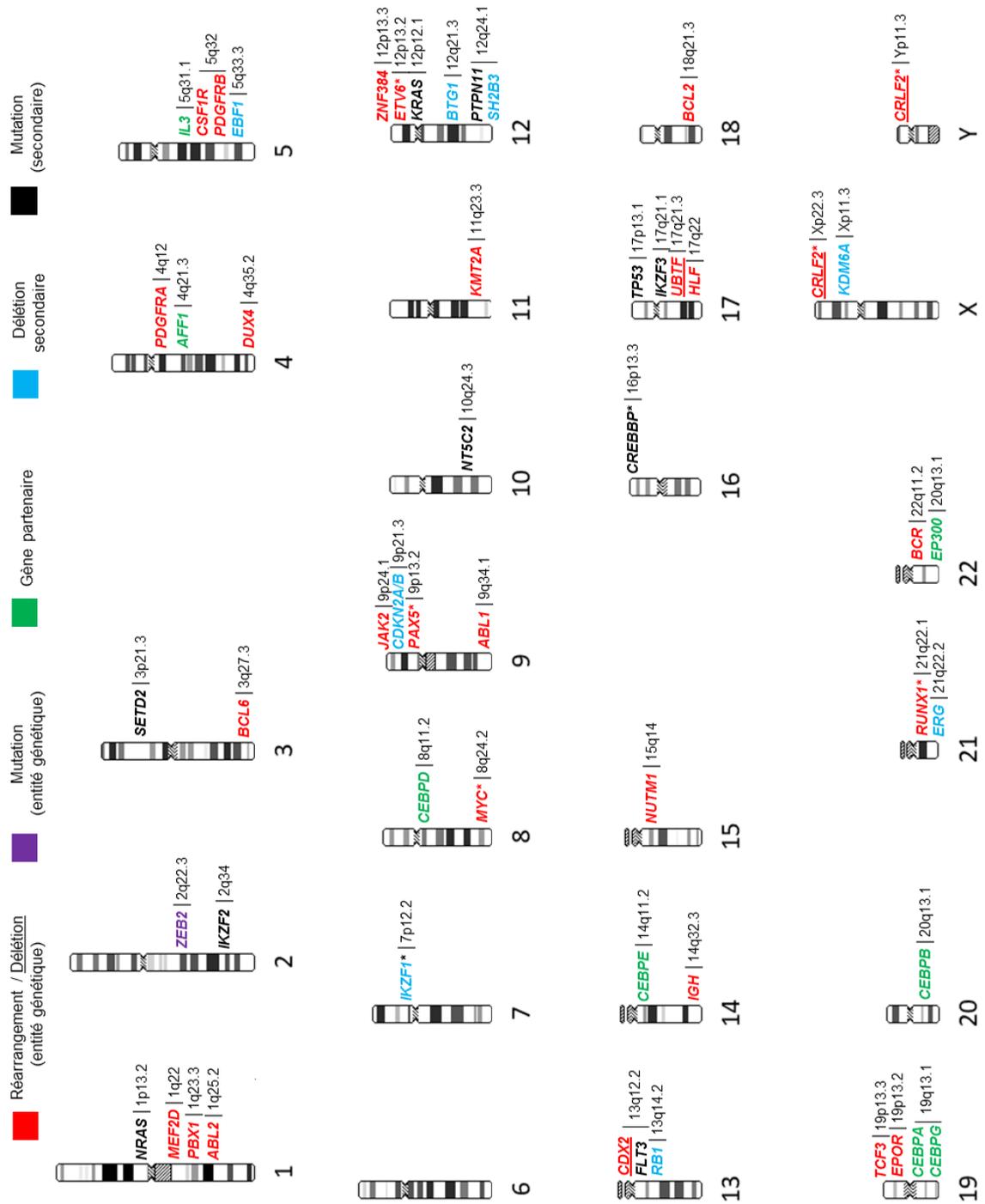


Figure 14 : Localisation chromosomique des principaux gènes altérés dans les LAL-B.

La présence d'une astérisque (*) après un gène indique la possibilité de plusieurs altérations différentes. Les gènes sont localisés approximativement sur les chromosomes mais leur position précise est indiquée à côté.

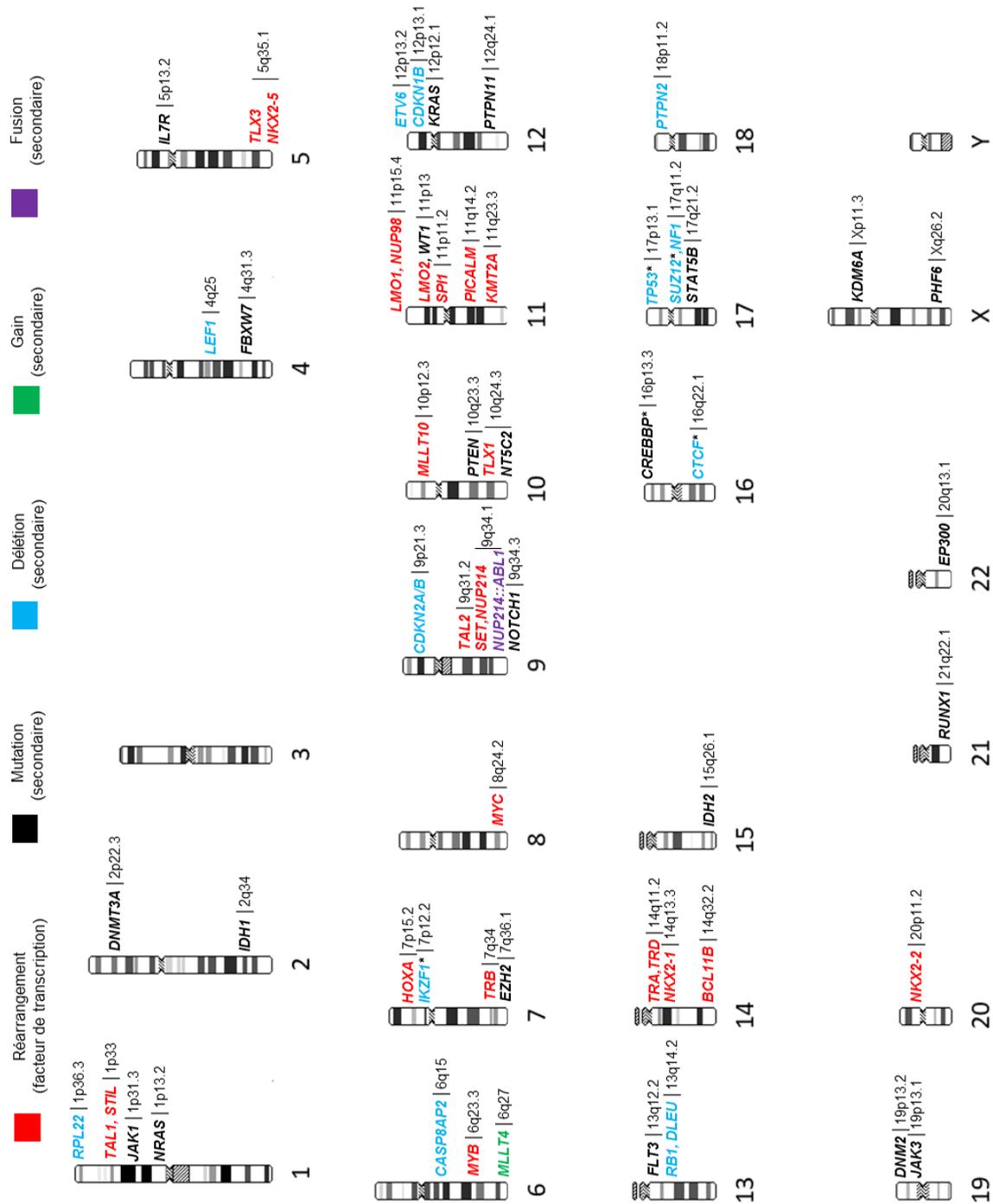


Figure 15 : Localisation chromosomique des principaux gènes altérés dans les LAL-T.

La présence d'une astérisque (*) après un gène indique la proportion importante de mutation en plus des délétions. Les gènes sont localisés approximativement sur les chromosomes mais leur position précise est indiquée à côté.

II. Techniques pour l'exploration génétique des LAL en routine : de la cytogénétique à l'Optical Genome Mapping

Avant de discuter des techniques disponibles pour l'exploration génétique, il est nécessaire de classer en plusieurs groupes les différents types d'anomalies génétiques retrouvés dans les LAL selon les contraintes technologiques :

- Les gains ou pertes de matériel génétique de grande taille (>500kb), appelés anomalie du nombre de copies (CNV). Lorsque ces CNV concernent la totalité d'un chromosome, on parle alors **d'aneuploïdies**. Cela correspond aux trisomies, tétrasomies ou monosomies au caryotype.
- Les anomalies chromosomiques de structure (SV, Structural Variations) : On en distingue deux types : i) équilibrées : **translocations ou inversions**, visibles ou non (cryptiques) au caryotype ; ii) déséquilibrées, c'est-à-dire avec gain ou perte de matériel génétique de taille moyenne (500pb à 500kb) **duplications, insertions, amplifications, délétions** mais également des **translocations** lorsqu'un seul chromosome dérivé est présent.
- Les anomalies moléculaires : principalement les **mutations ponctuelles** de l'ADN, appelées **SNV** (Single Nucleotide Variation), mais aussi des insertions et/ou délétions de petite taille (<500 pb), aussi appelées Indel.

Tous ces types d'anomalies sont présents dans les LAL, ce qui nécessite un arsenal de techniques adaptées à leur exploration.

II.1. Techniques cytogénétiques et moléculaires actuelles de routine

Les techniques cytogénétiques et moléculaires de routine ont permis de décrire les premières anomalies génétiques récurrentes des LAL. La cytogénétique conventionnelle, avec le **caryotype** puis la **FISH** (fluorescence in situ hybridization), a mis en évidence les anomalies chromosomiques de grande taille avec principalement des aneuploïdies (hyperploïdie ou hypoploïdie) et des translocations réciproques. Les gènes mis en jeu dans ces translocations, supposés par les points de cassure, ont pu être confirmés par les connaissances et les techniques moléculaires. Lorsque les points de cassure au niveau des gènes sont récurrents entre les patients, ce qui est majoritairement le cas pour les LAL, la **RT-qPCR** permet de rechercher les transcrits de fusion correspondant aux translocations au niveau moléculaire. Ces 3 techniques sont pour l'instant le « gold standard » et le minimum obligatoire en routine pour la recherche des anomalies génétiques primaires des LAL.

La cytogénétique moléculaire, avec les techniques d'analyse chromosomique sur puce à ADN (ACPA), **CGH array** (Comparative Genomic Hybridization) et **SNP array** (Single Nucleotide Polymorphism), présente une résolution plus importante pour l'étude des anomalies du nombre de copies (CNV) de plus petite taille (duplications et délétions) très fréquentes dans les LAL bien que secondaires. L'analyse moléculaire **MLPA** (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) permet également de détecter ces CNV de façon ciblée (209). Enfin, La **RT-MLPA** (MLPA après transcription inverse) permet de rechercher simultanément plusieurs transcrits de fusion et a donc remplacé en routine la RT-qPCR spécifique de cible au diagnostic. Enfin, le **NGS** peut être utilisé avec des panels ciblés de gènes pour lesquels des mutations récurrentes sont décrites. Le séquençage à partir d'ADN a un intérêt dans les LAL-T où les mutations sont fréquentes et avec un impact pronostic décrit. Il est en revanche plus limité dans les LAL-B. C'est pourquoi le séquençage de l'ARN (**RNaseq**) est souvent préféré

car il permet la détection des mutations mais également des transcrits de fusion ainsi que la mise en évidence des profils d'expression génique. Son implantation en routine est cependant encore limitée.

Toutes ces techniques cytogénétiques et moléculaires ont pour avantage d'être simples, rapides et peu coûteuses. Elles présentent cependant des inconvénients :

- Le caryotype est une analyse pan-génomique des altérations chromosomiques équilibrées ou déséquilibrées mais avec une résolution très faible (>10 Mb) limitant le nombre d'anomalies visibles. Une étape de culture appropriée est requise et elle peut aboutir à des résultats en échec par absence total de mitose ou peu contributifs par absence de mitose clonale en fonction de l'index prolifératif des blastes, faible dans les LAL. De plus, la qualité des mitoses est souvent médiocre avec des chromosomes difficilement identifiables, ce qui complique encore l'interprétation du caryotype.
- La FISH est plus résolutive (100-500kb) mais ciblée et ne permet donc pas d'avoir une vision globale du génome. Elle nécessite l'utilisation d'autant de sondes que de cibles (6 à 8 en moyenne dans les LAL avec les nouvelles classifications et recommandations), ce qui augmente considérablement le temps et le coût d'analyse. L'étude de certains gènes d'intérêt n'est également pas possible en l'absence de sonde commerciale spécifique. De plus, l'interprétation peut être complexe dans certains cas de figure.
- Les techniques d'ACPA (CGH-array ou SNP-array) sont pan-génomiques et résolutes (>50 kb) mais elles ne détectent que les anomalies déséquilibrées. Il en est de même pour la MLPA qui a en plus l'inconvénient d'être ciblée.
- La RT-qPCR et la RT-MLPA permettent la mise en évidence des transcrits de fusions mais également seulement de façon ciblée.

Afin de pouvoir détecter la majorité des anomalies génétiques retrouvées dans les LAL, c'est-à-dire les CNV et SV, les différentes techniques de routine doivent être combinées (caryotype, FISH, étude des CNV et RT-MLPA) pour pallier à leurs inconvénients respectifs. Cela entraîne une complexité dans la prise en charge ainsi qu'une augmentation des coûts. De plus, cette association n'est pas toujours suffisante pour répondre aux nouveaux besoins de stratification pronostique et thérapeutiques.

La mise en place en routine d'une technique à la fois pan-génomique, résolutive et détectant les différents types d'anomalies semble donc nécessaire pour les années à venir. Les techniques à haute résolution de séquençage du génome (**WGS**, whole genome sequencing) ou du transcriptome (**WTS**, whole transcriptome sequencing) sont des candidats intéressants puisque ce sont les seules permettant théoriquement la détection des SV, CNV et SNV en une analyse unique. Cependant, leur utilisation est difficilement transposable à une pratique de routine à cause de plusieurs limites logistiques, techniques et surtout financières (210). Dans ce contexte, une autre technique récente, l'**Optical Genome Mapping (OGM)**, dont le principe est plus proche des puces à ADN et de la cytogénétique, se présente de plus en plus comme un candidat intéressant répondant aux critères requis et dont la mise en place en routine semble plus facilement réalisable.

II.2. Présentation de l'Optical Genome Mapping

L'Optical Genome Mapping (OGM), ou cartographie optique du génome (COG), est une technique d'analyse génétique pan-génomique permettant la détection à la fois des SV et des CNV en une analyse unique et avec une sensibilité et une résolution supérieures aux techniques standards. Cela est possible grâce à l'utilisation de longs fragments d'ADN (0.15-2.5Mb) de très haut poids moléculaire (UHMW, ultra-long high-molecular-weight). Etant basée sur le marquage de l'ADN et non le séquençage, elle se rapproche plutôt sur le principe et sur l'interprétation des techniques d'analyses chromosomiques comme celles de cytogénétique. Le terme de « Next-Generation Cytogenetics » (NGC) a donc été introduit pour faire le parallèle avec le terme « NGS » (211).

Initialement utilisé en recherche génomique sur des microorganismes puis sur les plantes et vertébrés, l'OGM a montré ces dernières années un intérêt dans l'étude des altérations chromosomiques en génétique constitutionnelle mais surtout pour la génétique des cancers. En effet, les tumeurs solides et hématologiques sont caractérisées par un nombre important d'altérations chromosomiques (SV et CNV), qui plus est, en augmentation constante grâce à la recherche. Son utilisation pour l'étude des tumeurs solides est cependant limitée en pratique par la difficulté d'obtenir de l'ADN de qualité et en quantité suffisantes à partir des cellules cancéreuses. A l'inverse, cela est relativement aisé dans la majorité des néoplasies hématologiques, ce qui explique le développement de l'OGM tout particulièrement dans ce domaine.

La technique OGM est développée et commercialisée par Bionano Genomics (San Diego, CA, USA) qui fournit tous les réactifs et appareils spécifiques nécessaires ainsi que les recommandations allant du pré-analytique au post-analytique ainsi que pour l'interprétation.

II.2.1. Principe de la technique

Les différentes étapes de la technique OGM (Figure 16) sont divisées en 3 phases :

- **Phase pré-analytique : Prélèvement – Stockage**

La technique OGM peut être réalisée à partir d'un **prélèvement sanguin ou médullaire sur tube EDTA, Héparinate ou milieu de culture**. Si l'ADN n'est pas extrait directement après prélèvement, un **stockage à -80°C** est nécessaire pour assurer sa bonne conservation. L'ajout d'un stabilisateur de l'ADN (réactif issu du fournisseur) est nécessaire en l'absence d'EDTA pour la conservation. Trois options sont principalement utilisées pour le stockage à -80°C : i) stockage direct d'au moins 1mL de sang ou de moelle ; ii) stockage sous la forme de culots cellulaires secs préparés selon les recommandations du fournisseur ; iii) stockage des cellules dans le milieu de culture avec ajout de DMSO.

- **Phase analytique : Extraction – Marquage – Acquisition des données brutes**

L'extraction d'ADN est l'étape la plus limitante puisqu'il est impératif d'obtenir de l'**ADN UHMW** pour assurer les performances de la technique. Cela nécessite une extraction manuelle spécifique (selon les recommandations du fournisseur) car les extractions automatisées ne permettent pas pour l'instant une qualité suffisante de l'ADN. De plus, une quantité minimale de cellules vivantes issues du prélèvement est requise, soit environ **1,5 millions de cellules**, pour obtenir de l'ADN de bonne qualité mais également en quantité suffisante (212). L'extraction se réalise en deux jours incluant un temps technique de 2 à 3 heures et une incubation sur une nuit entière.

Après extraction, les molécules sont **marquées par fluorescence** sur de toutes petites régions/séquences spécifiques tout le long de l'ADN. La 1^{ère} méthode proposée par le fournisseur est un marquage indirect avec l'enzyme DLE-1 (Direct Label Enzyme) qui va cibler une séquence de 6 nucléotides, répétée sur l'ADN environ tous les 6 kb, qu'on appelle « label ». On obtient alors le marquage d'environ 15 labels tous les 100kb dans le génome. La 2^{ème} méthode (DLS, direct labeling and staining), plus récente, utilise un marquage direct par l'insertion d'un fluorophore dans un motif spécifique de l'ADN. Elle est recommandée par le fournisseur du fait d'une meilleure qualité du marquage (211). Le marquage nécessite deux jours incluant un temps technique d'environ 1 heure et des étapes de lavage et d'incubation de 1 à 2 heures ainsi qu'une incubation finale sur une nuit entière.

La réalisation à la suite des étapes d'extraction et de marquage nécessite au total 3 jours.

Les molécules d'ADN marquées sont **chargées dans une puce**, elle-même insérée ensuite dans l'appareil permettant l'analyse. Deux appareils sont proposés par le fournisseur en fonction de la cadence d'analyse requise, le Saphyr™ et le Stratys™. L'appareil permet, après **linéarisation des molécules d'ADN** dans des canaux, d'obtenir de multiples **images optiques** de l'ensemble du génome qui seront ensuite converties en **cartes digitales** servant de données brutes. Le temps d'acquisition sur l'appareil sera variable en fonction du pipeline bio-informatique utilisé. Pour la suite de ce manuscrit, le terme « molécules » sera utilisé pour décrire les données brutes.

- **Phase post-analytique : Bioinformatique**

La **comparaison avec le génome de référence** permettra la mise en évidence des altérations chromosomiques et leur annotation. Deux **pipelines bio-informatiques** d'alignement sur le génome de référence sont possibles en fonction des objectifs attendus en terme de sensibilité et de résolution (212). La sensibilité correspond à la capacité d'identifier des anomalies à faible fréquence allélique (VAF, Variant Allele Frequency), c'est-à-dire présentes dans un faible pourcentage de cellules initiales. Elle est corrélée à la profondeur (X), c'est-à-dire le nombre de molécules présentes pour une même région du génome (c'est l'équivalent du nombre de lectures ou reads pour le NGS). La résolution correspond à la taille minimum requise d'une anomalie pour qu'elle soit détectée et elle est corrélée au nombre de labels pour une région donnée.

- Le pipeline « **Rare Variant Assembly** » (RVA) compare directement les molécules obtenues au génome de référence sans faire un assemblage complet du génome. Une analyse de lecture fractionnée recherche les « clusters » ayant des problèmes d'alignement pour identifier les SV. Les CNV sont détectés par la variation de profondeur de certaines régions par rapport aux autres. Cette méthode requiert un temps d'acquisition de 24h afin d'obtenir une profondeur importante (**>300X**) et donc une bonne sensibilité (**VAF >5% et >10%** pour les SV et CNV respectivement). C'est donc le pipeline de choix en hématologie où le pourcentage de cellules anormales est variable et des hétérogénéités clonales sont fréquentes. Cependant, l'absence d'un assemblage complet du génome réduit la couverture globale et donc la résolution (**>5-100kb** en fonction des SV).

- Le pipeline « **De Novo Assembly** », à l'inverse, génère en premier le génome complet de l'échantillon puis le compare au génome de référence. Cela permet, avec un temps d'acquisition plus faible (6-8h), une couverture plus importante et donc une meilleure résolution (**>0,5-70kb** en fonction des SV) mais au dépens de la profondeur (**>100X**) et donc de la

sensibilité (**VAF >20-25%**). Ce pipeline est donc principalement adapté à la génétique constitutionnelle mais il peut venir en complément du RVA dans des cas particuliers.

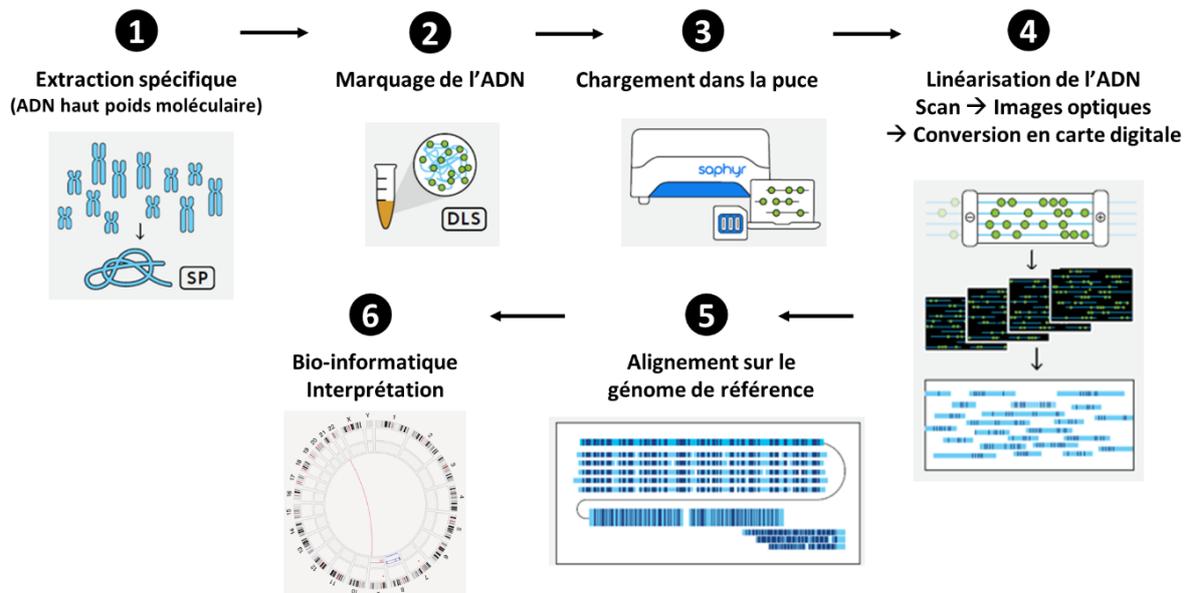


Figure 16 : Schéma des différentes étapes de la technique Optical Genome Mapping, adapté de la brochure du système Saphyr™ (213).

Les trois phases de la technique sont ponctuées par la **vérification de contrôles qualités (CQ)** avec des cibles précisées par le fournisseur (Annexe 3). Si les cibles requises des CQ de la phase pré-analytique (concentration en ADN principalement) ne sont pas atteintes, la technique ne sera pas poursuivie. Si du matériel biologique additionnel est disponible, l'extraction et le marquage pourront être renouvelés. C'est pourquoi il est conseillé de stocker à minima deux aliquots pour chaque prélèvement dans la mesure du possible. Les CQ des phases analytique (profondeur, couverture et longueur moyenne des molécules) et post-analytique (cohérence entre sexe obtenu et attendu, profondeur après pipeline bio-informatique et estimation du bruit de fond des CNV) permettront de vérifier que la qualité des données obtenues permet une performance d'analyse correcte pour l'interprétation et au final un rendu de résultats fiable. En cas de CQ non optimaux, le choix d'interpréter et de rendre des résultats ou non revient aux biologistes responsables. S'ils sont rendus, l'information indiquant que les performances de l'analyse ne sont pas optimales devra être ajoutée au compte-rendu. En 2024, un Consortium international (212) a proposé des recommandations sur l'interprétation des CQ et la possibilité ou non de rendre des résultats, en plus d'autres recommandations sur l'utilisation de l'OGM dans les néoplasies hématologiques.

II.2.2. Principe de l'interprétation

L'analyse et l'interprétation se fait grâce à un logiciel, **Bionano Access**, permettant aux utilisateurs la visualisation et la manipulation des données obtenues sans nécessité de compétences en bio-informatique spécifiques. Différentes interfaces de visualisation (Figure 17) sont disponibles et permettent d'appréhender plus facilement certains types d'anomalies :

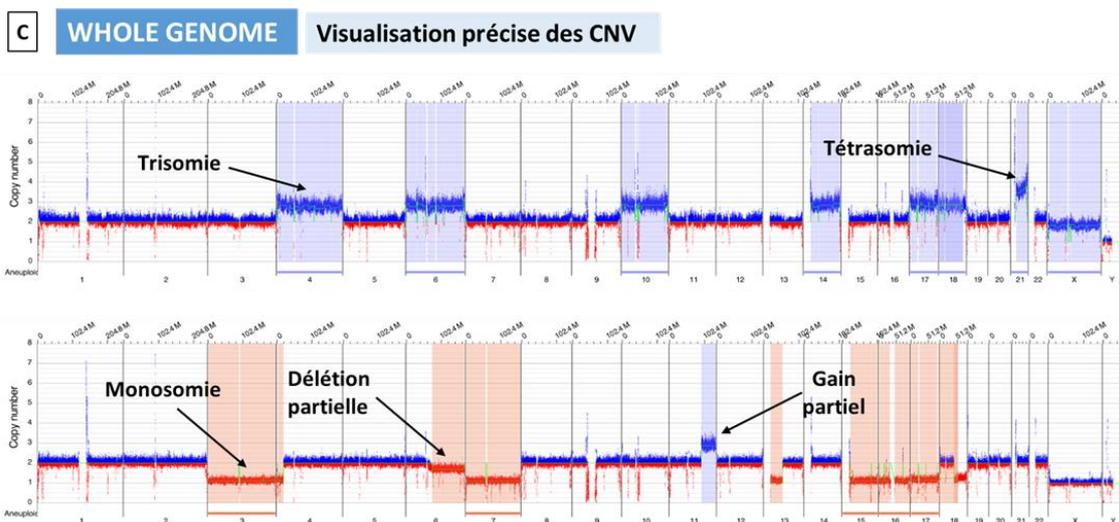
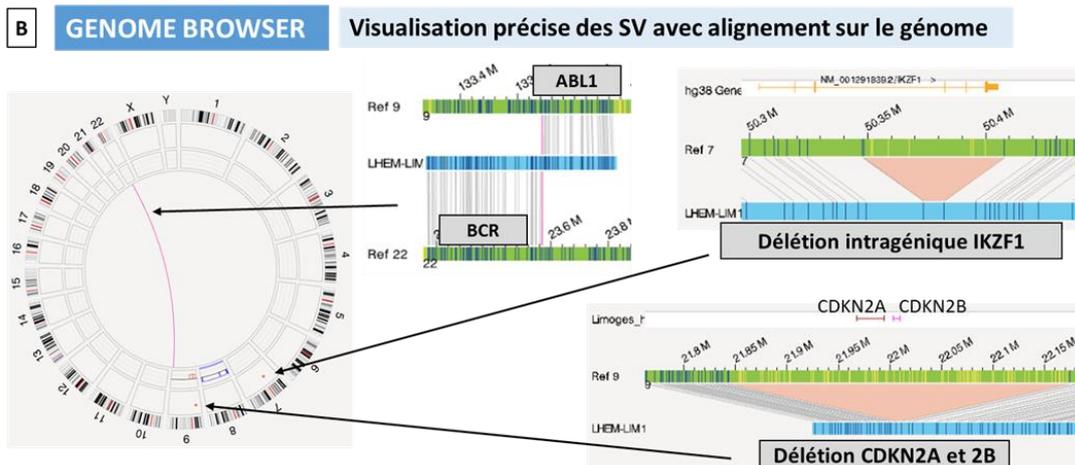
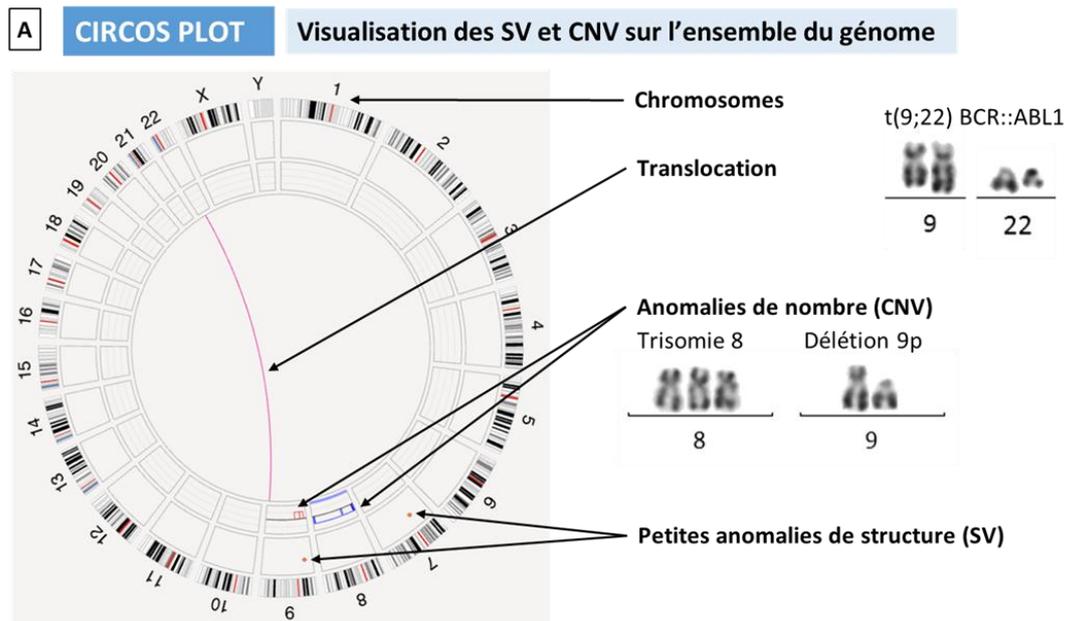


Figure 17 : Différentes interfaces de visualisation pour l'interprétation.

A : Circos plot. **B** : Genome Browser. **C** : Whole Genome. Les anomalies de structure ou de nombre de grande taille identifiables sur le caryotype sont représentées à côté du Circos plot pour comparaison.

- L'interface « **Circos Plot** » (Figure 16A) donne une visualisation des anomalies retrouvées sur l'ensemble du génome. Elle permet donc une vision globale se rapprochant de celle obtenue par le caryotype mais avec une résolution largement supérieure. Les informations sont réparties sous la forme de plusieurs cercles avec de l'extérieur vers l'intérieur : i) la numération des chromosomes ; ii) la représentation des chromosomes avec les **bandes chromosomiques** et le **centromère en rouge** ; iii) les **SV de petites tailles** indiqués par des points ; iv) les CNV avec les gains en bleu et les pertes en rouge ; v) les **translocations et les inversions** indiquées par une ligne rose entre les deux points de cassure. Pour faciliter la visualisation, on peut choisir de n'afficher que certains chromosomes ou bien certains types de SV.

- L'interface « **Genome Browser** » (Figure 16B) est une vue interactive permettant une analyse précise avec alignement sur le génome de référence. Elle est utilisée pour vérifier la pertinence des anomalies identifiées, principalement les SV, et localiser les gènes impactés. Le génome de **référence** est **en vert** et le génome de **l'échantillon en bleu**. Les barres correspondent aux **labels**. Ils sont en bleu lorsque l'alignement est correct et qu'ils sont retrouvés à la fois dans le génome de référence et celui de l'échantillon. Lorsqu'ils sont jaune, cela indique soit la présence d'une anomalie de structure, soit un alignement incorrect. Les points de cassure des translocations sont indiqués par un trait rose au niveau de l'alignement avec le génome de référence. Le profil CNV est également présent sur cette interface. Cela est particulièrement utile pour visualiser l'association d'un CNV à une translocation. Cette interface permet de voir les annotations des anomalies de type SV, c'est-à-dire leurs caractéristiques (localisation, taille, nomenclature, gènes impactés ...) et les paramètres bio-informatiques (VAF, profondeur ...) permettant de les interpréter comme vrai ou faux-positifs.

- L'interface « **Whole Genome** » (Figure 16C), quant à elle, permet une vue d'ensemble mais précise de tous les CNV identifiés sur le génome. Pour un profil CNV normal, le nombre de copies sera de 2 (ou 1 pour les chromosomes sexuels en fonction du sexe) avec une répartition homogène de bleu et de rouge. Pour les CNV présents à forte VAF, les gains et les pertes sont visualisés par la présence uniquement de bleu ou de rouge, respectivement. Pour des VAF plus faible, on ne visualisera qu'une différence de proportion entre le bleu et le rouge. Pour faciliter la visualisation, les **CNV détectés sont mis en surbrillance** par rapport au reste du profil. Les **aneuploïdies** sont identifiées par un **trait horizontal**, sous le profil CNV du chromosome, rouge pour une perte et bleu pour un gain. Cette interface permet de voir les annotations des CNV et des aneuploïdies.

Toutes ces informations sont disponibles avec les pipelines RVA ou De Novo. Des informations additionnelles sur les pertes d'hétérozygoties identifiées et une estimation de la VAF sur l'ensemble du génome sont disponibles avec le pipeline De Novo.

Les pipelines bio-informatiques annotent toutes les anomalies identifiées par comparaison avec le génome de référence. Cela correspond aux données brutes et représente plusieurs centaines ou milliers d'anomalies pour chaque échantillon mais seulement quelques-unes ont un intérêt clinique. A la différence d'autres techniques nécessitant une analyse bio-informatique comme le NGS, le réglage des paramètres d'analyse n'est pas verrouillé. L'analyseur a en effet à sa disposition des filtres permettant de régler ces paramètres. Les données brutes ne seront pas modifiées mais seulement filtrées. Cela permet en grande partie de masquer les artefacts (faux-positifs) et de faciliter l'interprétation. En revanche, un mauvais réglage de ces filtres peut masquer des anomalies pertinentes. Des recommandations sont

données par le fournisseur pour le réglage de ces filtres. D'autres recommandations (212), plus adaptées à l'hématologie, ont été faites par le Consortium selon l'expérience acquise à ce jour dans le but de faciliter l'interprétation et de limiter au maximum le risque de faux-positifs et faux-négatifs.

Les paramètres d'analyse et les filtres principaux associés avec les recommandations du Consortium sont les suivants :

- **Fréquence par rapport à la population de référence** : Il est nécessaire de masquer les anomalies non rares, c'est-à-dire présentes dans plus de 1% de la population. Cela est possible grâce à une base de données, incluse dans Bionano Access, issue d'analyses OGM réalisées dans une population de référence (sans pathologie identifiée). Un filtre (**% control database**) permet donc de masquer toutes les anomalies détectées par l'analyse bio-informatique dont la fréquence dans la population de référence est supérieure à un seuil choisi par l'analyseur. Pour l'analyse d'échantillons tumoraux en hématologie, un seuil entre 0 et 2% est recommandé (212).

- **Visualisation ou non des SV/CNV présents dans des régions mal couvertes** : l'alignement de certaines régions, dont font partie les centromères et télomères, sur le génome de référence est considéré peu fiable par le fournisseur, notamment à cause de la présence importante de séquences répétées. Les anomalies (SV et CNV) localisées, au moins partiellement, sur ces régions sont masquées par défaut selon les réglages du fournisseur par les filtres « SV masking filter » et « CNV masking filter ». En effet, le mauvais alignement de ces régions entraîne un fort risque de faux-positifs. Cependant, les recommandations récentes du Consortium sont de désactiver ces filtres pour limiter le risque de faux-négatifs.

- **Nombre de molécules minimum** : plus une anomalie sera identifiée avec un nombre de molécules important, plus elle sera fiable. Il est recommandé d'afficher les anomalies présentes sur au moins 5 molécules.

- **Critère de confiance** (appelée **confidence**) : une valeur de confiance, de 0 à 1, est attribuée par le pipeline à chaque anomalie identifiée. Plus cette valeur est proche de 1, plus la détection est fiable. Il est recommandé de laisser le filtre par défaut fixant une valeur minimum, variable entre les SV et CNV, pour la visualisation des anomalies. Les anomalies dont le critère de confiance est en dessous du seuil sont considérées comme des artefacts et donc non pertinentes.

Toutes les anomalies dont les paramètres sont situés en dehors des réglages fixés seront masquées : i) elles n'apparaîtront plus sur le Circos plot ; ii) les CNV ne seront pas mis en surbrillance ; iii) les aneuploïdies ne seront pas identifiées par une barre ; iv) les annotations ne seront pas visibles.

Un autre outil permet de faciliter l'interprétation en filtrant la visualisation des anomalies à celles présentes uniquement sur des régions d'intérêt. En effet, il est possible d'utiliser un fichier (au format « BED file ») répertoriant les régions chromosomiques d'intérêt clinique pour les pathologies étudiées selon les connaissances actuelles.

II.2.3. Avantages et limites

La technique OGM répond aux limites exposées précédemment des techniques cytogénétiques et moléculaires de routine grâce à ses nombreux avantages (211) :

- Evaluation de tous les SV et CNV d'intérêt sur l'ensemble du génome avec une résolution largement supérieure aux techniques conventionnelles et une très bonne sensibilité. Ses performances analytiques ont été validées par plusieurs équipes dans différents types de néoplasies hématologiques. De plus, la longueur des molécules d'ADN obtenues par OGM, allant jusqu'à 1Mb, permet une meilleure identification des SV et CNV par rapport aux techniques de séquençage « long-read » pour lesquelles la taille des fragments d'ADN est au maximum de 15kb (214).

- Analyse unique et relativement simple : réduction des coûts et du temps total d'analyse. L'OGM peut remplacer l'association, actuellement requise, des techniques conventionnelles pour l'étude des SV et CNV. Le coût supérieur de l'OGM par rapport aux techniques prises séparément est au final inférieur après leur association. De plus, le délai de réalisation est compatible avec la nécessité d'un rendu de résultat rapide. C'est une technique beaucoup plus abordable en routine en terme de coût et de simplicité de réalisation par rapport au WGS ou au RNAseq.

- Absence de biais de culture ou d'amplification, à l'inverse du caryotype ou du séquençage ciblé respectivement.

- Alignement sur le génome de référence avec localisation des gènes. Cela est intéressant pour la mise en évidence des réarrangements d'intérêt clinique impactant des gènes spécifiques et tout particulièrement lorsque ces gènes ont de nombreux partenaires possibles. Cela permet également l'identification de nouveaux partenaires.

- Définition plus précise de la complexité génomique. En effet, certaines hémopathies comme les LAL présentent très souvent un caryotype complexe sans qu'il soit possible d'identifier précisément les différentes anomalies avec les techniques de routine. Les anomalies supplémentaires identifiées grâce à l'OGM ajoutent également un niveau de complexité. De plus, l'OGM permet la mise en évidence des mécanismes à l'origine des réarrangements chromosomiques complexes comme les chromoanagenesis, incluant notamment les chromothripsis et chromoplexy, souvent associés à un mauvais pronostic.

La technique OGM présente cependant quelques limites et risques mais des solutions permettent de les restreindre (211) :

- Absence de détection des SNV : N'étant pas basé sur un principe de séquençage, l'OGM ne peut pas mettre en évidence les mutations. L'utilisation en parallèle d'une technique de séquençage est donc nécessaire en fonction de l'indication et des anomalies recherchées.

- Absence d'information sur l'architecture clonale : Bien que les VAF des anomalies donnent une indication de clonalité et sous-clonalité, l'OGM n'informe pas sur l'architecture clonale à l'inverse de techniques dites « single-œll » comme le caryotype et la FISH.

- Risque de résultats faux-positifs : L'annotation bio-informatique des anomalies entraînent la présence de multiples artefacts (faux-positifs). Cette limite est facilement corrigée par l'utilisation des filtres, une bonne prise en main de l'outil d'interprétation et la réalisation en parallèle d'un caryotype ou de quelques sondes de FISH pour confirmation.

- Risque de résultats faux-négatifs : Les performances de l'OGM sont limitées dans des cas bien particuliers : i) mauvaise définition de la ploïdie lorsque des aneuploïdies concernent la majorité des chromosomes, surtout avec le pipeline RVA ; ii) détection plus difficile des anomalies sous-clonales, présentes à faible VAF, par rapport au caryotype ou à la FISH grâce à la culture ; iii) détection très limitée des réarrangements dont les points de cassure sont

situés dans une région centromérique ou télomérique, particulièrement s'ils sont équilibrés (translocations Robertsoniennes et ring chromosomes) ; iv) absence de détection ou détection très limitée des anomalies présentes dans les régions très répétées (par exemple les réarrangements de DUX4) ou ayant un grand polymorphisme (par exemple les réarrangements impliquant le locus IGH ; v) détection limitée, avec le pipeline RVA, des anomalies situées dans des régions spécifiques comme la région PAR1 (pseudoautosomal region 1) ayant des séquences similaires entre les chromosomes X et Y. La réalisation d'un caryotype en parallèle de l'OGM et l'association des pipelines RVA et De Novo si nécessaire permettent de limiter ces risques.

En comparant les avantages et limites des différentes techniques d'exploration génétique disponibles (Tableau 6), l'OGM apparaît comme la technique répondant à la majorité des critères recherchés tout en restant assez facilement transposable à une utilisation en routine pour une majorité de laboratoires.

Tableau 6 : Avantages et limites des techniques d'exploration génétique disponibles, adapté de Akkari et al (210).

	Caryotype	FSH	CGH-array	RT-qPCR	Séquençage ciblé		WGS	WTS	OGM
Analyte	Chromosomes	ADN ou Chromosomes	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN	ARN	ADN
Biais	Culture	Culture	/	/	Amplification		/	/	/
Sensibilité	>1-3 mitoses/20	>2-4%	>10-20%	>0,01%	>1-5%	>5-10%	>20%	>1-10%	>5-10%
Couverture	Génome	Ciblée	Génome	Ciblée	Ciblée		Génome	Génome	Génome
Résolution	>10Mb	100-500kb	>50kb	<1kb	<0,5kb		Totale	Totale	>5-100kb
SV	Oui	Oui	Non	Transcrits	Non	Transcrits	Oui	Oui	Oui
CNV	Oui	Oui	Oui	Non	Limité	Limité	Oui	Limité	Oui
SNV	Non	Non	Non	Non	Oui	Oui	Oui	Oui	Non
"Single-cell"	Oui	Oui	Non	Non	Non		Non	Non	Non
"Routine"	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui	Oui (limité)	Non	Non	En cours
Délai	<5 jours	<2 jours	<5 jours	<5 jours	7-14 jours	7-14 jours	7-14 jours	14-21 jours	5-7 jours
Coût	+	++	++	+	+++	+++	+++++	++++	+++

II.2.4. Apport dans les LAL

L'exploration génétique des hémopathies s'est révélée être une des applications les plus intéressantes pour l'OGM et cela a été confirmé par plusieurs études, réalisées au cours des dernières années, qui ont, d'une part, validé les performances analytiques de la technique et, d'autre part, montré sa supériorité dans la détection de nombreuses anomalies en comparant les résultats à ceux obtenus par les techniques conventionnelles. Ces études ont conclu à un impact positif pour la classification, la stratification pronostique et la prise en charge thérapeutique des patients. La majorité ont été réalisées pour des LAM/SMD (syndrome myélodysplasique) ou LAL mais quelques-unes concernent d'autres pathologies (lymphomes B, myélome multiple ...) (211).

Cette technique est particulièrement intéressante pour les LAL caractérisées par un taux élevé d'altérations génétiques hétérogènes et majoritairement visibles au niveau chromosomique. De plus, le nombre de nouvelles anomalies récurrentes et d'intérêt clinique est en constante augmentation du fait des techniques hautement résolutive utilisées en recherche. Leur identification, primordiale pour la prise en charge des patients, en routine avec les techniques conventionnelles devient donc de plus en plus complexe, coûteuse et longue mais également parfois impossible par manque de résolution.

Toutes les études sur les LAL ont pu conclure à une concordance, entre l'OGM et les techniques conventionnelles, d'au moins 90% toutes anomalies confondues et proche de 100% en ne prenant en compte que les anomalies pronostiques (211). L'utilisation du pipeline De Novo, en plus du RVA recommandé pour l'hématologie, a permis de détecter certaines anomalies pronostiques qui avaient été manquées, notamment les réarrangements de CRLF2 (région PAR1). Il est donc maintenant recommandé de réaliser directement les deux pipelines pour les LAL (212). Un des points positifs majeurs ressortant de ces études est la modification de la stratification pronostique de plusieurs patients après mise en évidence d'anomalies non détectées par les techniques classiques ou bien après identification d'altérations ou de partenaires non décrits.

Au cours des dernières années, plusieurs laboratoires au niveau international ont alors mis en place la technique OGM en routine pour l'étude génétique des hémopathies et tout particulièrement les LAL où l'OGM était réalisé en première ligne, en association avec le caryotype le plus souvent. C'est également le cas en France avec, à ce jour, au moins 14 laboratoires d'hématologie déjà équipés ou en cours d'équipement. Le GFCH (Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique) a même créé un consortium spécifique, FROGG (French speaking OGM Group from GFCH), afin de faciliter, d'encadrer et d'harmoniser l'implantation de l'OGM dans les laboratoires d'hématologie. De plus, un chapitre spécifique de l'ISCN (International System for Human Cytogenomic Nomenclature) sur la nomenclature cytogénétique à appliquer pour l'OGM est paru en 2023 (215).

Pour conclure cette deuxième partie, bien que les techniques cytogénétiques et moléculaires conventionnelles soient encore le « gold standard » pour l'étude génétique des LAL, elles ne suffisent plus aujourd'hui à la stratification pronostique et à une prise en charge thérapeutique optimale en accord avec les nouvelles classifications. Dans ce contexte, la technique OGM est suggérée, par de nombreuses équipes internationales et françaises, comme étant une alternative de choix pour la majorité des laboratoires.

III. Objectifs

L'intérêt de la technique Optical Genome Mapping dans l'étude génétique des néoplasies hématologiques a déjà été démontré par plusieurs études mais, pour la plupart, dans un cadre de recherche. Ses performances en terme de sensibilité et de résolution dans la détection de tous les types d'altérations chromosomiques (SV et CNV) ont donc récemment fait émerger l'hypothèse d'un rôle majeur de cette technique en pratique pour compléter voire remplacer les techniques conventionnelles. En effet, en plus de ses performances, l'OGM est une technique à haute résolution avec un coût limité et une mise en place plus aisée par rapport aux autres techniques hautement résolutive de type NGS.

Les LAL sont caractérisées par un nombre très important d'altérations chromosomiques ayant un impact dans la stratification pronostique et la prise en charge thérapeutique des patients. De plus, l'hétérogénéité de ces anomalies nécessite l'association de plusieurs techniques conventionnelles pour les détecter et la résolution de ces dernières est parfois insuffisante.

Devant cette problématique, l'utilisation de techniques à haute résolution semble indispensable mais leur mise en place est complexe et souvent compliquée pour les laboratoires d'hématologie notamment en routine. Les LAL ont donc rapidement été identifiées comme l'indication dans laquelle l'OGM peut avoir l'apport le plus important par rapport aux techniques conventionnelles utilisées dans les laboratoires.

Dans une perspective d'implantation de la technique OGM au sein du laboratoire d'hématologie biologique du CHU de Limoges, nous avons mis en place cette étude afin de confirmer l'apport de l'OGM dans la prise en charge génétique des LAL mais également la faisabilité de sa mise en place au sein de notre laboratoire. Les objectifs de cette étude sont les suivants :

- **Mettre au point un stockage des prélèvements** permettant l'obtention d'un ADN de qualité et compatible avec les pratiques déjà en place dans le laboratoire. En effet, la qualité de l'ADN obtenu après extraction est le point le plus limitant de la technique.
- **Mettre au point une méthode d'interprétation fiable et reproductible**. L'interprétation des données brutes fournies par l'OGM ne nécessitent pas de compétences en bio-informatique particulières. Elle dépend, en revanche, de l'utilisation de nombreux filtres nécessitant d'être adaptés et d'outils de visualisation nécessitant un cours apprentissage.
- **Confirmer les performances de l'OGM par rapport aux techniques conventionnelles** dans un cadre de pratique en routine.
- **Confirmer et/ou identifier les limites de l'OGM et proposer des solutions**.
- **Proposer une première version d'un compte rendu** pour les résultats OGM.
- En fonction des objectifs précédents, **proposer un bilan génétique** intégrant l'OGM dans la prise en charge génétique des LAL au sein de notre laboratoire.

IV. Matériels & Méthodes

IV.1. Sélection des patients et des échantillons

L'inclusion des patients s'est déroulée prospectivement de décembre 2022 à août 2024 sur les prélèvements reçus au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges. Les critères d'inclusions étaient les suivants : i) diagnostic, suivi ou rechute d'une LAL confirmée par la cytologie et l'immunophénotypage ; ii) prélèvement médullaire ou sanguin infiltré (c'est-à-dire avec au moins 10% de blastes) iii) reliquat de prélèvement disponible et en quantité suffisante (>650 µl ou >1.5 millions de cellules). Une exception concerne un patient inclus rétrospectivement après analyse des résultats OGM ayant permis son reclassement en LAL.

IV.2. Stockage et conservation des échantillons

En fonction de la quantité de prélèvement disponible, 1 ou 2 aliquots ont été réalisés. Le protocole de stockage était adapté au type de prélèvement selon les recommandations du fournisseur :

- Prélèvement sanguin avec EDTA : aliquot de 650 à 1ml. L'EDTA permettant de conserver l'ADN, aucun réactif additionnel n'était ajouté.
- Prélèvement sanguin ou médullaire avec héparinate de lithium : aliquot de 650 à 1ml avec ajout de 15µl d'un conservateur de l'ADN (DNA Stabilizer, Bionano Genomics).
- Prélèvement médullaire avec milieu de culture (Chromosome medium M, Euroclone) : aliquot de 1,5 millions de cellules sous la forme d'un culot cellulaire après lavage par 40µl de DNA Stabilizing Buffer puis centrifugation (2200g, 2 min, température (T°) ambiante) et enlèvement du surnageant. La solution de lavage (DNA Stabilizing Buffer) est composée de 49µl de Cell Buffer (Bionano Genomics) et de 1µl de DNA Stabilizer.

Après anonymisation, les aliquots ont été conservés à -80°C, comme recommandé.

IV.3. Optical Genome Mapping

IV.3.1. Technique

La partie technique, allant de l'extraction d'ADN à l'annotation bio-informatique, a été réalisée par les équipes des laboratoires du fournisseur, d'abord sur la plateforme Gentyane à Clermont-Ferrand en 2023 puis au Data Services Lab de San Diego (United States) en 2024.

Le transport des échantillons a été réalisé selon les recommandations du fournisseur et notamment avec de la carboglace pour leur conservation à -80°C.

L'extraction de l'ADN UHMW a été réalisée selon les recommandations du fournisseur. Les étapes principales sont les suivantes : décongélation des aliquots dans un bain-marie à 37°C, lavage au PBS pour les culots cellulaires, traitement à la protéinase K et un tampon de lyse (15 minutes à T° ambiante) pour libérer l'ADN génomique (ADNg), inactivation à 55°C pendant 10 minutes de la protéinase K, précipitation avec alcool puis liaison de l'ADNg à un disque de silice paramagnétique, lavage et élution de l'ADN UHMW dans un tampon approprié, homogénéisation de l'ADN par un agitateur rotatif (1h à 5rpm) puis incubation toute la nuit à T° ambiante, quantification de l'ADN le jour suivant avec une concentration cible de 39 à 150 ng/µl. Les références des protocoles utilisés en fonction du type d'aliquot sont les suivantes : sang EDTA (Bionano Prep SP Frozen Human Blood DNA Isolation Protocol v2-30395, Rev

B) ; moelle dans héparinate de lithium (Bionano Prep SP BM aspirate DNA Isolation Protocol v2-30399, Rev B) ; moelle sous la forme d'un culot cellulaire (Bionano Prep SP Frozen Cell Pellet DNA Isolation Protocol v2-30398, Rev B).

Le marquage de l'ADN obtenu a été réalisé selon le protocole du fournisseur (Bionano Prep Direct Label and Stain (DLS) Protocol-30206, Rev G). Les étapes principales sont les suivantes : marquage direct spécifique de 750 ng d'ADNg par l'enzyme DLE-1 qui fixe des fluorochromes verts sur une séquence spécifique de 6 nucléotides (CTTAAG) présente environ 15 fois pour 100kb sur le génome, lavage pour retirer l'excès de fluorochromes et d'enzyme, contre marquage de l'ADNg pendant toute la nuit, quantification avec une concentration cible de 4 à 12 ng/ μ l.

L'acquisition des données brutes (molécules) a été réalisée, après chargement de l'ADNg marqué sur une puce (chip G2, Bionano Genomics), sur l'instrument du fournisseur (Saphyr, Bionano Genomics) avec pour objectif d'obtenir environ 1500 Gb d'ADN permettant une couverture de 400X et une sensibilité théorique de 5% de VAF. A la suite de l'acquisition, le rapport des contrôles qualitatifs relatifs aux molécules (MQR, Molecule Quality Report) a été créé. Les paramètres suivants ont été pris en compte pour attester de la qualité des données selon les cibles recommandées par le fournisseur (Molecule Quality Report Guidelines, CG-30223) (Annexe 3) : longueur moyenne des molécules ($N50 \geq 150$ kb), profondeur (effective coverage) et couverture (map rate).

L'annotation bio-informatique a été réalisée en utilisant le logiciel du fournisseur (Bionano Solve, version 3.7 puis 3.8) avec le pipeline RVA pour tous les échantillons. De plus, le pipeline De Novo a été ajouté pour : i) toutes les LAL-B à l'exception de LIM30 et LIM42 (car moins de 40% de blastés et donc des VAF théoriques inférieures à la sensibilité de 20%) ainsi que LIM45 (car modification du diagnostic suite à l'analyse OGM) ; ii) pour une LAL-T (LIM95, car hypothèse de modification du niveau de ploïdie au caryotype). Le génome de référence utilisé a d'abord été le GRCh37/hg19 (échantillons LIM8 à LIM37) puis GRCh38/hg38 (échantillons LIM42 à LIM143).

IV.3.2. Interprétation et rendu des résultats

Pour tous les échantillons analysés, l'interprétation et le rendu des résultats ont été effectués conjointement par Maxime ROUBINET et le Dr. Nathalie GACHARD.

La visualisation des altérations annotées a été réalisée sur le logiciel du fournisseur (Bionano Access, version 1.7 puis 1.8). Les altérations (SV et CNV) ont été identifiées par le pipeline par comparaison de chaque échantillon avec la référence en leur appliquant une valeur de confiance allant de 0 à 1. Pour l'interprétation des résultats, les filtres recommandés par le fournisseur ont été appliqués initialement, à l'exception de celui permettant de retirer les anomalies présentes également dans la population contrôle avec un réglage à 0% afin de ne visualiser que les anomalies rares (Tableau 7). Des modifications de certains filtres au cours de l'étude seront expliquées dans la partie résultats.

Tableau 7 : Comparaison des filtres recommandés par le fournisseur par rapport à ceux utilisés.

Rouge = réglage différent de celui recommandé par le fournisseur

Fitres	Recommandation fournisseur	Réglages choisis initialement
SV Confidence		
Insertion	0	0
Deletion	0	0
Inversion	0,02	0,02
Duplication	0	0
Intra-fusion	0,02	0,02
Inter-translocation	0,02	0,02
SV filters		
SV masking filter	Non-Masked only	Non-Masked only
VAF filter	0 à 1	0 à 1
Variant Annotation Filters		
% control database	100	0
Self molecule count	5	5
Copy Number Variant Filters		
Confidence	0,99	0,99
Size	500 kb	500 kb
CNV masking filter	Non-Masked only	Non-Masked only
Aneuploidy filters		
Confidence	0,95	0,95

Toutes les anomalies identifiées avec les filtres utilisés ont été répertoriées dans un tableau Excel avec les données nécessaires à l'interprétation pour chaque échantillon analysé. Les anomalies ont été classées comme vrais ou faux-positifs en se basant sur la confiance, le nombre de molécules, la VAF et la visualisation de l'alignement sur le génome de référence. De façon générale, les anomalies sont considérées comme vraies si elles ont une confiance élevée, sont supportées par plus de 10 molécules et ont une VAF d'au moins 5%. La vérification manuelle de toutes les translocations et inversions a été effectuée. Pour les anomalies semblant réelles mais dont les critères précédents ne sont pas respectés, elles ont été confirmées par une autre technique déjà réalisée (caryotype, FISH, MLPA) ou réalisée à posteriori (FISH).

Après interprétation, les règles suivantes ont été utilisées pour le rendu des anomalies pertinentes dans l'indication :

- Translocations réciproques (équilibrées) avec les deux dérivés identifiables impliquant ou non des gènes d'intérêt. Les translocations considérées comme cryptique au caryotype sont également rendues.
- Translocations déséquilibrées et isochromosomes.
- Inversions uniquement si non cryptiques au caryotype à l'exception de celles impliquant des gènes d'intérêt.
- Autres SV (délétions, duplications et insertions) de petite taille (<500 kb) uniquement s'ils impliquent des gènes d'intérêt.

- CNV uniquement à partir de 5Mb, selon les recommandations utilisées pour la CGH-array (216), sauf s'ils impliquent des gènes d'intérêt ou s'il font partis d'un CNV plus important ou d'un évènement plus complexe (translocation déséquilibrée ou chromothripsis par exemple).

Pour la visualisation des gènes d'intérêts dans l'indication, deux fichiers au format « bed » mis à disposition du GFCH, dont le laboratoire est membre, par le fournisseur ont été utilisés. L'un avec les gènes principaux rapportés dans les classifications OMS/ICC ou dans la littérature pour les LAL et un autre avec la majorité des gènes d'intérêt de façon plus générale dans les cancers hématologiques ou solides. Une revue de la bibliographie a été effectuée pour vérifier l'impact d'une anomalie dans le second cas.

Les anomalies pertinentes ont ensuite été écrites sous la forme d'une formule adaptée de la nomenclature de cytogénétique selon l'ISCN 2020. Une formule adaptée à l'OGM a ensuite été ajoutée suite à la parution du chapitre spécifique de l'ISCN en décembre 2023 (215).

Le résultat final pour chaque échantillon a été rendu sous la forme d'un tableau Excel avec les éléments suivants : informations relatives au prélèvement, CQ importants, résultats obtenus par les techniques conventionnelles et additionnelles, circos plot final avec les anomalies pertinentes, formule adaptée du caryotype, anomalies primaires et secondaires, modification éventuelle du pronostic.

IV.4. Comparaison des résultats

IV.4.1. Techniques conventionnelles

Les résultats obtenus avec l'OGM ont été comparés pour chaque échantillon à ceux obtenus par les techniques conventionnelles (caryotype, FISH et RT-MLPA ou RT-qPCR) utilisées dans le cadre de la routine et réalisées au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges selon les procédures standards :

- Le caryotype était réalisé dans tous les cas, hors échec d'aspiration de moelle osseuse. 20 mitoses étaient analysées lorsque le nombre de mitoses obtenues était suffisant.

- Les sondes FISH réalisées dépendaient de l'informativité des résultats du caryotype, selon les recommandations du GFCH (105,161). La détection d'une anomalie récurrente au caryotype était confirmée en FISH. En l'absence d'anomalie récurrente au caryotype, les sondes FISH suivantes étaient utilisées :

- LAL-B : *BCR/ABL1*, *KMT2A*, *TCF3/PBX1/HLF*, *ETV6/RUNX1*, *ABL2*, *PDGFRB*, *CRLF2*, *IGH* et optionnellement *JAK2*, *MYC*, *BCL2* et *BCL6*
- LAL-T : *BCR/ABL1*, *KMT2A*, *TLX1*, *TLX3*, *PICALM/MLLT10*.

- La RT-MLPA était réalisée dans tous les cas au diagnostic ou en rechute (à l'exception des rechutes de LAL-B Ph+ pour lesquelles la RT-qPCR est réalisée) pour la recherche des réarrangements les plus fréquents :

- LAL-B : *ETV6::RUNX1*, *TCF3::PBX1*, *KMT2A::AFF1*, *KMT2A::MLLT3*, *KMT2A::MLLT1*, *BCR::ABL1*, *CRLF2::P2RY8*.
- LAL-T : *STIL::TAL1*, *BCR::ABL1*, *PICALM::MLLT10*, *ABL1::EML1*, *ABL1::ETV6*, *SET::NUP214*, *KMT2A::MLLT1* et *KMT2A::MLLT4*.

- La RT-qPCR était réalisée dans tous les cas où un réarrangement *BCR::ABL1* avait été identifié par une autre technique.

IV.4.2. Techniques complémentaires

Les résultats obtenus avec l'OGM ont également été comparés à ceux obtenus par des techniques complémentaires réalisées, pour la plupart des patients, dans le cadre de protocole par des laboratoires de référence pour les LAL-B (CHU de Toulouse, hôpital Robert Debré à Paris et hôpital Saint-Louis à Paris) et LAL-T (hôpital Necker à Paris). Les analyses varient en fonction de l'indication (LAL-B ou T) et des protocoles dans lesquels sont inclus les patients.

Les analyses complémentaires possibles pour les LAL-B sont les suivantes :

- MLPA pour recherche des délétions/duplications récurrentes (*IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1* et région PAR1)
- PCR multiplex pour recherche des délétions intragéniques de *IKZF1* et *ERG*
- PCR quantitative pour recherche de surexpression de *CRLF2* et *EPOR*
- RT-MLPA pour recherche des réarrangements récurrents
- RNAseq pour recherche des réarrangements plus rares et identification du profil d'expression
- NGS pour recherche de mutations ponctuelles récurrentes

Les analyses complémentaires possibles pour les LAL-T sont les suivantes :

- MLPA pour recherche de délétions/duplications récurrentes (*STIL::TAL1*, *LEF1*, *CASP8AP2*, *MYB*, *EZH2*, *MLLT3*, *MTAP*, *CDKN2A/B*, *NUP214::ABL1*, *PTEN*, *LMO1*, *LMO2*, *NF1*, *SUZ12*, *PTPN2* et *PHF6*)
- NGS pour recherche de mutations ponctuelles récurrentes

IV.4.3. Critères de comparaison

Plusieurs critères ont été utilisés pour comparer les résultats obtenus par la technique OGM par rapport principalement aux techniques de cytogénétique (Caryotype et FISH) mais également aux autres techniques dans certains cas.

La faisabilité des techniques conventionnelles (caryotype, FISH, RT-MLPA et RT-qPCR) a été évaluée par le taux d'échec pour chacune de ces techniques. Une technique était en échec lorsqu'elle ne permettait pas d'obtenir de résultat, qu'il soit informatif (clonal) ou non.

La sensibilité spécifique de la technique OGM pour la détection des anomalies récurrentes et pronostiques a été évaluée par comparaison de ses résultats à ceux des techniques conventionnelles et/ou complémentaires :

- Sensibilité pour la détection des anomalies primaires des LAL-B et LAL-T : comparaison des résultats OGM aux résultats de toutes les autres techniques réalisées.
- Sensibilité pour la détection des délétions secondaires pronostiques des LAL-B : comparaison des résultats OGM à ceux de la MLPA (délétions *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1*, *EBF1* et *PAR1*) et de la PCR multiplex (délétions intragéniques d'*IKZF1* et *ERG*) lorsque ces techniques étaient réalisées.

La sensibilité générale de la technique OGM a été évaluée par sa capacité à détecter des anomalies clonales en comparaison aux techniques de cytogénétique (caryotype et FISH). Deux paramètres ont été comparés :

- Le pourcentage d'échantillons clonaux, c'est-à-dire pour lesquels au moins une anomalie clonale a été détectée.

- Le pourcentage de clonalité moyen sur l'ensemble des échantillons. La définition du pourcentage de clonalité pour chaque technique était la suivante : i) caryotype : nombre de mitoses clonales par rapport au nombre de mitoses totales analysées ; ii) FISH : nombre de noyaux anormaux par rapport au nombre de noyaux totaux analysés ; iii) OGM : double de la VAF pour les anomalies mono-alléliques et VAF pour les anomalies bi-alléliques.

La concordance a été évaluée par le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a détecté toutes les anomalies (dans la limite de ses performances) identifiées par au moins une des techniques conventionnelles et complémentaires. Les résultats étaient alors considérés comme concordants. Des résultats initialement considérés comme discordants ont finalement pu être considérés concordants après relecture du caryotype et réalisation de FISH complémentaires.

La résolution de l'OGM a été évaluée par :

- La taille minimale des anomalies d'intérêts détectées.
- Le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a permis de préciser les résultats de cytogénétique (caryotype et/ou FISH).
- Le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a permis de détecter au moins une anomalie non cryptique et non identifiée au caryotype ou en FISH.
- Le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a permis la détection d'une anomalie cryptique correspondant à l'altération primaire et non identifiée en FISH.
- Le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a permis la détection d'au moins une anomalie cryptique secondaire récurrente non identifiée par les autres techniques.
- Le pourcentage d'échantillons pour lesquels l'OGM a permis de modifier le niveau de complexité génomique par rapport à celui considéré par les résultats de cytogénétique. Le décompte des anomalies a été réalisé selon les recommandations de l'ISCN pour la cytogénétique. Pour l'OGM, les mêmes recommandations étaient appliquées avec en plus le décompte des CNV d'une taille supérieure à 5Mb et des translocations/inversions considérées comme cryptiques au caryotype.

V. Résultats

Les figures illustrant les résultats obtenus par OGM proviennent des interfaces Circos plot, Whole genome et Genome browser. Pour faciliter la visualisation, des extraits seront utilisées dans la plupart des cas. De même pour le caryotype où seuls les chromosomes d'intérêt seront exposés dans la plupart des cas.

V.1. Caractéristiques des échantillons et patients

Un total de **34 échantillons**, 28 LAL-B et 6 LAL-T, a été analysé par OGM (Tableau 8). Ils correspondaient à un prélèvement au diagnostic (62%) pour la majorité mais également au suivi (6%) ou à la rechute (32%). Ils représentent **32 patients différents** (26 LAL-B et 6 LAL-T) puisque deux échantillons correspondaient à des prélèvements de stade différent pour deux patients (LIM14/LIM30 et LIM37/LIM93). La répartition des patients était homogène en terme de sexe avec 53% de sexe masculin et 47% féminin. L'âge moyen des patients à l'inclusion était de 40 ans et il était légèrement plus élevé pour les patients avec LAL-T (46 ans) par rapport aux LAL-B (38 ans). En ne prenant en compte que les patients au diagnostic, l'âge moyen était de 30 ans (29 ans et 37 ans respectivement pour les LAL-B et LAL-T). Les pourcentages d'infiltration du tableau 8 correspondent à ceux des échantillons utilisés pour l'OGM. La matrice (moelle ou sang) était identique pour les analyses cytogénétiques et l'analyse OGM à l'exception de deux cas : i) LIM42 pour lequel la moelle était inaspirable. S'agissant d'une rechute d'une LAL-B Ph+, la RT-qPCR recherchant le transcrit BCR::ABL1 a été réalisée sur le sang et ni le caryotype ni la FISH n'ont été réalisés ; ii) LIM87 pour lequel le reliquat de moelle (90% de blastes) était insuffisant pour l'analyse OGM qui a alors été réalisée sur le sang (70% de blastes). Pour LIM57, la moelle était inaspirable mais, s'agissant d'un diagnostic, les analyses cytogénétiques ont également été réalisées sur le sang. Malgré l'infiltration à 35%, la cytogénétique sur sang n'a pas été informative.

V.1.1. Caractéristiques des LAL-B

Le pourcentage d'infiltration blastique de l'échantillon utilisé pour l'analyse OGM était supérieur à 40% pour la majorité (22 sur 28) et en moyenne de 79%. Les trois échantillons de moelle avec infiltration plus faible (LIM30, 37 et 93) correspondaient à un suivi ou une rechute. Deux échantillons de sang avec une infiltration plus faible correspondaient à un diagnostic (LIM57, 35%) et une rechute (LIM42, 10%). Enfin, l'infiltration blastique pour LIM45 n'avait pas été déterminée puisque les cellules tumorales n'étaient initialement pas considérées comme des blastes. Cependant, 400 G/L de leucocytes étaient retrouvés sur l'échantillon, attestant probablement d'une très forte infiltration blastique.

Les LAL-B étaient très majoritairement de phénotype Bll (85%).

Onze anomalies primaires différentes ont été identifiées. Les plus fréquentes étaient les suivantes : hyperdiploïdie (27%), BCR::ABL1 (23%), *CEBP-r* (8%), hypodiploïdie (8%). Les autres, identifiées pour un seul patient (4%), sont : *ETV6::RUNX1*, *ETV6::RUNX1-like*, *TCF3::PBX1*, *MYC-r*, *ZNF384-r*, *KMT2A-r* et *DUX4-r*. Les deux dernières ont pu être identifiées grâce aux résultats de l'OGM. L'anomalie primaire n'a pas été identifiée pour deux patients (8%).

Le pronostic des patients, associé à l'anomalie primaire, était le plus souvent favorable (38%) ou défavorable (38%). En divisant les patients en fonction de l'âge avec un groupe pédiatrique/jeune adulte (14 patients de 0 à 25 ans) et un groupe adulte (12 patients >25 ans),

la répartition des anomalies primaires et du pronostic correspond aux données de la littérature. En effet, le groupe pédiatrique/jeune adulte a des anomalies de pronostic favorable (hyperdiploïdie, *ETV6::RUNX1*, *ETV6::RUNX1-like* et *DUX4-r*) dans 71% des cas, intermédiaire (*CEBP-r* et *TCF3::PBX1*) dans 21% des cas et défavorable (hypodiploïdie) seulement dans 7% des cas. A l'inverse, aucune anomalie de pronostic favorable n'a été identifiée dans le groupe adulte composé de 75% de pronostic défavorable (*BCR::ABL1*, *MYC-r*, *KMT2A-r*, hypodiploïdie) et 25% de pronostic intermédiaire (*ZNF384-r* et indéterminé).

Les prélèvements à la rechute correspondaient majoritairement à des patients du groupe adulte (70%) et le plus souvent de pronostic défavorable (50%).

Tableau 8 : Caractéristiques des échantillons et des patients.

ID = identification du prélèvement, H = homme, F = femme, ND = Non déterminé, * = information obtenue par l'analyse des résultats OGM.

ID	Sexe	Age	Matrice	Stade	Blastes (%)	Phénotype	Classification	Pronostic
LAL-B								
LIM8	H	11	Moelle	Diagnostic	96	BII (commune)	B-other : <i>CEBP-r</i>	Intermédiaire
LIM9	H	11	Moelle	Diagnostic	97	BII (commune)	<i>ETV6::RUNX1</i>	Favorable
LIM14	H	67	Moelle	Diagnostic	94	BII (commune)	Hypodiploïdie (LH)	Défavorable
LIM17	H	66	Moelle	Rechute	99	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM25	F	48	Moelle	Diagnostic	66	BII (commune)	B-other : <i>MYC-r</i>	Défavorable
LIM30	H	68	Moelle	Suivi	23	BII (commune)	Hypodiploïdie (LH)	Défavorable
LIM32	F	8	Moelle	Rechute	65	BII (commune)	<i>ETV6::RUNX1-like</i>	Favorable
LIM34	H	4	Moelle	Diagnostic	94	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM35	H	22	Moelle	Rechute	88	BII (commune)	B-other : <i>CEBP-r</i>	Intermédiaire
LIM37	F	73	Moelle	Rechute	23	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM42	F	64	Sang	Rechute	10	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM45	H	79	Sang	Rechute	ND	Non connu	<i>KMT2A-r*</i>	Défavorable*
LIM46	F	20	Moelle	Rechute	95	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM57	F	70	Sang	Diagnostic	35	BIV (mature)	Indéterminé	Intermédiaire
LIM68	F	71	Moelle	Rechute	88	BII (commune)	Indéterminé	Intermédiaire
LIM69	H	14	Moelle	Diagnostic	71	BII (commune)	Hypo/Paratriploïdie	Défavorable
LIM70	F	6	Moelle	Diagnostic	89	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM74	H	7	Moelle	Diagnostic	44	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM87	F	78	Sang	Diagnostic	70	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM91	H	80	Moelle	Diagnostic	92	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM92	F	10	Moelle	Diagnostic	97	BIII (pré-B)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM93	F	73	Moelle	Rechute	20	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM102	H	2	Moelle	Diagnostic	96	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM104	F	41	Moelle	Rechute	86	BII (commune)	B-other : <i>ZNF384-r</i>	Intermédiaire
LIM107	H	63	Moelle	Diagnostic	94	BII (commune)	<i>BCR::ABL1</i>	Défavorable
LIM116	F	6	Moelle	Diagnostic	95	BII (commune)	B-other : <i>DUX4-r*</i>	Favorable*
LIM139	F	3	Moelle	Diagnostic	92	BII (commune)	Hyperdiploïdie	Favorable
LIM143	H	10	Moelle	Diagnostic	97	BIII (pré-B)	<i>TCF3::PBX1</i>	Intermédiaire
LAL-T								
LIM21	F	55	Moelle	Diagnostic	59	TIII (corticale)	<i>TLX1</i>	Favorable
LIM26	H	74	Moelle	Suivi	40	ETP	<i>HOXA</i>	Défavorable
LIM54	F	8	Moelle	Diagnostic	94	TIII (corticale)	<i>TLX3</i>	Favorable
LIM95	H	54	Moelle	Rechute	81	near-ETP	Indéterminé	Indéterminé
LIM101	H	50	Moelle	Diagnostic	90	TII (pré-T)	<i>TLX1</i>	Favorable
LIM113	H	34	Moelle	Diagnostic	77	TIV (mature)	<i>HOXA</i>	Indéterminé

V.1.2. Caractéristiques des LAL-T

Le pourcentage d'infiltration blastique de l'échantillon utilisé pour l'analyse OGM était supérieur ou égal à 40% pour tous et en moyenne de 73,5%.

Le phénotype des LAL-T était variable avec une ETP, une near-ETP, une TII (pré-T), deux TIII (corticale) et une TIV (mature).

L'entité génétique était identifiée pour 5 patients sur 6 : *TLX1-r* (33%), surexpression *HOXA* (33%), *TLX3-r* (17%).

V.2. Stockage et qualité des prélèvements

Les échantillons destinés à la technique OGM (n=34) étaient majoritairement d'origine médullaire (n=30, 88%), issus principalement du milieu de culture de cytogénétique et aliquotés sous la forme de culots cellulaires (n=27, 90%) mais également prélevés en héparinate de sodium pour certains (n=3, 10%). En l'absence de moelle disponible, des prélèvements sanguins (n=4, 12%), infiltrés par des blastes, en EDTA (50%) ou en héparinate de lithium (50%), ont également été utilisés.

Deux aliquots ont pu être stockés pour la majorité des échantillons (88%) et l'utilisation d'un seul de ces aliquots a été nécessaire à l'obtention d'une bonne qualité d'ADN. Les quatre échantillons avec un seul aliquot stocké (LIM30, 93, 101 et 104) étaient tous des prélèvements médullaires en milieu de culture et pour lesquels la quantité requise de 1,5 millions de cellules n'a pas été atteinte (entre 1 et 1,5 millions) à cause d'une faible richesse du prélèvement initial. Sur ces quatre aliquots, deux (LIM30 et 104) ont quand même permis l'obtention d'une qualité d'ADN suffisante à la poursuite de la technique.

Au total, **l'extraction et le marquage de l'ADN ont donc été un succès pour 32 échantillons sur 34 (94%)**. Aucune différence particulière n'a été mise en évidence en fonction du type de prélèvement ou de stockage ce qui a permis de valider tous les protocoles mis en place. En revanche, **la richesse du prélèvement initial et le seuil de 1,5 millions de cellules se sont révélés être critiques**. Une quantité inférieure de cellules peut permettre d'obtenir des résultats dans certains cas mais il y a un risque d'échec.

Nous avons ensuite réfléchi au protocole le plus adapté pour la mise en place d'un stockage systématique d'aliquots en routine. Les analyses conventionnelles cytogénétiques (caryotype et FISH) et moléculaires sont respectivement réalisées sur un prélèvement médullaire en milieu de culture ou en EDTA. Après évaluation des deux options, le **stockage à partir du prélèvement en milieu de culture** s'est révélé être le plus adapté et le plus facilement intégrable aux pratiques déjà en place. Après formation des techniciennes du secteur de cytogénétique, elles ont réalisé le stockage systématique des prélèvements de LAL à partir de Novembre 2023 (soit à partir de LIM93), dès que la quantité et la richesse le permettaient.

V.3. Qualité des données brutes obtenues

Les valeurs des contrôles qualités importants obtenues pour tous les échantillons analysés sont disponibles dans l'Annexe 4.

Concernant les contrôles qualités relatifs aux molécules, les 32 échantillons analysés ont obtenu en moyenne :

- une **profondeur** (effective coverage) de **437X**. Un seul échantillon (LIM87) était en dessous de la cible ($\geq 340X$) et en dessous du seuil de tolérance (300X) avec une profondeur de 229X
- une **couverture** (map rate) de **87%** et tous les échantillons étaient au-dessus de la cible ($\geq 70\%$).
- une **longueur médiane des molécules** ($N_{50} \geq 150\text{kb}$) de **284.5kb**. Un seul échantillon (LIM104) était en dessous de la cible ($\geq 230\text{kb}$) mais au-dessus du seuil de tolérance (200kb) avec une N_{50} de 205kb.
- une **répartition des labels** (label density / 100kb) de **15.4 labels/100kb**. 6 échantillons (LIM34, 92, 95, 102, 104 et 113) étaient hors de la cible (14-17) mais dans le seuil de tolérance (13-14 et 17-18).

La présence de valeurs comprises dans le seuil de tolérance n'a pas montré d'impact sur les performances de l'analyse. La présence d'une profondeur inférieure au seuil de tolérance pour LIM87 réduit la sensibilité de la technique et donc la VAF minimum à laquelle les anomalies seront détectées. Cependant, au vu de l'infiltration du prélèvement (70% de blastes), cela n'a pas eu d'impact avec la détection de toutes les anomalies clonales à une VAF de 35%. Une information précisant la diminution de la sensibilité a tout de même été incluse sur le compte-rendu comme recommandé par *Levy et al* (212).

Concernant les autres contrôles qualités :

- La profondeur après analyse bio-informatique par le pipeline était en moyenne de 394X. LIM87 était toujours le seuil échantillon en dessous de la cible ($\geq 300X$) avec une profondeur de 226X.
- Les moyennes des paramètres estimant le bruit de fond pour les CNV étaient toutes dans les cibles (voir Annexe 4). L'interprétation des CNV pour les 7 échantillons (LIM35, 37, 46, 69, 92, 95 et 104) avec des valeurs en dessous des cibles a été faite avec encore plus de précautions et notamment par rapport aux valeurs de « confiance ». Un impact potentiel a uniquement été identifié pour LIM104 avec une délétion, non cryptique au caryotype, non identifiée par l'OGM. Cependant, cette délétion était sous-clonale (retrouvée dans seulement 2 mitoses au caryotype) et donc probablement en dessous du seuil de sensibilité de la technique.

V.4. Interprétation et réglage des filtres

Le risque avec un nouvel outil utilisant de la bio-informatique est de visualiser des anomalies qui sont en réalité des faux-positifs. L'apprentissage de cet outil consiste en particulier à savoir détecter les faux positifs et à définir des filtres permettant de les mettre de côté sans nuire à la détection des vraies altérations parfois sous-clonales.

Avec l'aide des filtres et des annotations bio-informatiques (particulièrement la confiance, le nombre de molécules et la VAF), l'interprétation des anomalies de structure de petite taille ($< 500\text{kb}$), que sont les délétions, insertions et duplications, est aisée. A l'inverse, l'interprétation des aneuploidies, CNV et réarrangements équilibrés ou déséquilibrés nécessite tout de même quelques vérifications manuelles supplémentaires et peut s'avérer plus complexe dans des cas particuliers.

V.4.1. Réarrangements équilibrés (translocations et inversions)

Avec les filtres recommandés, les translocations et inversions sont annotées à partir d'une confiance très faible (0,02). Bien que des valeurs adaptées de confiance ($>0,5$), de VAF ($>5\%$) et de molécules (>10) soient généralement associées à de réelles translocations/inversions, des artefacts (faux-positifs) peuvent parfois avoir des valeurs identiques. La visualisation manuelle sur le Genome browser de toutes les translocations/inversions est donc nécessaire pour vérifier la **présence d'un alignement correct sur le génome de référence** correspondant à : au moins 10 labels correctement alignés de chaque côté des points de cassure et absence de plusieurs labels non alignés (Figure 18). Ce critère nous a permis de classer tous les évènements comme vrai ou faux-positifs sans discordance avec les résultats obtenus par d'autres techniques.

Les translocations équilibrées correspondent à un échange de matériel entre deux chromosomes. Les deux dérivés chromosomiques doivent donc être détectés par l'OGM avec la **présence d'une « molécule chimérique » pour chaque dérivé** (Figure 18). Si la translocation est plus complexe avec plus de deux chromosomes impliqués, on doit identifier autant de « molécule chimérique » que de dérivés chromosomiques. Dans notre série, nous avons identifié des translocations équilibrées avec un nombre de molécule approprié dans 17 échantillons sur 32 (soit 53%). Pour ces échantillons, le nombre de translocations équilibrées (simples ou complexes) variait de 1 à 3, respectivement dans 82%, 12% et 6% des cas. Toutes ces translocations étaient correctement alignées sur le génome de référence et avaient une VAF supérieure à 5% ainsi qu'une profondeur supérieure à 10 molécules. Le nombre de molécules était corrélé à la VAF. La confiance était supérieure à 0,5 à l'exception d'une à 0,3. Toutes ces translocations, interprétées comme des vrais positifs, ont été retrouvées par au moins une des autres techniques. La présence d'un nombre de molécules chimériques approprié et d'un alignement correct sont donc deux critères permettant d'attester de la fiabilité des translocations équilibrées.

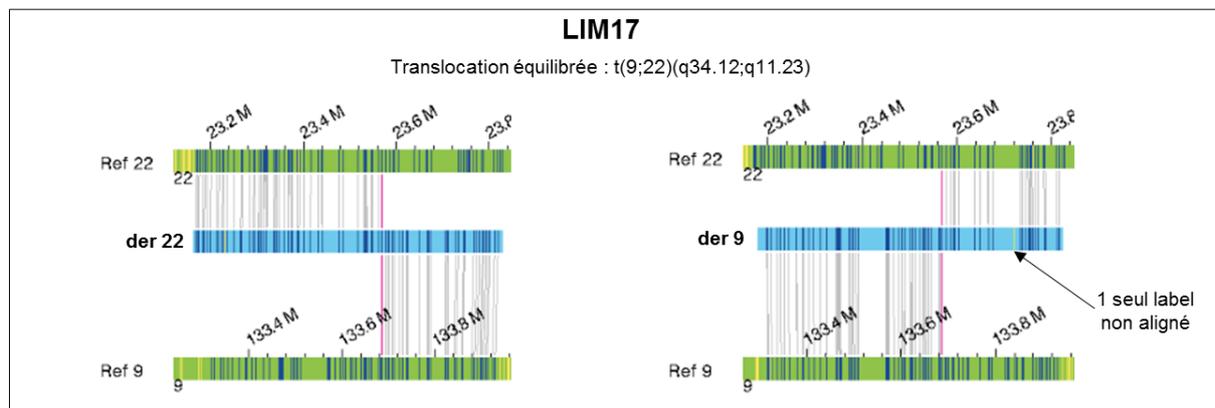


Figure 18 : Exemple d'une translocation équilibrée fiable.

Visualisation sur le Genome browser d'une translocation avec deux molécules chimériques, une pour chaque dérivé. Les labels de l'échantillon sont correctement alignés à ceux du génome de référence et plus de 10 labels sont alignés de chaque côté des points de cassure. Cette anomalie est donc une translocation équilibrée fiable : $t(9;22)(q34.12;q11.23)$.

Aucune translocation équilibrée à plus de deux partenaires n'a été identifiée ni par OGM ni au caryotype.

Attention, dans le cas d'une translocation déséquilibrée, un seul dérivé chromosomique est présent et donc une seule « molécule chimérique » est détectée de façon normale. L'alignement doit donc tout particulièrement être vérifié. La présence d'un ou deux CNV associé(s) permet également de faire la différence avec une translocation équilibrée. L'interprétation des translocations déséquilibrées sera expliquée par la suite.

Les inversions correspondent à une **modification de l'orientation** du matériel génétique sur un même chromosome qui doit être identifiée par l'alignement (soit par une inversion de l'alignement, soit par une échelle des positions génomiques décroissante). Deux points de cassure sont nécessaires donc **deux « molécules hybrides » correspondant aux deux points de cassure** doivent être présentes. Des inversions peuvent également être associées à des translocations au sein d'un réarrangement équilibré mais plus complexe. On doit alors identifier **autant de « molécule chimérique » que de points de cassure**.

Une seule inversion simple a été détectée pour LIM32, $inv(12)(p11q21)$, mais elle était associée à une délétion, $del(12)(p13p11)$, donc le réarrangement global n'était pas équilibré (Figure 19). Deux molécules hybrides étaient bien présentes mais la délétion entraîne un point de cassure supplémentaire (donc 3 points de cassure). Ce réarrangement était cryptique au caryotype mais confirmé par la technique RNAseq.

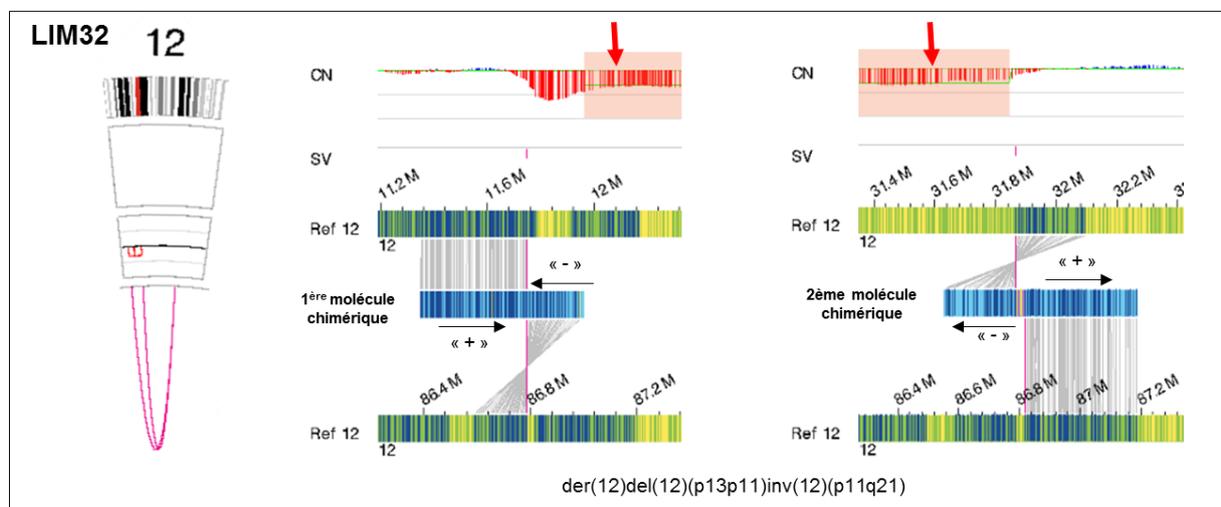


Figure 19 : Inversion associée à une délétion.

Deux translocations intra-chromosomiques sont visibles sur le Circos plot avec également une perte en 12p. Une molécule chimérique correspond à chaque translocation. Une modification de l'orientation (« + » ou « - ») de l'alignement est présente pour les deux molécules. Cela correspond donc à une inversion, $inv(12)(p11q21)$, avec deux points de cassure (positions génomiques 11,746,944 et 86,787,272). La présence d'une délétion associée entraîne un 3^{ème} point de cassure à la position 31,865,071. Le début et la fin de la perte 12p, visibles sur le Genome browser (flèches rouges), correspondent aux points de cassure des translocations. Le réarrangement global est non équilibré.

Deux inversions faisant parti d'un réarrangement équilibré plus complexe ont été détectées par OGM :

- LIM87 (Figure 20A) : réarrangement équilibré entre les chromosomes X et 5 associant une inversion paracentrique d'un chromosome X, $inv(X)(q22.3q28)$, et deux translocations, $t(X;5)(q28;q15)$ et $t(X;5)(q22.3;q15)$. Il entraînait la répartition d'un chromosome 5 sur deux

dérivés, $\text{der}(X)t(X;5)(q22.3;q15)$ et $\text{der}(5)\text{inv}(X)(q22.3q28)t(X;5)(q28;q15)$, correspondant à l'add(X)(q28) et au marqueur sur le caryotype. Deux chromosomes 5 normaux étaient également présents au caryotype, ce qui est concordant avec le gain total du chromosome 5 détecté par OGM.

- LIM9 (Figure 20B) : réarrangement équilibré entre les chromosomes 3 et 10 associant une inversion paracentrique d'un chromosome 10, $\text{inv}(10)(q21.1q25.1)$, et deux translocations, $t(3;10)(q27.1;q25.1)$ et $t(3;10)(q27.1;q21.1)$. Ce réarrangement était cryptique au caryotype.

Pour ces trois cas, le nombre de molécules chimériques était approprié et les autres critères étaient au-dessus des valeurs requises.

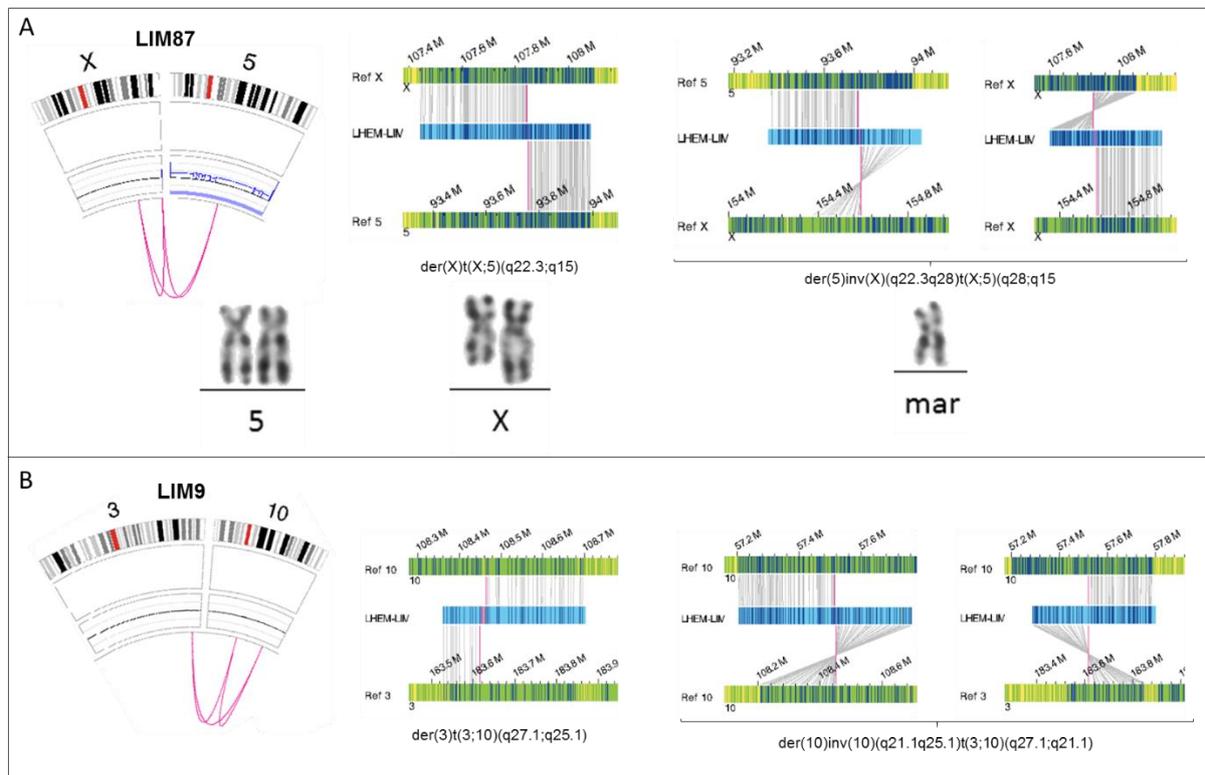


Figure 20 : Inversions au sein d'un réarrangement équilibré plus complexe.

A : Détection par OGM d'une inversion paracentrique d'un chromosome X au sein d'un réarrangement équilibré entre les chromosomes X et 5. Les deux dérivés, $\text{der}(X)$ et $\text{der}(5)$ correspondent respectivement à l'add(X)(q28) et au marqueur identifiés au caryotype. Au total, il y a 3 copies complètes du chromosome 5 réparties sur deux chromosomes 5 normaux et sur les deux dérivés. **B** : Détection par OGM d'une inversion paracentrique d'un chromosome 10 au sein d'un réarrangement équilibré entre les chromosomes 3 et 10. Les deux dérivés, $\text{der}(3)$ et $\text{der}(10)$ obtenus ne sont pas visibles au caryotype car ce réarrangement est cryptique.

Identification des réarrangements intra- ou inter-chromosomiques faux-positifs :

D'autres réarrangements, translocations et inversions, sont visualisés mais avec un alignement incorrect sur le génome de référence et une seule molécule chimérique (Figure 21). Des réarrangements de ce type ont été détectés dans 21 échantillons sur 32 (soit 66%) avec en majorité moins de 3 par échantillon. Ils ont donc été interprétés comme des **artefacts (faux-positif)**. De façon inattendue, ils avaient souvent une VAF élevée et une bonne profondeur. La confiance était variable mais le plus souvent inférieure à 0,5. Les deux critères

les plus importants pour considérer une translocation équilibrée ou inversion comme vraies sont donc l'alignement sur le génome et la présence d'un nombre de molécule chimérique adapté.

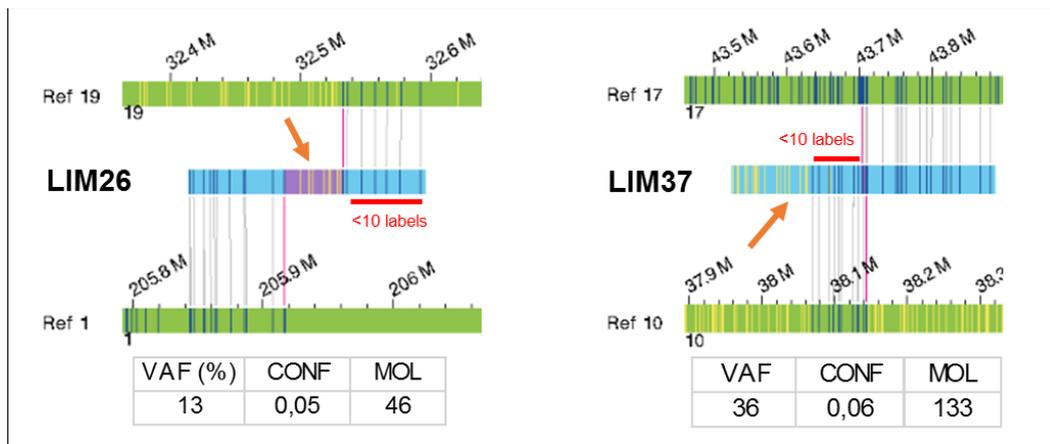


Figure 21 : Exemple de deux translocations artefactuelles détectées par OGM.

Ces deux translocations, détectées pour LIM26 et LIM37, ont été interprétées comme des artefacts car l'alignement sur le génome de référence était incorrect avec moins de 10 labels au niveau d'un point de cassure et des labels non alignés sur le génome de référence (flèche orange). De plus, une seule molécule chimérique était détectée pour ces artefacts. Il ne faut donc pas se fier à la VAF et la profondeur (MOL) qui étaient correctes pour les deux translocations. La confiance était faible mais cela est également le cas pour des vrais positifs.

V.4.2. CNV et aneuploïdies

Les CNV et les aneuploïdies sont des altérations particulièrement fréquentes dans les LAL. Nous avons en effet détecté au moins un CNV (>5Mb) ou une aneuploïdie pour 28 échantillons sur 32, soit dans 87.5% des cas. Les quatre échantillons sans CNV ou aneuploïdies (LIM26, 54, 68 et 113) avaient tous un réarrangement équilibré unique. Leur détection et interprétation appropriées sont donc primordiales.

V.4.2.1. CNV simples et complexes

L'interprétation des CNV se fait principalement sur la vue Whole genome qui permet de visualiser le profil des CNV de l'ensemble des chromosomes. Les CNV ayant une confiance supérieure ou égale à celle du réglage du filtre (soit ≥ 0.99 pour le filtre recommandé) sont automatiquement mis en surbrillance et annotés sur le Whole genome. Ils sont également visibles sur le Circos plot. En revanche, les CNV détectés à une confiance inférieure ne sont pas visibles sur le Circos plot et ne sont ni annotés ni mis en surbrillance sur le Whole genome.

Avec les filtres recommandés de confiance (≥ 0.99), des CNV ont été détectés dans 75% des cas (24 sur 32 échantillons) avec dans la majorité des cas (59%, $n=19$) des CNV considérés comme complexes, c'est-à-dire faisant parti d'un réarrangement déséquilibré.

Les **CNV simples** correspondent à des pertes et gains mais sans déplacement du matériel génétique. Le Circos plot permet de vérifier cela par l'absence de translocation ayant un point de cassure à une extrémité d'un CNV et l'autre point de cassure localisé à un autre endroit du génome. Pour les délétions et duplications interstitielles, à l'exception parfois de celles à proximité du centromère (Figure 22C), une translocation intra-chromosomique est détectée et visible sur le Circos plot et les points de cassure correspondent aux deux extrémités du CNV

(Figures 22A et B). Cette translocation ne correspond pas à un déplacement de matériel mais indique : i) la fusion entre les deux extrémités d'une délétion interstitielle ; ii) la duplication du matériel à l'emplacement initial. Il n'y aura pas de translocation intra-chromosomique pour les délétions terminales (Figure 22D) puisqu'il n'y a pas de fusion entre deux extrémités. En revanche, l'absence d'une translocation intra-chromosomique pour les duplications interstitielles ou terminales fait suspecter le déplacement du matériel sur un autre chromosome et donc probablement un réarrangement déséquilibré.

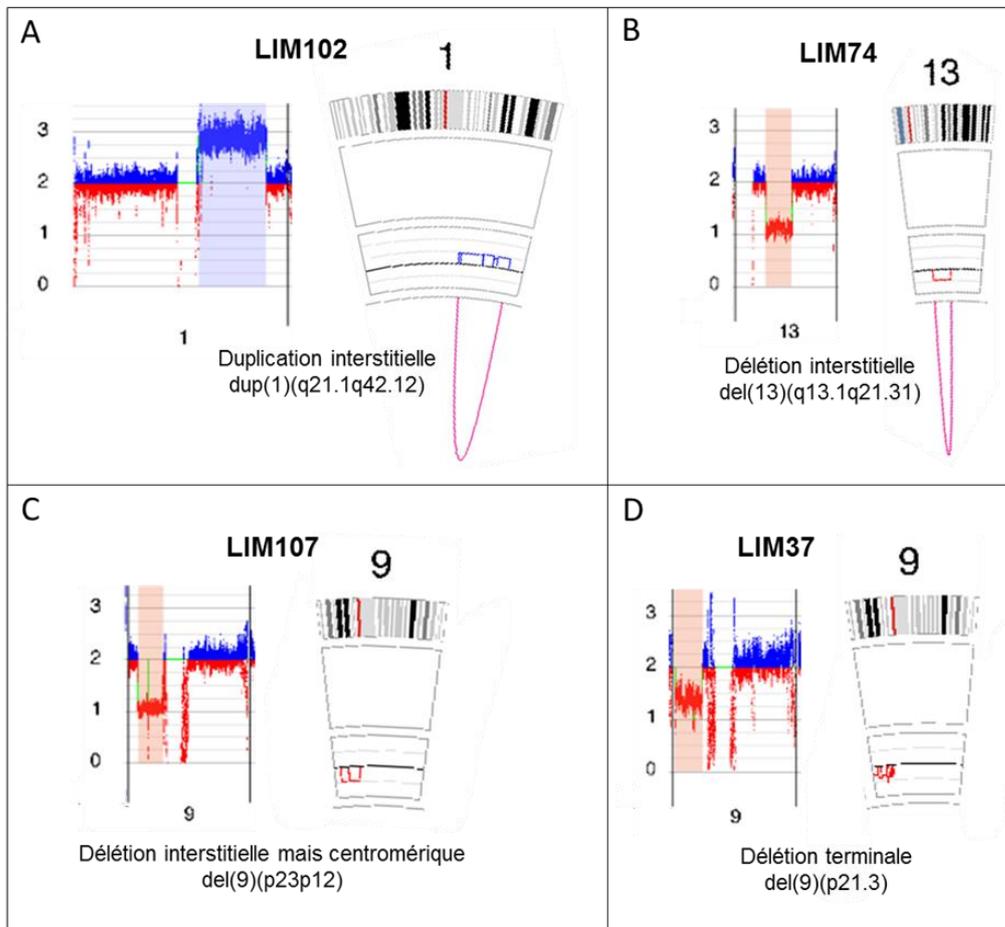


Figure 22 : Visualisation des CNV simples sur le Whole genome et le Circos plot.

Les CNV ayant une confiance optimale (≥ 0.99) sont mis en surbrillance par rapport au reste du profil sur le Whole genome et sont visibles sur le Circos plot. Le centromère correspond à la barre rouge dans la représentation des bandes chromosomiques. **A** : Duplication interstitielle confirmée par la translocation intra-chromosomique du chromosome 1 sur le Circos plot. **B** : Délétion interstitielle confirmée par la translocation intra-chromosomique du chromosome 13 sur le Circos plot. **C** : La localisation centromérique d'une extrémité de la délétion interstitielle ne permet pas toujours la détection d'une translocation intra-chromosomique. **D** : L'absence de translocation intra-chromosomique du chromosome 9 confirme la localisation terminale de la délétion.

Au total, 10 CNV simples ont été retrouvés pour 8 échantillons (33%) et ils avaient tous été identifiés également par au moins une autre technique. Ils correspondaient à :

- 7 délétions interstitielles de type del(1q), del(6q), del(9p), del(12p) et del(13q)
- 2 duplications de type dup(1q)
- 1 amplification en 8q impliquant *MYC*.

A l'inverse, une délétion 13q, $del(13)(?q13q14)$, supposée au caryotype pour LIM107 n'a pas été détectée par OGM. Une sonde FISH ciblant *DLEU*, localisé en 13q14, a été réalisée et retrouvait deux signaux normaux sur la totalité des noyaux analysés. La délétion 13q du caryotype n'a donc pas été confirmée ni par la FISH ni par l'OGM. Etant donné la qualité des chromosomes, on peut considérer que cette anomalie n'est pas présente.

La confiance recommandée (≥ 0.99) est donc fiable pour l'identification des CNV simples vrais positifs. Afin de vérifier l'absence de faux-négatifs, nous avons modifié le réglage de la confiance (« all » = 0) pour visualiser tous les CNV, de type simple, annotés par le pipeline. Les nouveaux CNV visualisables étaient très majoritairement situés au niveau des régions centromériques et télomériques. De plus, les rares CNV ayant une taille supérieure à 5Mb n'étaient jamais retrouvés au caryotype, servant de référence, et correspondaient donc à des artefacts (faux-positifs). La **confiance recommandée (≥ 0.99) a donc été validée** pour l'interprétation des CNV simples.

Les **CNV complexes** font partis d'un **réarrangement déséquilibré** (principalement translocations et isochromosomes), c'est-à-dire avec déplacement de matériel génétique. Ces CNV doivent être interprétés correctement afin d'identifier l'anomalie globale et proposer la nomenclature adaptée.

Dans la plupart des translocations déséquilibrées, leur visualisation et interprétation sont aisées sur le Circos plot de par l'association du/des CNV (gain et/ou perte) et d'une translocation soit sur deux chromosomes différents (inter-chromosomique, Figure 23A), soit sur un même chromosome (intra-chromosomique, Figure 23B).

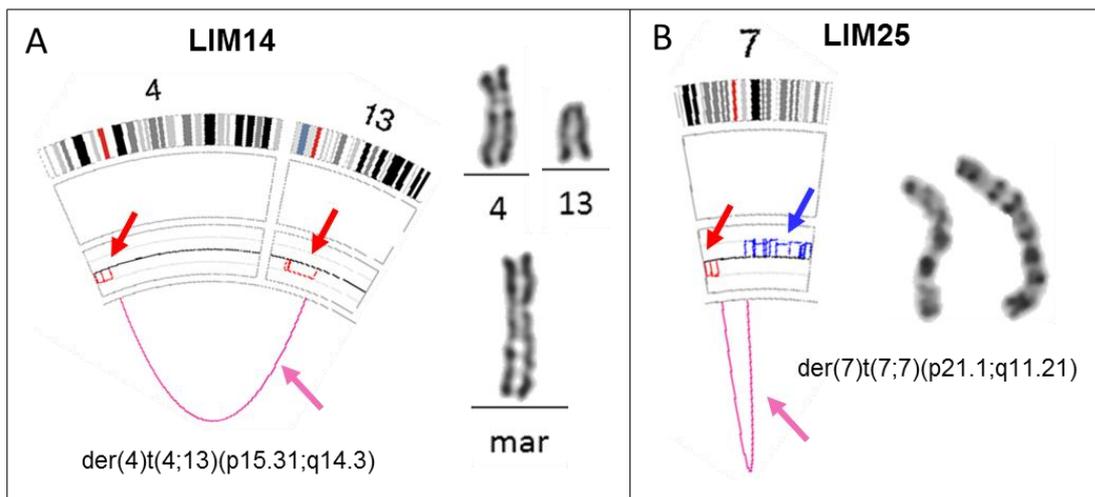


Figure 23 : Profils classiques de translocations déséquilibrées sur le Circos plot.

Les flèches indiquent un gain (bleu), une perte (rouge) et une translocation (rose). Le centromère correspond à la barre rouge dans la représentation des bandes chromosomiques. **A** : Profil classique sur le Circos plot d'une translocation déséquilibrée impliquant deux chromosomes différents avec un $der(4)t(4;13)$ correspondant au marqueur identifié au caryotype. **B** : Profil classique sur le Circos plot d'une translocation déséquilibrée impliquant un même chromosome avec un $der(7)t(7;7)$ également identifié au caryotype.

En revanche, lorsque les points de cassure sont localisés dans une région centromérique (pour les isochromosomes, les translocations Robertsoniennes et parfois les translocations déséquilibrées) ou télomérique (translocations déséquilibrées), la translocation est plus difficilement identifiée par la technique OGM du fait de la mauvaise couverture de ces régions.

Quatre situations différentes ont pu être décrites **en fonction de la localisation des points de cassure** :

- Les deux points de cassure sont centromériques : Cela concernait trois isochromosomes (pour LIM21, 35 et 46) et une translocation déséquilibrée (LIM57). Pour ces quatre cas, aucune translocation intra-chromosomique n'a été détectée par OGM, soit 0% d'informativité (Figure 25A : exemple de LIM35).
- Association de points de cassure centromérique et télomérique : Cela concernait trois échantillons et l'OGM a détecté une translocation pour LIM42 (Figure 24A), mais pas pour LIM8 et LIM9 (Figure 25B), soit 33% d'informativité.
- Un seul point de cassure est centromérique : Cela concernait 4 échantillons (LIM25, 91, 92 et 143) et l'OGM a détecté une translocation pour LIM25, LIM91 (Figure 24B) et LIM143 mais pas pour LIM92 (Figure 25C), soit 75% d'informativité.
- Un seul point de cassure est télomérique : Cela concernait 6 échantillons (LIM42, 45, 57, 87, 116 et 143). Une translocation a été détectée par OGM pour tous, soit 100% d'informativité (Figure 24C : exemple de LIM42).

D'après ces observations, ce sont tout particulièrement les translocations ayant deux points de cassure centromériques ou l'association de points de cassure centromérique et télomérique qui sont très rarement ou non détectées par OGM.

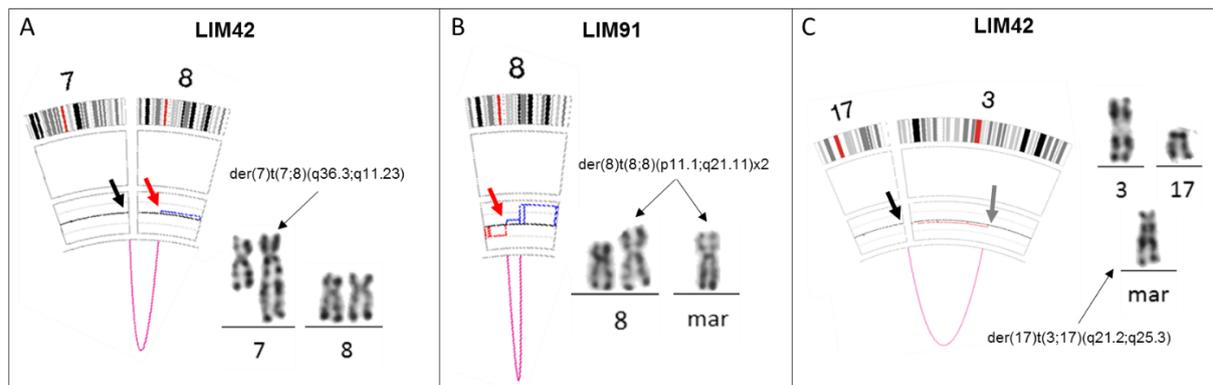


Figure 24 : Exemple de détection de la translocation d'un réarrangement déséquilibré malgré des points de cassure centromériques et/ou télomériques.

Les flèches indiquent les points de cassure centromériques (rouge), télomériques (noir) ou autre (gris). **A** : Identification sur le Circos plot d'un der(7)t(7;8) correspondant à l'add(7)(q34) du caryotype. **B** : Identification sur le Circos plot d'un der(8)t(8;8) et de sa duplication par OGM correspondant à l'add(8)(p21) et au mar du caryotype. **C** : Identification sur le Circos plot d'un der(17)t(3;17) correspondant au mar du caryotype.

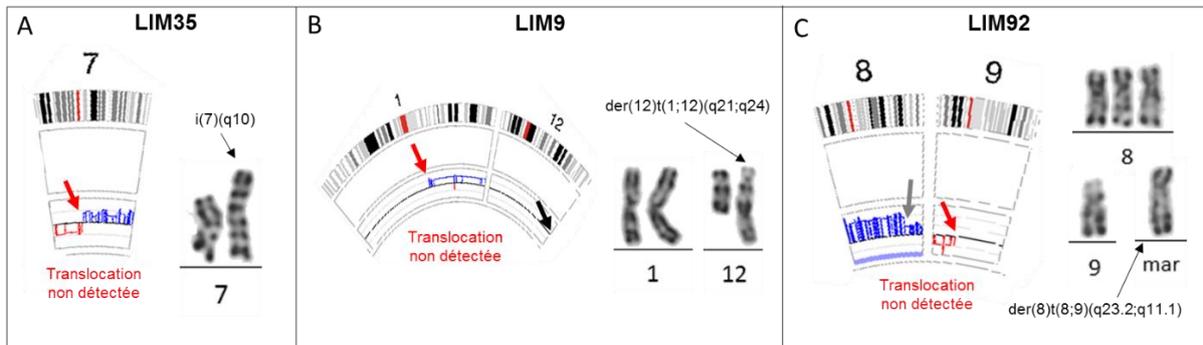


Figure 25 : Exemple de non détection de la translocation d'un réarrangement déséquilibré à cause des points de cassure centromériques et/ou télomériques.

Les flèches indiquent les points de cassure centromériques (rouge), télomériques (noir) ou autre (gris). **A** : Le profil CNV est en faveur d'un isochromosome, $i(7q)$, correspondant à celui identifié au caryotype mais la translocation intra-chromosomique n'est pas détectée à cause des points de cassure centromériques. **B** : L'OGM ne détecte pas de translocation permettant de localiser le gain $1q$ à cause des points de cassure. Sa localisation a pu être déterminée grâce au caryotype qui identifiait un $der(12)t(1;12)(q21;q24)$. **C** : Un réarrangement déséquilibré est suspecté entre les chromosomes 8 et 9 par le profil CNV, en plus de la présence d'une trisomie 8, mais l'OGM ne détecte pas de translocation. Le caryotype retrouvait un marqueur, correspondant à ce réarrangement alors décrit comme un $der(8)t(8;9)$.

De plus, les régions à proximité des centromères et télomères sont souvent très répétées et font donc partie des régions masquées par le **filtre « SV masking filter » sur le mode « non-masked only » par défaut**, selon les recommandations du fournisseur. Nous avons modifié ce filtre en passant sur le **mode « all »** afin de voir si des translocations étaient détectées au niveau des régions masquées et si elles pouvaient correspondre aux réarrangements déséquilibrés cités précédemment pour lesquels aucune translocation n'avait pu être visualisée. Cette modification a permis la visualisation d'une nouvelle translocation uniquement pour LIM57 avec les deux points de cassure correspondant aux deux CNV détectés (perte totale $17p$ et gain total $19q$) pour cet échantillon (Figure 26).

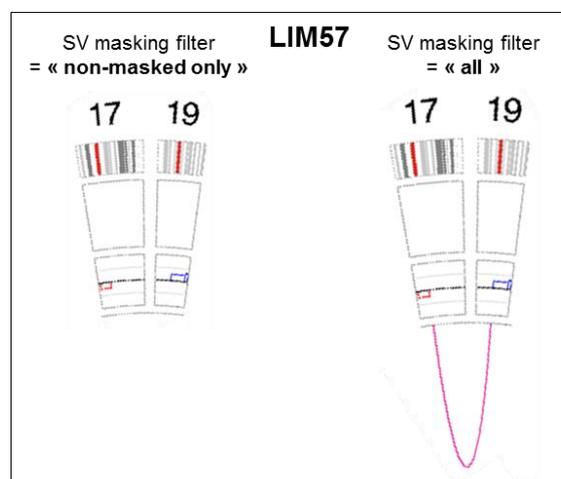


Figure 26 : Impact du filtre « SV masking filter ».

La modification du réglage du filtre « SV masking filter » de « non-masked-only » à « all » a permis la visualisation d'une translocation impliquée dans un réarrangement déséquilibré correspondant à un $der(17)t(17;19)(p11.2;q12)$.

La confirmation du dérivé $\text{der}(17)\text{t}(17;19)(\text{p}11.2;\text{q}12)$, proposé par OGM, n'a pu être effectuée au caryotype par absence de métaphase clonale. N'augmentant que très peu le nombre d'évènements faux positifs, **la modification de ce filtre a été faite de façon permanente** par la suite pour faciliter au maximum l'interprétation des réarrangements déséquilibrés.

Un dernier cas particulier de CNV complexe concernait LIM57 avec un gain détecté par OGM sur le bras long du chromosome 18 et avec un nombre de copies estimé à 4 : $18\text{q}21.1\text{q}23 \times 4$ (Figure 27A). La localisation de ce gain n'a pu être déterminée à cause de l'absence de translocation associée et l'absence de métaphase clonale au caryotype. Une sonde FISH de séparation (XL BCL2 BA, MetaSystems) ciblant *BCL2* ($18\text{q}21.33$) a alors été réalisée avec les résultats suivants : présence de 4 copies de *BCL2* sur 70% des noyaux et 3 métaphases clonales analysés (Figure 27B). La FISH a donc confirmé le gain 18q et le nombre de copies estimé par OGM. Sur les métaphases, les signaux étaient localisés sur 4 chromosomes différents, de petite taille, sans pouvoir les identifier à cause de la mauvaise qualité.

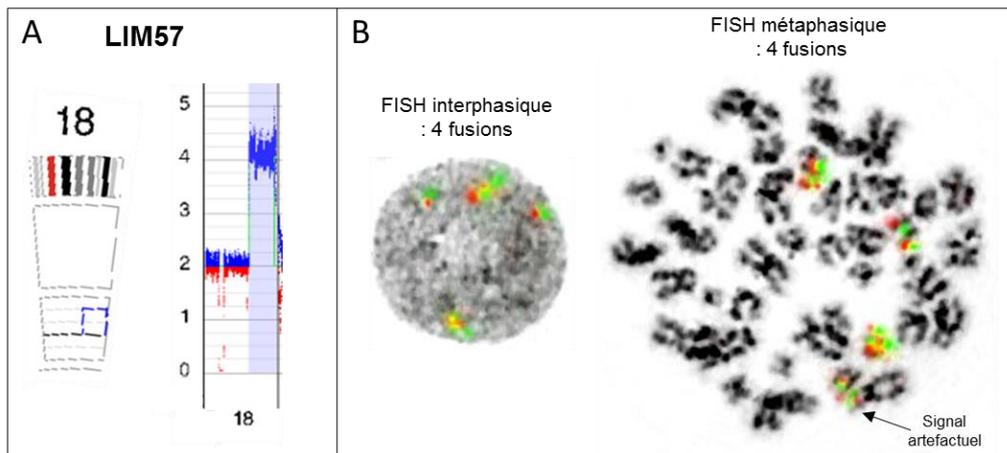


Figure 27 : CNV complexe avec un réarrangement déséquilibré non élucidé.

A : Détection d'un gain par OGM, $18\text{q}21.1\text{q}23 \times 4$, sans translocation associée. **B** : Confirmation du gain par FISH interphasique avec 4 copies de *BCL2* et métaphasique avec des fusions réparties sur 4 chromosomes non identifiés, de petite taille.

En résumé, **un CNV complexe doit être suspecté en l'absence d'une translocation associée dans les situations suivantes** : i) présence d'un ou plusieurs CNV (gain et/ou perte) sur la totalité d'un bras, court ou long, d'un ou plusieurs chromosomes ; ii) présence d'un gain d'une partie terminale d'un chromosome. La comparaison avec les résultats du caryotype (et/ou de la FISH) sera alors nécessaire pour la caractérisation du réarrangement déséquilibré. En l'absence d'identification précise, les résultats OGM ne feront apparaître que la notion de gain ou de perte dans la nomenclature (par exemple : $1\text{q}21.1\text{q}44 \times 3$). Au final dans notre série, 7 CNV complexes n'ont pas pu être caractérisés sans l'aide du caryotype :

- Translocations déséquilibrées (n=4) :

- LIM 8 : Un gain complet du chromosome 11 était identifié sur le profil CNV avec deux intensités différentes pour les bras court et long. Cela correspondait au marqueur du caryotype qui a alors pu être décrit : $\text{der}(11)\text{t}(11;11)(\text{p}13;\text{q}13)$ (Figure 30B, page 103).
- LIM9 : Un dérivé, $\text{der}(12)\text{t}(1;12)$, identifié au caryotype permettait d'expliquer le gain 1q (Figure 25B).

- LIM57 : La FISH a confirmé le gain 18q, avec 4 copies de *BCL2*, mais n'a pas permis l'identification précise du réarrangement déséquilibré. La nomenclature OGM suivante a alors été utilisée : 18q21.1q23x4 (Figure 27).
- LIM92 : Le profil CNV retrouvait une perte totale 9p, une trisomie 8 ainsi qu'un gain quasi-total du chromosome 8 non expliqué. Le caryotype retrouvait une hyperdiploïdie (dont une trisomie 8) associée à un marqueur présentant un signal *ABL1* (localisé en 9q34) en FISH. Une sonde FISH ciblant le centromère du chromosome 8 a été réalisée et a révélé la présence d'un centromère du 8 sur le marqueur. L'association des résultats de cytogénétique et d'OGM ont donc identifié le marqueur comme étant un der(8)t(8;9)(q23.2;q11.1) (Figure 25C).

- **Isochromosomes** (n=3) : La technique OGM ne permet pas d'identifier le réarrangement mais l'anomalie peut être supposée de par les régions impliquées (totalité d'un bras chromosomique) et les nombres de copies associés. Du point de vue de l'interprétation OGM, deux situations différentes sont possibles :

- L'isochromosome remplace un chromosome normal (cas classique) : Cela a pour conséquence, sur le profil CNV, le gain d'un bras (nombre de copies = 3) associé à la perte de l'autre bras (nombre de copies = 1) d'un même chromosome. Ce profil CNV est facilement identifiable par OGM et permet de suspecter un isochromosome bien que la confirmation par le caryotype soit nécessaire. Deux cas sur trois correspondaient à cette situation avec : i) un isochromosome 9q correspondant à un des marqueurs du caryotype pour LIM21 ; ii) un isochromosome 7q identifié au caryotype pour LIM35 (Figure 28A).
- L'isochromosome est présent en plus de la paire chromosomique normale : Le profil CNV sera donc différent avec seulement un gain complet d'un bras court ou long mais avec un nombre de copies estimé proche de 4. Ce profil n'est pas suffisant pour suspecter un isochromosome sans l'aide du caryotype. Un cas de notre série correspondait à cette situation (LIM46) avec un gain complet 4p (nombre de copies estimé à 4) correspondant à l'add(4)(q21) identifié au caryotype (Figure 28B).

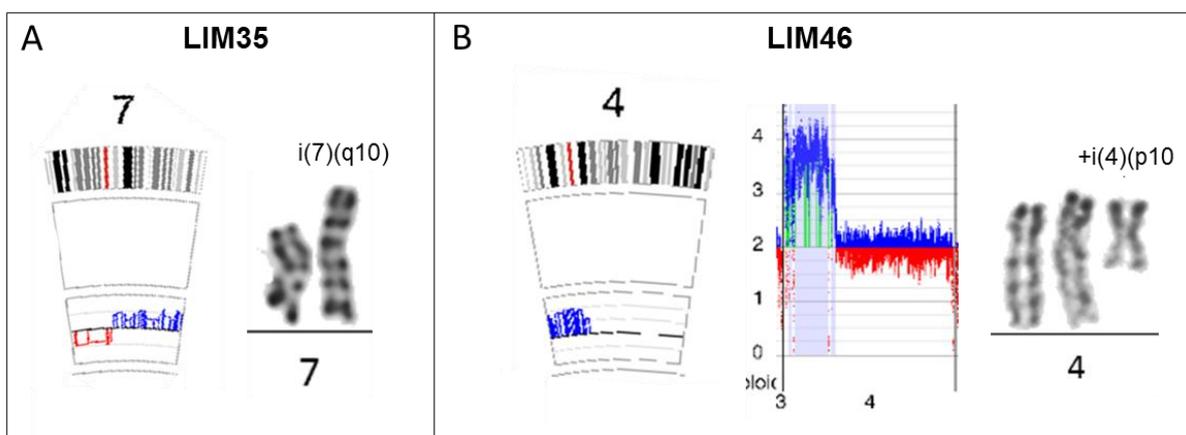


Figure 28 : Identification des isochromosomes selon le profil CNV.

A : L'association d'un gain d'un bras à la perte de l'autre bras d'un même chromosome correspond à un isochromosome remplaçant un chromosome normal. **B** : Le gain d'un bras entier avec un nombre de copies proche de 4 sans perte de l'autre bras associée peut correspondre à un isochromosome présent en plus de la paire chromosomique normale.

Avec le réglage recommandé du filtre de confiance (≥ 0.99), tous les CNV complexes détectés par OGM étaient concordants avec les résultats de cytogénétique (caryotype et FISH), dans la mesure où ils étaient contributifs. Ce réglage permet donc de détecter avec fiabilité les vrais-positifs. En revanche, pour 5 anomalies réparties sur 4 cas différents (LIM21, 32, 42 et 57), nous avons modifié le réglage de ce filtre (confiance = 0) car nous suspicions un CNV complexe dans les deux situations suivantes :

- Présence d'une translocation, avec une seule « molécule chimérique » ayant un alignement correct, et d'un profil CNV suspect mais non mis en surbrillance et annoté (ou bien uniquement partiellement) (Figure 29A). Cela concernait 4 CNV sur les 5. La modification du filtre a confirmé la détection des CNV suspectés (Figure 29B), associés à des réarrangements déséquilibrés, avec des confiances correctes (de 0,7 à 0,96) pour 3 d'entre eux (LIM32, 42 et 57) et une confiance très faible (=0) pour le dernier (LIM21). Les 4 CNV complexes ont été confirmés par les résultats du caryotype ou la réalisation d'une FISH :

- LIM21 : Le réarrangement complexe détecté par OGM entre les chromosomes 1, 10 et 14 avec perte 1p (1p31.1p11.2x1, confiance = 0 et VAF = 10%) était cohérent avec le caryotype pour lequel trois dérivés avaient été proposés pour les mêmes chromosomes.
- LIM32 : Le dérivé, der(3)t(3;6)(q26.32;p21.1), avec gain 6p (6p25.3p21.1x3, confiance = 0,7) détecté par OGM à une VAF de 10% n'a pu être confirmé par le caryotype par absence de métaphase clonale. Une sonde FISH ciblant le gène *DEK* (localisé en 6p22.3) a alors été réalisée et retrouvait 3 signaux sur 24% des noyaux analysés.
- LIM42 : Le dérivé, der(17)t(3;17)(q21.2;q25.3), avec une perte de 3pter à 3q21.2 (confiance = 0.96), détecté par OGM à une VAF de 15% correspondait au marqueur identifié au caryotype.
- LIM57 : Le dérivé, der(1)t(1;13)(p36.22;q31.2), avec perte 13q (13p11.1q31.1x1, confiance = 1) et perte 1p (1p36.32p36.22x1, confiance = 0.92), détecté par OGM à une VAF de 25% n'a pu être confirmé par le caryotype par absence de métaphase clonale. Une sonde FISH ciblant les gènes *DLEU* (localisé en 13q14) et *LAMP1* (localisé en 13q34) a été réalisée et retrouvait la perte d'un signal *DLEU* sur 64% des noyaux analysés.

- Suspicion d'un isochromosome 9q, i(9)(q10), pour LIM21 avec un gain complet 9q détecté (confiance = 1, VAF = 15%) mais sans perte 9q détectée et annotée. Après modification du filtre de confiance, une perte d'un peu plus de la moitié du bras court 9p a finalement été visualisée avec une confiance de 0,14 et une VAF de 10%. Le caryotype retrouvait, en partie, une monosomie 9 ainsi que plusieurs marqueurs. L'un des marqueurs était cohérent avec un isochromosome 9q et 4 signaux de *ABL1* (localisé en 9q34) avaient été retrouvés en FISH.

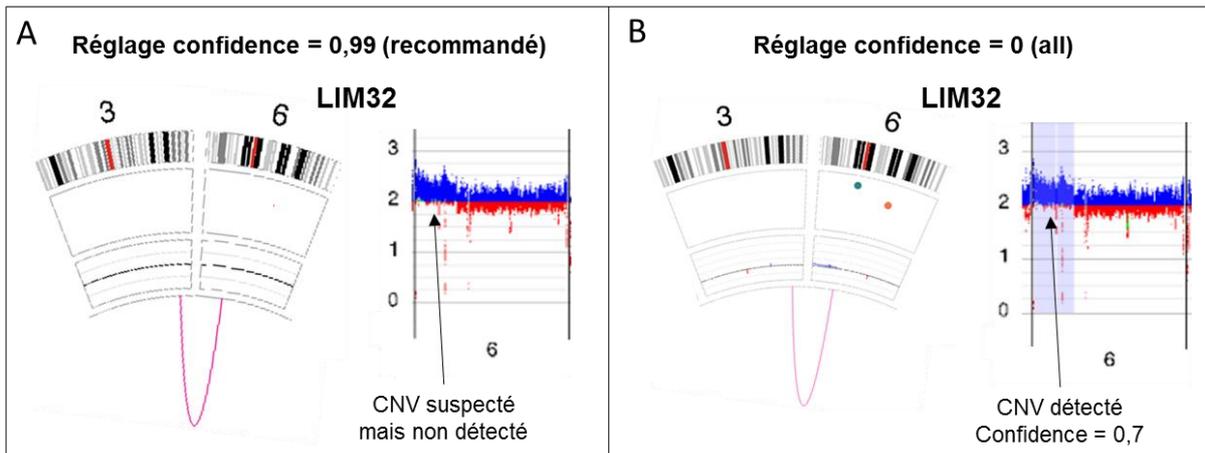


Figure 29 : Détection variable des CNV complexes par OGM en fonction de la confiance.

A : Un gain 6p est suspecté sur le profil CNV (proportion plus importante de bleu) mais non détecté avec le réglage de confiance à 0,99. **B** : La modification du réglage de confiance à 0 permet la détection du gain (mis en surbrillance). Ce gain était annoté avec une confiance de 0,7.

La modification du réglage de la confiance des CNV a donc été utile pour caractériser précisément ces CNV complexes. Cependant, elle a entraîné la présence de nombreux CNV faux-positifs. Nous avons donc choisi de **conserver le réglage recommandé (confiance $\geq 0,99$)** et de le modifier ponctuellement en cas de suspicion d'un CNV faux-négatif lors de l'interprétation. La modification semble particulièrement pertinente si l'on s'attend à avoir une faible VAF (10 à 15%), par exemple dans le cas d'une infiltration blastique plus faible. De plus, il sera nécessaire de confirmer par le caryotype ou la FISH des CNV complexes identifiés par OGM à une faible confiance.

V.4.2.2. Aneuploïdies

Le pipeline bio-informatique détecte les aneuploïdies en fonction du profil CNV des chromosomes et détermine le score de confiance avec deux critères : la proportion du chromosome impacté par des CNV (appelée % Coverage) et l'intensité des CNV (c'est-à-dire le nombre de copies estimé). Les valeurs correspondant à ces deux critères sont disponibles sur la vue Whole genome. La VAF des aneuploïdies est estimée par rapport au nombre de copies et correspond à celle du/des CNV. Les aneuploïdies détectées sont identifiées, sur le Circos plot et sur le Whole genome, par une barre bleu (gain) ou orange (perte) en dessous du ou des chromosomes concernés. Des difficultés pour l'interprétation des aneuploïdies ou des situations particulières ont été mises en évidence dans certains cas.

Des aneuploïdies ont été détectées, à un score de confiance égal à 1, pour 20 échantillons sur 32 (soit 62.5%). Pour ces échantillons, le nombre d'aneuploïdies variait de 1 à 12. Elles étaient très majoritairement des trisomies et tétrasomies. L'OGM détecte des aneuploïdies dès que le nombre de copie global d'un chromosome varie par rapport à la normale. Il détecte donc les **aneuploïdies « simples »** (monosomies, trisomies ...) mais le pipeline va également annoter la présence d'une aneuploïdie dans d'autres situations : i) un gain total ou une perte totale d'un chromosome mais sous la forme d'un **réarrangement complexe** avec déplacement du matériel sur un autre chromosome (LIM87) ; ii) une « **fausse aneuploïdie** » détectée dans le cadre d'un réarrangement déséquilibré plus complexe impliquant la perte ou

le gain de la quasi-totalité d'un chromosome (LIM35 et LIM92) ; iii) une vraie **aneuploïdie associée à un gain (LIM8, 92 et 139) ou perte (LIM95) supplémentaire** du même chromosome dans le cadre d'un réarrangement déséquilibré .

Pour 5 des 6 échantillons concernés par les trois situations différentes d'une « aneuploïdie simple », la visualisation du profil CNV, directement sur le Circos plot ou sur le Whole genome pour plus de précision, a permis l'interprétation correcte de l'altération :

- LIM87 (Figure 20A, page 92) : Détection d'une aneuploïdie du chromosome 5 avec 3 copies. Le Circos plot permettait de visualiser la présence associée d'un réarrangement entre les chromosomes X et 5. L'analyse du réarrangement sur le Genome browser a permis d'identifier deux dérivés, $der(X)t(X;5)(q22.3;q15)$ et $der(5)inv(X)(q22.3q28)t(X;5)(q28;q15)$, correspondant à l' $add(X)(q28)$ et au marqueur du caryotype. Une copie entière du chromosome 5 était donc bien présente mais répartie sur les deux dérivés.

- LIM35 (Figure 30A) : Détection d'une fausse monosomie du chromosome 13 par le pipeline, avec une absence de CNV sur une portion du chromosome. Le Circos plot a permis de visualiser un réarrangement déséquilibré, $der(13)t(5;13)(q13.3;q12.3)$, avec une délétion partielle 13q et un gain 5q. Ce dérivé correspondait à l' $add(13)(q34)$ du caryotype.

- LIM8 (Figure 30B) : Détection d'une aneuploïdie du chromosome 11 avec présence de deux gains d'intensité différente. Le profil CNV a permis d'identifier un des marqueurs du caryotype comme étant un dérivé, $der(11)t(11;11)(p13;q13)$. Ce dérivé entraîne la présence de 3 copies entières du chromosome 11 et 4 copies du bras long. Il est donc normal que l'OGM détecte une aneuploïdie.

- LIM92 (Figure 30C) : Détection d'une fausse trisomie du chromosome 12 avec une absence de CNV sur une portion du chromosome ainsi qu'une intensité différente de gain sur le chromosome 14. Le Circos plot permettait de visualiser un réarrangement déséquilibré, $der(12)t(12;14)(p13.1;q13.3)$. Au total, il y avait donc une vraie trisomie 14 associée au $der(12)$ entraînant un gain supplémentaire en 14q (confirmé par 4 signaux *IGH* en FISH) et un gain quasi-total du chromosome 12.

- LIM139 (Figure 30D) : Le pipeline a détecté une aneuploïdie du chromosome 18 mais avec deux intensités différentes de gain. Le Circos plot permettait de visualiser un réarrangement déséquilibré, $der(18)t(16;18)(q23.3;q21.1)$. Au total, il y avait donc une vraie trisomie 18 associée au $der(18)$ entraînant un gain supplémentaire en 18q. La relecture du caryotype a confirmé ces deux anomalies, précédemment classées en trisomie 15 et trisomie 20.

Pour le dernier des 6, LIM95, plusieurs aneuploïdies étaient associées à des réarrangements très complexes de type chromothripsis. Ce cas sera détaillé dans une partie suivante illustrant les chromothripsis (page 111).

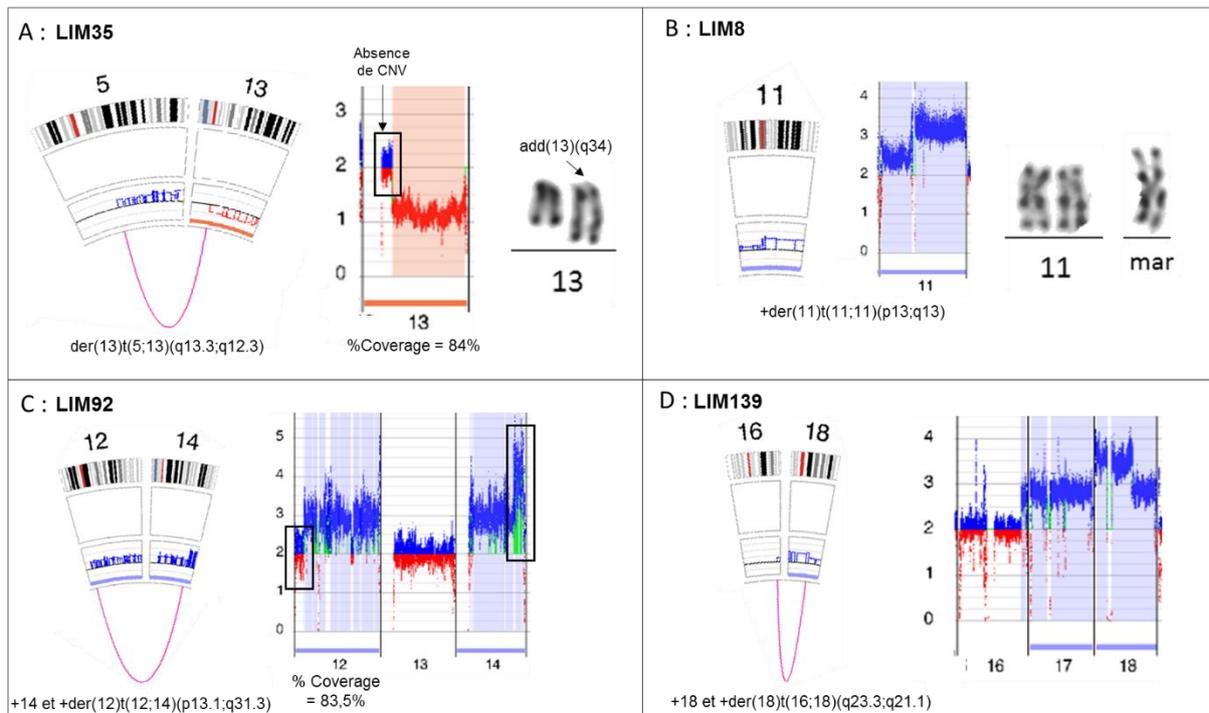


Figure 30 : Exemples de fausses aneuploïdies et d'aneuploïdies associées à un réarrangement complexe.

A : Détection d'une fausse monosomie du chromosome 13 (perte non totale) permettant d'identifier l'add(13q) du caryotype en der(13)t(5;13). **B :** L'aneuploïdie du chromosome 11 détectée correspond en fait à un réarrangement plus complexe. Initialement identifiée en marqueur, la confrontation au profil CNV précise l'anomalie en der(11)t(11;11). **C :** Cas d'une hyperdiploïdie (dont une trisomie 14) associée à un marqueur au caryotype. Le profil CNV détecte une fausse trisomie du chromosome 12 (gain non total) et permet de redéfinir le marqueur en der(12)t(12;14). **D :** Ici, une vraie trisomie 18 est associée à un gain supplémentaire partiel du 18 sous la forme d'un der(18)t(16;18). Des trisomies 15 et 20 étaient initialement avancées au caryotype, l'OGM a permis de les reclasser en trisomie 18 et der(18).

La visualisation du profil CNV en rapport avec les aneuploïdies détectées est donc nécessaire. La présence d'une translocation sur le Circos plot au niveau des CNV permet également de suspecter un réarrangement déséquilibré et non une simple aneuploïdie. De plus, la proportion du chromosome impacté par les CNV est un bon marqueur. En effet, elle était inférieure à 85% dans les cas avec une fausse aneuploïdie alors qu'elle était comprise pour les vraies aneuploïdies : i) entre 85 et 100% pour les chromosomes acrocentriques (13, 14, 15, 21 et 22) et le chromosome Y à cause d'une couverture plus faible ; ii) entre 95 et 100% pour tous les autres chromosomes. Cependant, un pourcentage de CNV proche de 100% peut également correspondre à un réarrangement complexe (LIM8, Figure 30B) ou à une vraie aneuploïdie en plus d'un réarrangement déséquilibré (LIM92 et 139, Figure 30C et 30D).

Avec le réglage recommandé du filtre de confiance des aneuploïdies (> 0.95), nous avons pu mettre en évidence, pour cinq échantillons, **l'absence de détection d'une aneuploïdie par le pipeline alors que le profil CNV était très en faveur** (LIM46) ou faisait suspecter (LIM17, 30, 95 et 104) une trisomie ou une monosomie (Figure 31A). Devant cette problématique, nous avons choisi de modifier le réglage du filtre de confiance en passant de 0.95 à 0 afin de visualiser si des aneuploïdies étaient détectées mais avec un score de confiance plus faible.

Cela a été le cas pour tous à l'exception de LIM46 (Figure 31B). En revanche, LIM46 était le seul pour lequel le profil CNV correspondant à l'aneuploïdie suspectée avait une confiance optimale (≥ 0.99) sur la majorité du chromosome. Pour les autres, le score de confiance des CNV était de 0. En parallèle, la comparaison systématique avec les résultats du caryotype (Figure 31C), servant de référence, a permis d'interpréter les résultats OGM :

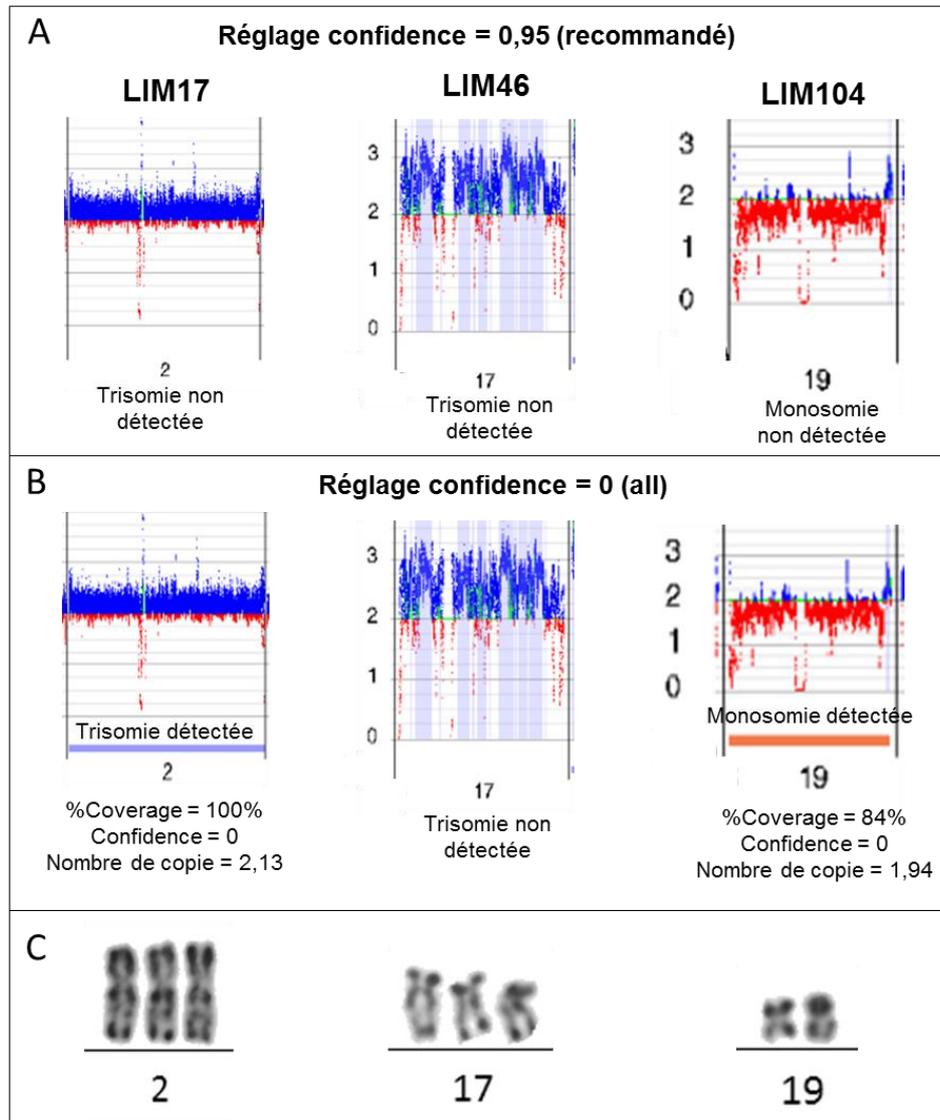


Figure 31 : Détection variable des aneuploïdies par OGM en fonction de la confiance.

A : Aucune aneuploïdie n'est détectée pour ces trois échantillons avec le réglage recommandé de la confiance ($=0.95$) alors que les profils CNV font suspecter des trisomies ou monosomies. **B** : La modification du réglage de la confiance ($=0$) permet la détection, à faible confiance, d'une trisomie 2 pour LIM17 et d'une monosomie 19 pour LIM104. En revanche, une trisomie 17 n'est pas détectée pour LIM46. **C** : Des trisomies 2 et 17 ont été identifiées au caryotype respectivement pour LIM17 et LIM46. A l'inverse, le caryotype ne montrait pas de trisomie 19 pour LIM104.

- LIM17 : La trisomie 2 suspectée, avec un %Coverage de 100% et une VAF d'environ 5-10% était présente au caryotype mais sous-clonale (40% des métaphases).

- LIM30 : Les monosomies supposées des chromosomes 3, 7, 15, 16 et 17, avec des %Coverage entre 98 et 100% et des VAF de 5-10%, n'étaient pas présentes sur le caryotype

mais avaient été identifiées sur le caryotype fait au diagnostic pour le même patient (correspondant à LIM14). En effet, le clone hypodiploïde du diagnostic n'avait pu être retrouvé qu'en FISH (sur 22% des noyaux) au suivi.

- LIM46 : La trisomie 17 fortement suspectée par les CNV (gain) à une VAF de 30% était clonale au caryotype. Une explication potentielle à sa non détection en tant qu'aneuploïdie par le pipeline était la présence de CQ attestant d'un bruit de fond sur les CNV mais n'ayant pas impacté la détection correcte des autres aneuploïdies ou CNV également présents au caryotype.

- LIM 95 et 104 : La trisomie 19 suspectée dans les deux cas, avec un %Coverage de 94% et une faible VAF (<5%), n'était pas présente au caryotype.

En résumé, la **modification du réglage du filtre de confiance** permet la visualisation d'aneuploïdies détectées mais non visibles avec les filtres par défaut du fait d'une faible confiance. Cette détection s'est avérée fiable pour LIM17 et LIM30 et la faible confiance était due à une faible VAF en corrélation, respectivement, avec la sous-clonalité au caryotype ou la faible présence du clone en FISH. Dans ces deux cas, le %Coverage était très proche de 100%. À l'inverse, la détection à faible confiance d'une aneuploïdie peut également correspondre à un artefact comme pour LIM95 et LIM104. Le %Coverage était inférieur à 95% pour ces deux cas.

La modification du filtre, testée sur tous les autres échantillons, n'a entraîné que peu de faux-positifs et tous étaient identifiables par revue du profil CNV. Nous avons donc validé la modification permanente de ce filtre afin de limiter le risque de faux-négatifs. De plus, à partir des observations faites sur ces 5 échantillons, nous avons établi les règles suivantes pour les interprétations délicates : i) la présence d'un CNV (gain ou perte) sur la totalité d'un chromosome à une forte intensité, avec une VAF assez élevée ($\geq 10\%$) et une bonne confiance (≥ 0.99) est à considérer comme une aneuploïdie (comme pour LIM46) même si le pipeline n'a pas annoté l'anomalie en tant que telle ; ii) les aneuploïdies détectées avec une confiance inférieure à 0,95 et dont les CNV associés n'ont pas une forte confiance doivent être confirmées par une autre technique (caryotype ou FISH), en particulier si le %Coverage est inférieur à 95%.

Enfin, la **détection des aneuploïdies du chromosome Y est moins fiable** du fait des régions très répétées et mal couvertes, même avec des scores de confiance élevés. Cette problématique est importante pour plusieurs raisons : i) des gains du chromosome Y sont relativement fréquents dans les LAL-B, notamment hyperdiploïdes ; ii) les patients traités par allogreffe de CSH avec un donneur de sexe différent auront une présence ou absence anormale d'un chromosome Y ; iii) les pertes physiologiques du chromosome Y sont fréquentes chez les hommes âgés.

Il est donc particulièrement nécessaire de visualiser le profil CNV du chromosome Y pour avoir une interprétation correcte. Cependant, les CNV présents sur le chromosome Y font partis de ceux masqués par le filtre « CNV masking filter ». L'activation de ce filtre par défaut, selon les recommandations du fournisseur, masque la visualisation des CNV, peu importe leur confiance, sur le Circos plot. Le profil CNV est tout de même visible sur le Whole genome mais sans les annotations du pipeline (notamment la confiance des CNV) (Figure 32A). Nous avons donc **désactivé le filtre « CNV masking filter »** pour interpréter les analyses (Figures 32B et C).

Des aneuploïdies du chromosome Y ont été détectées avec une confiance à 1 et un %Coverage compris entre 80 et 90% pour 6 échantillons. Le profil CNV avec des confiances élevées (≥ 0.99) était cohérent avec l'aneuploïdie (Figure 32B) pour 5 d'entre eux (LIM42, 69, 74, 95 et 102). A l'inverse, le profil CNV avec des confiances faibles était en faveur d'un artefact pour LIM26 (Figure 32C). Cette interprétation était concordante avec les résultats du caryotype : i) une aneuploïdie du chromosome Y était présente pour LIM69, 74, 95 et 102 ; ii) des métaphases non clonales issues du donneur étaient présentes pour LIM42 ; iii) absence d'aneuploïdie pour LIM26. De plus, des aneuploïdies du chromosome Y ont également été détectées pour 3 échantillons (LIM8, 14 et 34) mais avec une confiance de 0. Elles ont été interprétées comme étant des artefacts avec le profil CNV et aucune n'était retrouvée au caryotype.

La désactivation du filtre a eu pour impact négatif de détecter quelques CNV « faux-positifs » supplémentaires, localisés très majoritairement dans les régions télomériques et centromériques, mais facilement éliminables. Cette modification a donc été réalisée de façon permanente afin d'obtenir une interprétation la plus fiable possible.

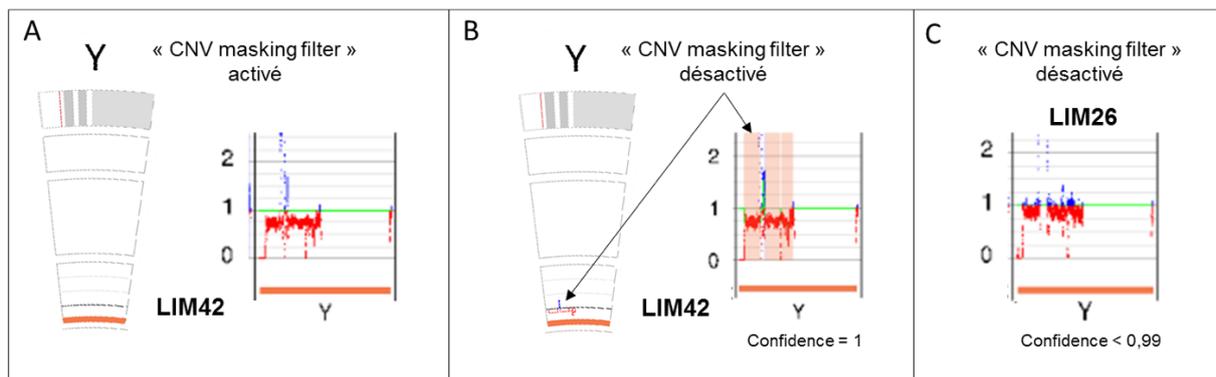


Figure 32 : Interprétation délicate des aneuploïdies du chromosome Y.

A : L'activation du filtre « CNV masking filter » bloque la visualisation du profil CNV sur le Circos plot. Il est visible sur le Whole genome mais sans les annotations, notamment la confiance. **B :** La désactivation du filtre permet la visualisation des CNV à forte confiance (≥ 0.99) sur le Circos plot. Ils sont également mis en surbrillance sur le Whole genome. Le profil CNV de LIM42 est en faveur d'une vraie monosomie Y. **C :** Le profil CNV de LIM26 est en faveur d'un artefact avec des CNV de confiance non optimale (< 0.99).

V.4.3. Réarrangements génomiques catastrophiques (chromoanagenesis)

Les réarrangements génomiques catastrophiques sont des anomalies parfois visibles au caryotype avec la présence de multiples réarrangements complexes impactant une ou plusieurs régions du génome. Ils sont regroupés sous le terme de chromoanagenesis, incluant les chromoanasythesis (cha), chromothripsis (cth) et chromoplexy (cpx). Ils ont des mécanismes de réarrangement et de réparation différents (217). Les chromothripsis et chromoanasythesis sont le plus souvent localisés sur un seul chromosome avec de multiples réarrangements déséquilibrés. Les chromoplexy correspondent à la formation de multiples dérivés par réassemblage du génome à la suite de multiples réarrangements équilibrés. L'OGM permet d'identifier ces réarrangements catastrophiques. Cependant, il peut être difficile de faire la distinction entre un chromothripsis et un chromoanasythesis et on parlera alors de réarrangement complexe (cx). La nomenclature de ces réarrangements par OGM est basée sur celle de la CGH-array, selon l'ISCN.

Sur les 32 échantillons, des chromoanagenesis ont été détectés pour 3 cas :

- LIM21 (Figure 33) : Deux réarrangements très complexes ont été détectés. L'un concernait les chromosomes 1, 10 et 14 et l'autre les chromosomes 5, 13 et 18. Le mécanisme n'ayant pu être déterminé, les nomenclatures suivantes ont été utilisées : (1,10,14)cx et (5,13,18)cx. Ces deux réarrangements étaient compatibles avec les résultats du caryotype.

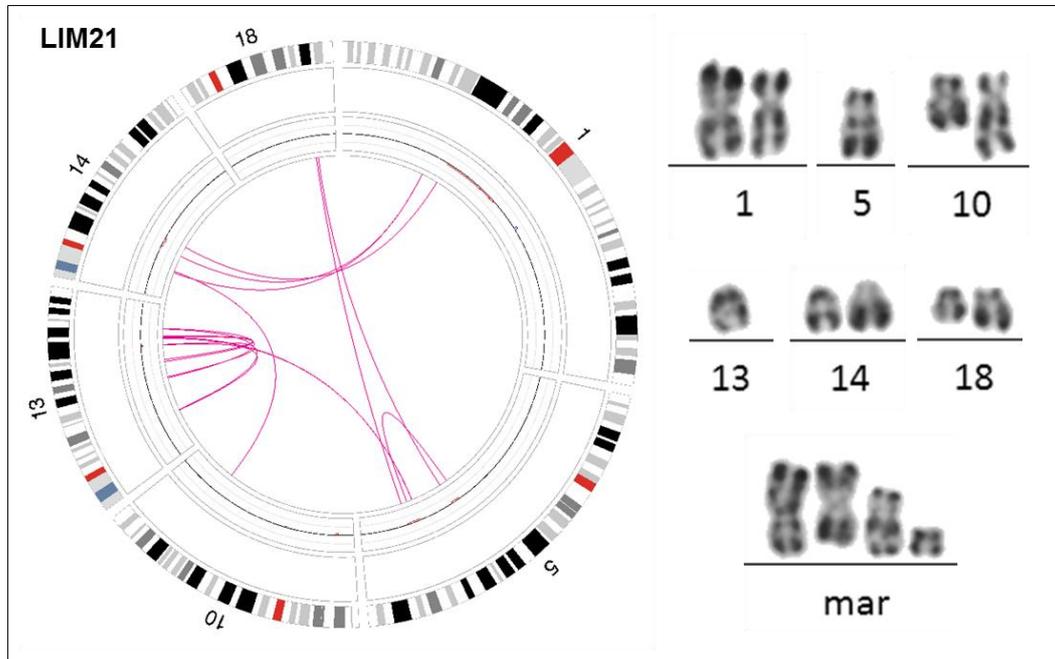


Figure 33 : Réarrangements catastrophiques impliquant plusieurs chromosomes.

Deux réarrangements très complexes impliquant respectivement les chromosomes 1, 10, 14 et 5, 13, 18 ont été détectés par OGM. Ils étaient cohérents avec le caryotype complexe (le 2^{ème} marqueur correspond à un i(9)q10) et ne fait pas parti des réarrangements très complexes).

- LIM95 (Figure 34A) : En plus d'une perte complète d'un chromosome 10 et 15, de multiples gains et pertes étaient présents et associés à des translocations déséquilibrées. Pour les chromosomes 9, 10 et 15, nous avons utilisé la nomenclature de type chromothripsis : (9)cth, (10)cth et (15)cth. Pour le chromosome 17, nous avons utilisé la nomenclature (17)cx. Au caryotype, seulement 4 mitoses hyperdiploïdes inclassables et 5 mitoses normales avaient été obtenues.

- LIM104 (Figure 34B) : De multiples translocations associées à des délétions ont été détectées sur le chromosome 9 uniquement. La nomenclature suivante a été utilisée : (9)cth. Aucun chromosome 9 normal n'était présent au caryotype qui retrouvait par contre deux marqueurs ainsi qu'un add(17)(p10). L'add(17p) correspondait à une translocation équilibrée, t(3;17)(p21.31;q11.2), identifiée par OGM. Le chromothripsis détecté par OGM correspond probablement aux deux marqueurs. Il implique donc deux chromosomes 9 et la nomenclature devient : (9,9_)cth.

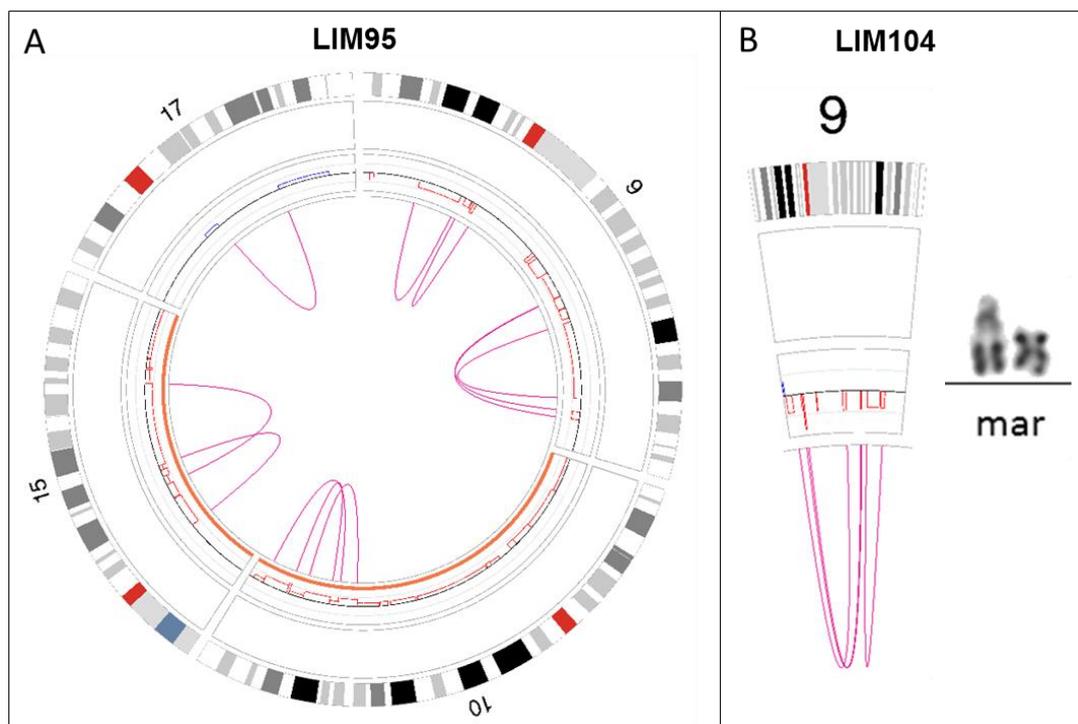


Figure 34 : Réarrangements catastrophiques impliquant respectivement un seul chromosome.

A : Des réarrangements très complexes déséquilibrés intra-chromosomiques avec pertes ou gains de matériels ont été détectés par OGM pour les chromosomes 9, 10, 15 et 17. B : L'association de multiples pertes et translocations intra-chromosomiques sur le chromosome 9 correspond à un chromothripsis. Il concerne les deux chromosomes 9 et correspond donc aux deux marqueurs du caryotype.

V.4.4. Apport du pipeline De Novo

Le pipeline De Novo a été réalisé en plus du pipeline RVA pour 25 échantillons (sur 32 au total, 24 LAL-B et 1 LAL-T). Tous ces échantillons avaient une infiltration blastique supérieure à 40% et donc des VAF théoriques pour les anomalies clonales supérieures à 20% (limite de détection du pipeline De Novo). Toutes les anomalies identifiées en RVA avec une VAF supérieure à 15% ont également été détectées par le pipeline De Novo. Sur les 25 échantillons, une seule anomalie sous-clonale (VAF=10%), $der(3)t(3;6)(q26.32;p21.1)$, n'a pas été identifiée pour LIM32. A l'inverse, la trisomie 2 sous-clonale (VAF<10%) de LIM17 a également été identifiée par le pipeline De Novo. Selon notre étude, nous estimons que le pipeline De Novo est sensible à partir d'une VAF de 15%, valeur inférieure à celle donnée par le fournisseur (20%).

V.4.4.1. Analyse de la région PAR1

Le pipeline De Novo est recommandé pour l'analyse de la région *PAR1* dans les LAL-B afin de détecter des délétions ou réarrangements de *CRLF2*, non visualisables par le pipeline RVA. En effet, *PAR1* est l'une des deux régions d'homologie stricte (l'autre étant *PAR2*) présentes à l'extrémité des gonosomes humains (chromosomes X et Y). *PAR1*, d'une taille de 2.7Mb, est localisé à l'extrémité des bras courts. L'homologie stricte de cette région entre les deux chromosomes entraîne, pour le pipeline RVA, une difficulté d'alignement en plus de la mauvaise couverture des régions télomériques. Le fonctionnement différent du pipeline De Novo, en faisant un assemblage complet du génome, permet une meilleure couverture des télomères et un meilleur alignement.

Afin de vérifier la pertinence du pipeline De Novo, nous avons réalisé une visualisation manuelle de la région *PAR1* avec le Genome browser pour les échantillons de LAL-B où le pipeline De Novo a été effectué (n=24). Comme attendu, nous avons confirmé l'absence de couverture et d'alignement au niveau de la région *PAR1* (notamment des gènes *CRLF2* et *P2RY8*) avec le pipeline RVA, que ce soit avec les génomes de référence Hg19 ou Hg38 (Figure 35A). Cette région était en revanche couverte et alignée correctement avec le pipeline De Novo dans tous les cas. Le génome de référence Hg38 permet également d'augmenter la couverture et l'alignement (Figure 35B). Sur ces 24 échantillons, une seule délétion de *CRLF2* (pour LIM37) a été détectée. Elle sera illustrée dans la partie des résultats relative à la détection des anomalies secondaires des LAL-B (Figure 49, page 126).

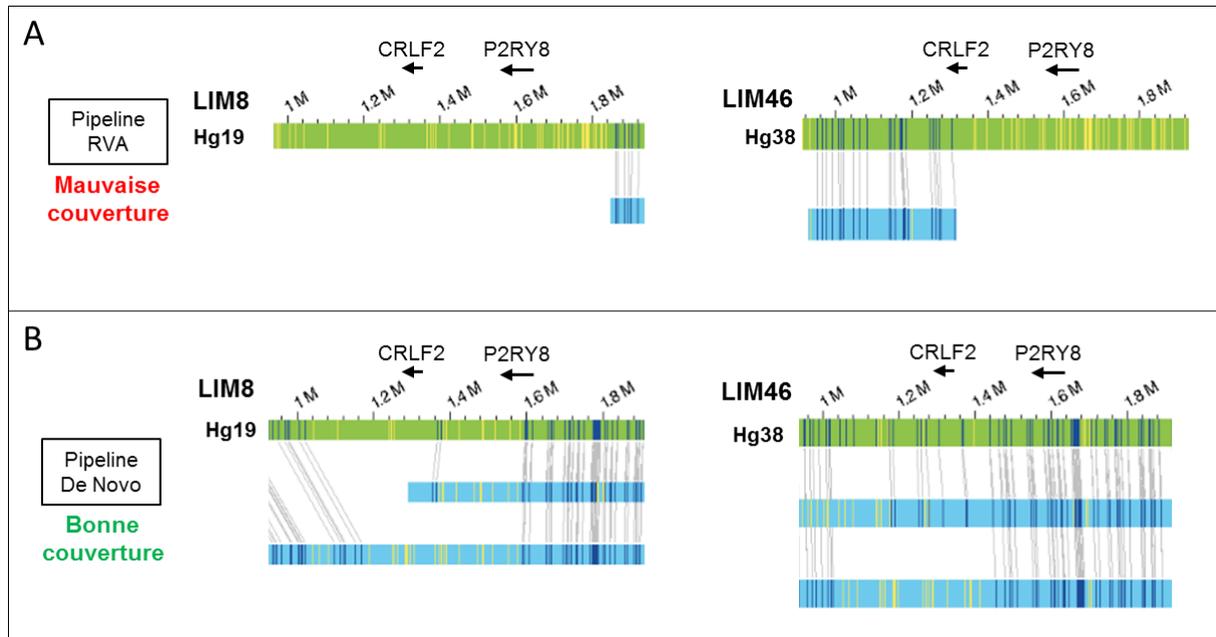


Figure 35 : Couverture de la région *PAR1* en fonction des pipelines.

A : Mauvaise couverture avec le pipeline RVA et les génomes de référence Hg19 ou Hg38. **B** : Bonne couverture de la région *PAR1* avec le pipeline De Novo. Le génome de référence Hg38 permet d'obtenir une couverture et un alignement meilleur par rapport au génome de référence Hg19.

V.4.4.2. Analyse du niveau de ploïdie

Le pipeline De Novo est également utile pour l'identification des génomes avec une modification du niveau de ploïdie (para-haploïde $n\pm$, para-triploïde $3n\pm$ et para-tétraploïdie $4n\pm$). Les deux pipelines, RVA et De Novo, font une **normalisation automatique du niveau de ploïdie à 2n** (diploïdie). Les aneuploïdies sont ensuite annotées par rapport à cette normalisation. Il n'est donc pas possible avec le profil CNV d'identifier un caryotype non diploïde. Cependant, deux paramètres uniquement présents sur le pipeline De Novo, grâce à l'assemblage complet du génome, peuvent permettre d'identifier une modification de la ploïdie :

- **La moyenne des VAF** : La majorité des SV détectés par OGM est d'origine constitutionnelle et ils sont masqués par le filtre « % control database ». Cependant, les VAF de tous ces SV vont tout de même être utilisées en étant compilées pour chaque chromosome sur la vue Whole genome. Un trait rose représentera la moyenne des VAF pour chaque chromosome.

- **La perte d'hétérozygotie (LOH, loss of heterozygosity)** : A l'exception des chromosomes sexuels, le génome est constitué normalement de deux copies différentes de chaque chromosome provenant des deux parents. Les pertes d'hétérozygoties correspondent à la perte d'une des deux copies que ce soit sur une petite région ou bien pour un chromosome entier. Les SV détectés par OGM sont donc normalement hétérozygotes. A la suite d'une délétion, les SV présents sur la copie restante seront donc homozygotes. Le pipeline De Novo détecte les pertes d'hétérozygoties (affichées en jaune) avec fiabilité, selon le fournisseur, si elles concernent une région d'une taille supérieure à 25Mb et si la perte de copie (délétion/monosomie) est fortement présente (VAF>25%).

Ces deux paramètres ne sont pas analysés pour les chromosomes sexuels.

Pour un génomme diploïde (et para-diploïde $2n \pm$), les SV fréquents auront une VAF de 50% car présents sur un chromosome sur deux. On observera donc un **trait à 50% pour la VAF et aucune LOH**. En cas de perte ou gain d'un chromosome entier ou d'une grande région chromosomique, les observations pour la VAF et la LOH (si les conditions le permettent) seront les suivantes (Figure 36) :

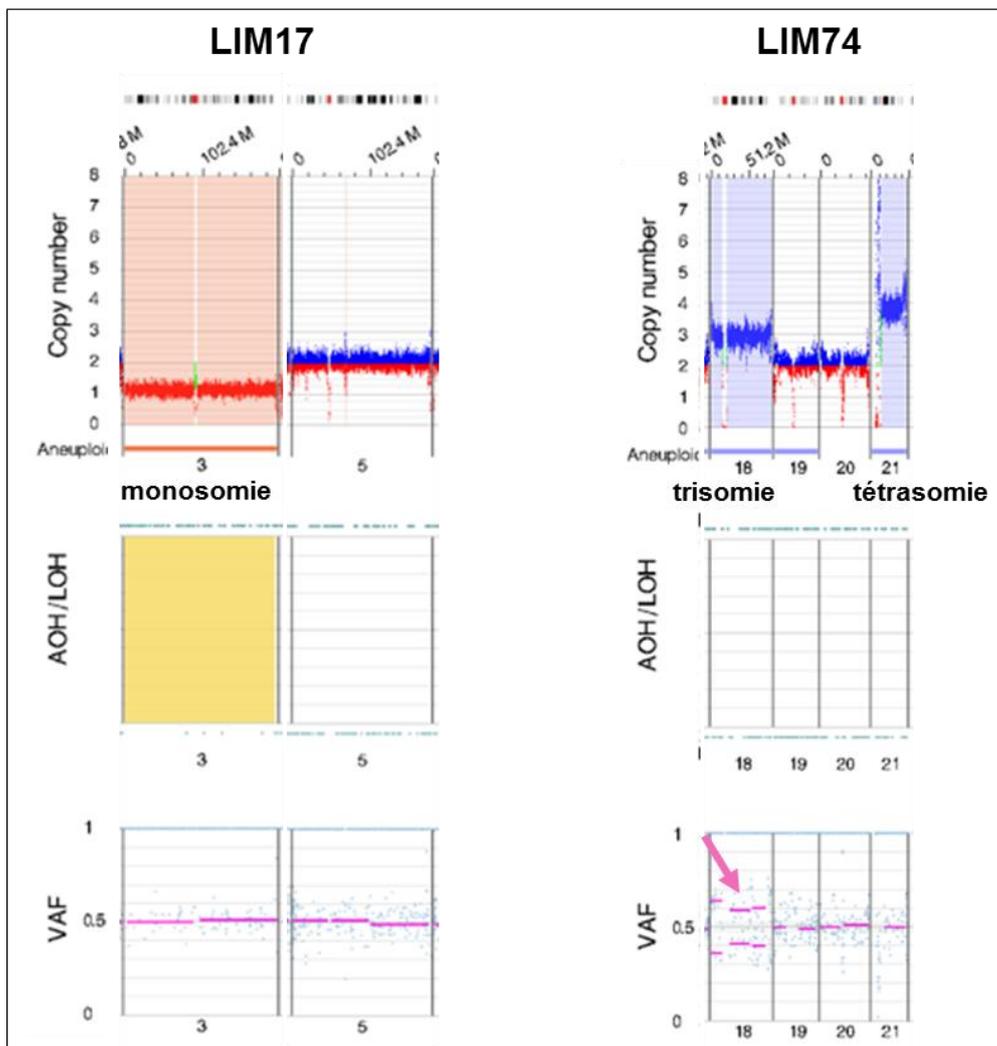


Figure 36 : VAF et LOH dans le cadre d'aneuploïdies pour un génome para-diploïde.

La moyenne des VAF des SV est de 50% pour un nombre de copies de 2 ou 4 (tétrasomie). LIM 74 : on observe une séparation avec deux lignes (environ 33% et 66%) dans le cadre d'une trisomie (flèche rose). LIM17 : une perte d'hétérozygotie (LOH) est détectée dans le cadre d'une monosomie.

- Présence d'une seule copie (**monosomie**) : Les SV présents sur cette région seront détectés comme étant homozygotes et une **LOH sera détectée**. La VAF des SV présents sur le chromosome en une seule copie sera de 100%. Cependant, en fonction de la proportion d'ADN normal restant avec deux copies pour ce chromosome, quelques SV seront toujours détectés à des VAF de 50%. Le pipeline n'affichera jamais une moyenne de VAF à 100% mais l'affichera à 50% si le nombre de SV restants à cette VAF est suffisant. On pourra cependant observer un nombre réduit de points sur le profil pour la région concernée puisque moins de SV seront détectés (Figure 36, LIM17).

- Présence de trois copies (**trisomie**) : Les SV détectés seront présents soit sur deux allèles soit sur un seul. On observa donc une **séparation avec deux lignes de VAF différentes autour de 33% et 66%**. Ces pourcentages sont variables en fonction de la proportion d'ADN comportant les trois copies. Les SV n'étant pas homozygotes, **aucune LOH** ne sera détectée (Figure 36, LIM74). On observera également une séparation de la VAF avec la présence de 5 copies mais avec des VAF autour de 20% et 80% (pourcentages également variables).

- Présence de quatre copies (**tétrasomie**) : Les tétrasomies sont dues à la duplication des deux copies initiales. La moyenne des VAF restera donc à 50% et il n'y aura pas de LOH (Figure 36, LIM74).

Ces observations sont particulièrement utiles lorsque le niveau de ploïdie est modifié. En effet, le profil CNV sera normalisé à $2n$ et le nombre de copies ne correspondra plus à la réalité. Un seul échantillon de notre série était concerné : **LIM95**. Une suspicion de génome « para-tétraploïde », à $4n_{\pm}$, avait été faite par le caryotype et la FISH pour cette LAL-T. L'infiltration étant suffisante (81% de blastes), le pipeline De Novo a été réalisé pour cet échantillon. L'OGM a détecté de nombreux réarrangements complexes pour cet échantillon ainsi que de nombreux CNV, principalement des pertes. Une seule LOH était détectée au niveau de la région 5p sans perte associée. Probablement du fait de la complexité génomique de cet échantillon, les profils des moyennes de VAF étaient difficilement interprétables pour plusieurs chromosomes. Lorsqu'il était interprétable, il était incompatible avec un génome para-triploïde et peu compatible avec un génome para-diploïde. A l'inverse, nous n'avons pas mis en évidence d'incompatibilité franche avec un génome para-tétraploïde (Annexe 5). Le nombre de signaux obtenus pour les 4 FISH réalisées était concordant avec le profil CNV en prenant l'hypothèse de la normalisation des tétrasomies à $2n$ (Figure 37). La para-tétraploïdie a donc été considérée comme probable.

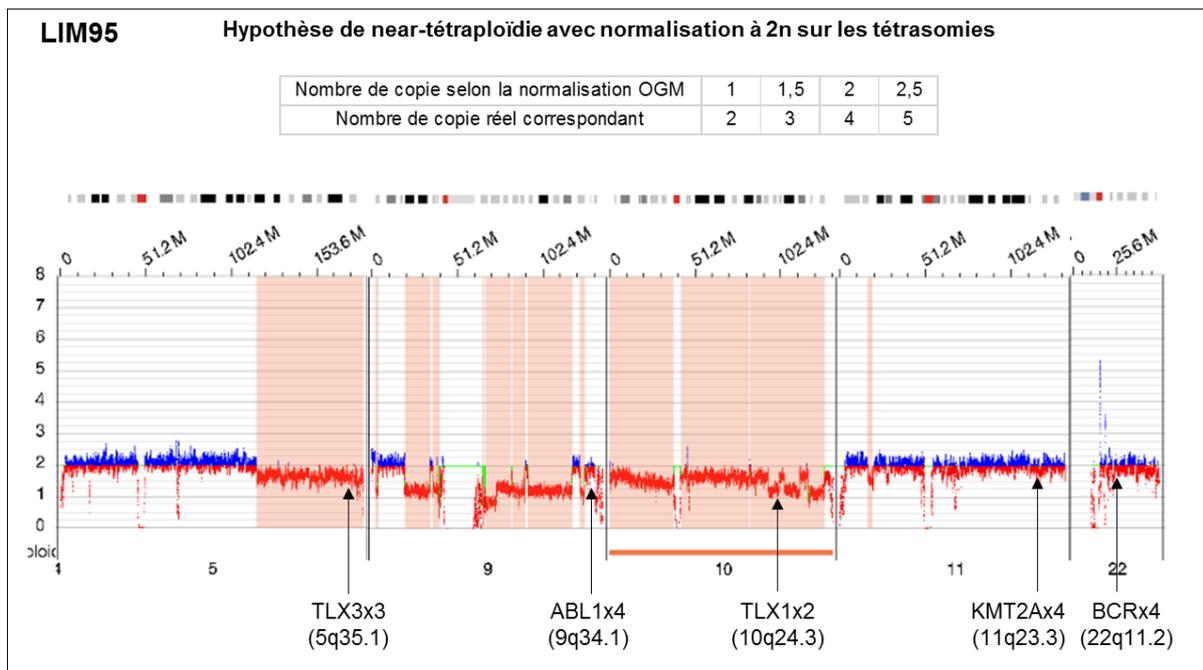


Figure 37 : Normalisation à 2n d'un génome para-tétraploïde pour LIM95.

Selon notre hypothèse de génome para-tétraploïde, l'OGM a fait une normalisation du nombre de copies pour le profil CNV par rapport aux tétraploïdies. Les nombres de copies réels correspondent donc au double de ceux indiqués par OGM. Cette hypothèse a été confirmée par les 5 sondes FISH réalisées pour cet échantillon retrouvant un nombre de signaux concordant avec le nombre de copies réel supposé.

De plus, les LOH sont également utiles pour **identifier la duplication d'un génome**, mécanisme fréquent dans les LAL hypodiploïdes. Un cas de notre série (**LIM69**) était une LAL pour laquelle nous avons identifié un caryotype para-triploïde correspondant à la duplication du clone hypodiploïde initial : 67,XXY,+Y,+1,-2,-3,-4,+6,-7,+8,-9,+10,-12,-13,-15,-16,-17,+18,+19,-20,+21,+22[3]/46,XY[18]. En OGM, malgré un nombre modal de chromosomes à 67, le génome a faussement été considéré comme para-diploïde par les pipelines mais cela a permis une normalisation adaptée. Le profil CNV obtenu par OGM (pipelines RVA et De Novo) correspondait donc au caryotype avec l'identification identique des trisomies et tétrasomies. Les clones hypodiploïdes dupliqués ont un profil de gain chromosomique particulier différent des cas hyperdiploïdes et avec majoritairement des tétrasomies. Pour cet échantillon, l'analyse OGM aurait donc permis de faire la distinction entre une hyperdiploïdie (de bon pronostic) et l'entité Ho/Tr (de mauvais pronostic). Concernant le pipeline De Novo, le profil des moyennes des VAF n'était pas informatif. En revanche, des LOH partielles de tailles supérieures à 25Mb ont été détectées pour la majorité des chromosomes ayant un nombre de copies à 2 (chromosomes 2, 3, 4, 9, 12, 13, 15, 20). En abaissant le filtre de taille à 5Mb, des LOH partielles étaient alors aussi détectées pour les trois autres chromosomes avec un nombre de copies à 2 (chromosomes 7, 16 et 17). Aucune autre LOH (même >5Mb) n'était détectée pour les chromosomes ayant un nombre de copies supérieur à 2. Cela permet d'identifier que le génome n'est pas réellement para-diploïde et de suspecter un génome hypodiploïde dupliqué. En effet, les chromosomes avec un nombre de copies à 2 correspondent initialement à des monosomies pour lesquelles des LOH auraient été détectées. La duplication ne modifie pas l'homozygotie des SV présents sur ces chromosomes et il est donc normal que des LOH aient été détectées. Il est également normal qu'aucune LOH

n'ait été détectée pour les tétrasomies puisqu'elles correspondent initialement à des paires chromosomiques normales (Figure 38). Au final, l'analyse de la ploïdie par OGM était concordante avec le caryotype.

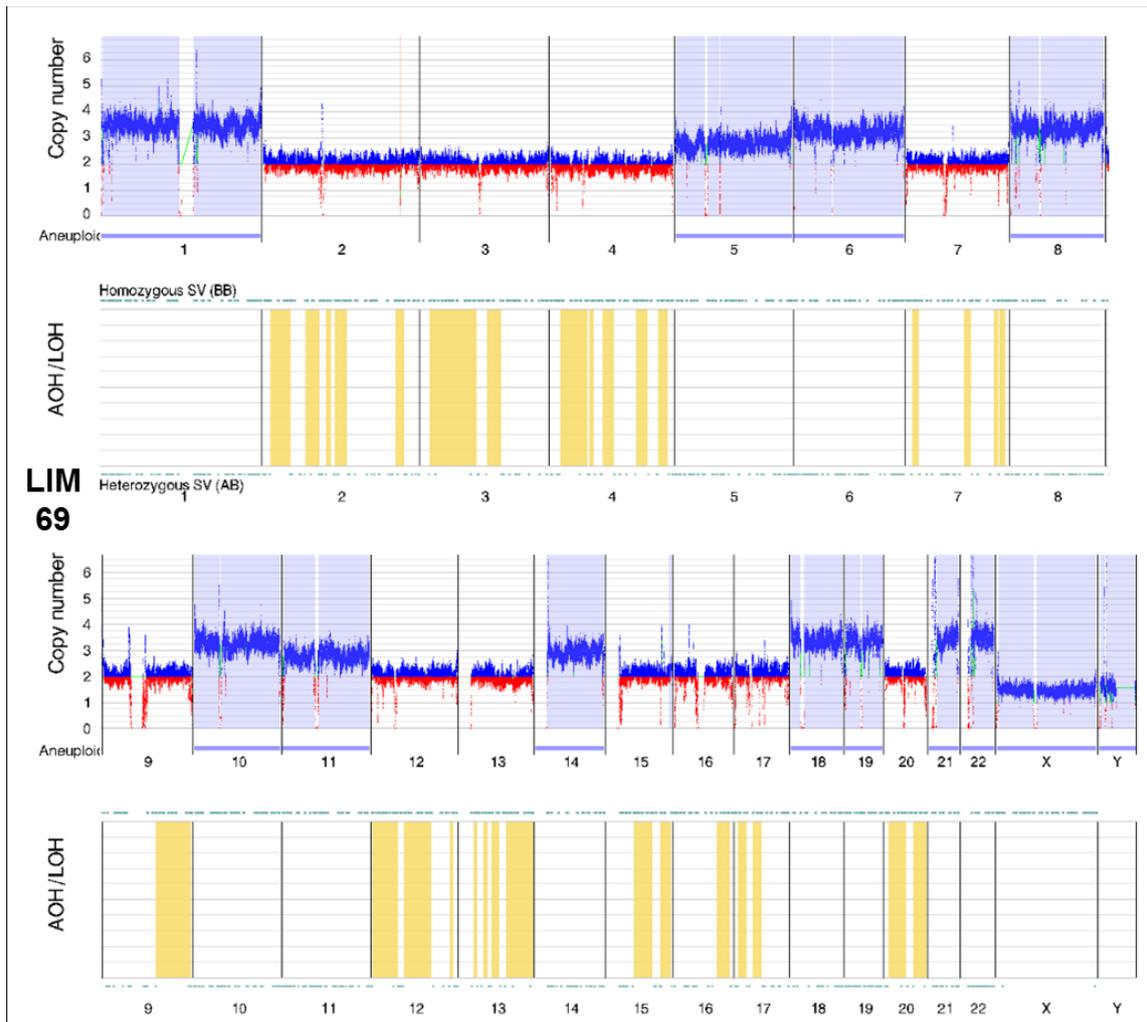


Figure 38 : Détection de LOH avec le pipeline De Novo dans le cadre d'un clone hypodiploïde dupliqué.

Les profil CNV et LOH sont divisés en deux parties avec les chromosomes 1 à 8 au-dessus et les chromosomes 9 à Y au-dessous. Le profil CNV identifie des trisomies (5, 11 et 14) et des tétrasomies (1, 6, 8, 10, 18, 19, 21 et 22). Des LOH partielles sont détectées (surbrillance jaune) pour tous les chromosomes ayant un nombre de copies à 2, avec une taille >25Mb pour les chromosomes 2, 3, 4, 9, 12, 13, 15 et 20) ou >5Mb pour les chromosomes 7, 16 et 17. Cela permet de suspecter une duplication d'un clone initialement hypodiploïde avec des monosomies et donc logiquement des pertes d'hétérozygoties.

V.4.5. Pourcentage par rapport à la population de référence

Pour chaque anomalie détectée, sa fréquence dans la population de référence (allant de 0 à 100%) va faire partie des annotations effectuées par le pipeline bio-informatique. Le réglage du filtre « **% control database** » permet de visualiser uniquement les anomalies présentes à un pourcentage inférieur ou égal au pourcentage fixé par le réglage. Il est fixé à 100% par défaut selon les réglages du fournisseur. Nous avons choisi de régler ce filtre, dans un premier temps, à 0% afin de masquer les anomalies non rares.

Nous n'avons pas mis en évidence d'absence de détection d'une anomalie par OGM avec ce réglage par rapport aux résultats des autres techniques. Cependant, pour LIM68, une délétion intragénique de *IKZF1* était visualisée uniquement avec le pipeline De Novo. Les critères de confiance (0.99), VAF (46%) et nombre de molécules (n=29) étaient en faveur d'un vrai positif (Figure 39A). Nous avons alors modifié différents filtres pour essayer de visualiser cette délétion avec le pipeline RVA. Il s'est avéré que cette délétion était bien détectée mais masquée à cause du réglage du filtre « % control database ». En effet, le pipeline RVA annotait cette délétion comme présente dans 0.6% de la population de référence (Figure 39B).

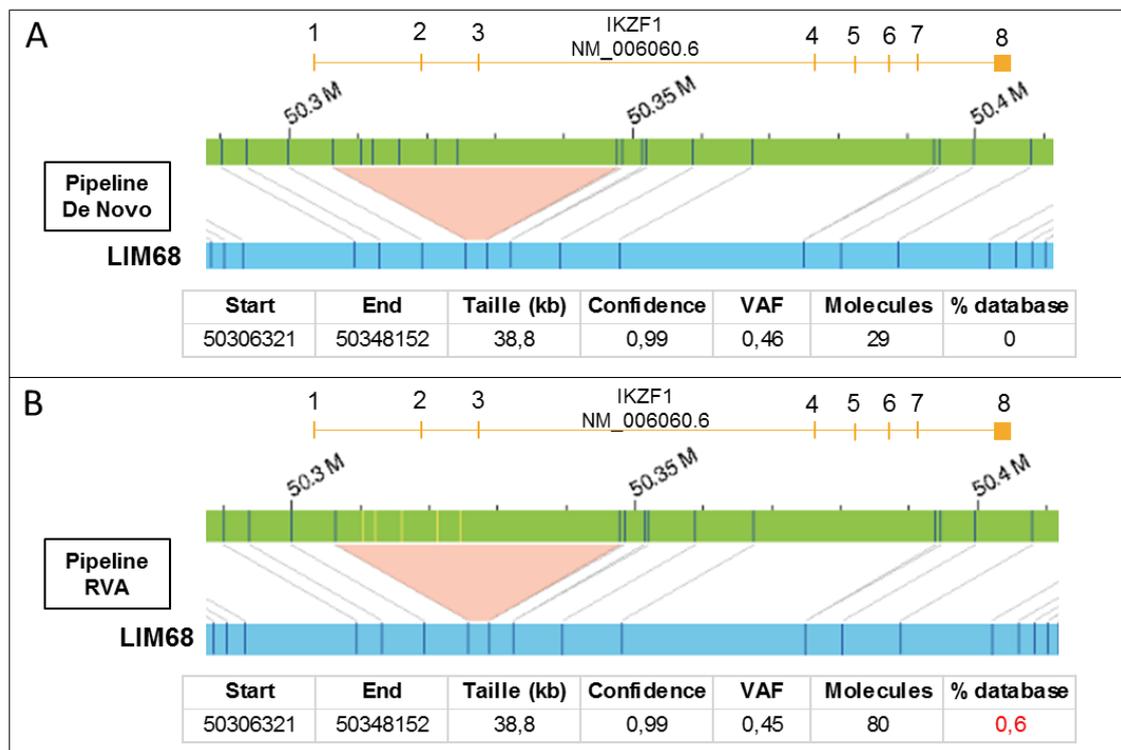


Figure 39 : Impact du filtre « % control database » sur la détection d'une délétion *IKZF1*.

La délétion *IKZF1* intragénique est identifiée comme étant absente de la population contrôle avec le pipeline De Novo (A) mais présente dans 0,6% avec le pipeline RVA (B). Les points de cassure inhabituels dans le gène, avec une délétion supposée des exons 2 et 3, n'ont pas permis la détection de la délétion par PCR multiplex.

Les points de cassure de la délétion, d'après la visualisation sur le Genome browser, sont localisés avant l'exon 2 et après l'exon 3 (Figure 38). Il y a donc délétion des exons 2 et 3. La technique de PCR multiplex permettant la recherche des délétions intragéniques *IKZF1* a été réalisée pour cet échantillon et n'a pas détecté de délétion intragénique. Cependant, cette technique ne recherche que les points de cassure les plus fréquents correspondant à des délétions des exons 4 à 7, 2 à 7 et 4 à 8 (218). Les points de cassure inhabituels de cette délétion détectée par OGM ne permettent donc pas sa détection par PCR multiplex avec les amorces utilisées. La comparaison des résultats d'OGM et de PCR multiplex pour la détection des délétions intragéniques *IKZF1*, réalisée dans une partie ultérieure des résultats (page 127), a montré une sensibilité et une spécificité de 100%. Nous avons donc considéré que cette délétion était un vrai positif.

Tous les échantillons ont été réanalysés avec un réglage du filtre « % control database » à 1% et aucune autre anomalie pertinente n'a été détectée. Cela n'ayant que très peu augmenté le

nombre d'anomalies visibles à interpréter, nous avons choisi de **modifié de façon permanente le réglage à 1% du filtre « % control database »** afin de limiter le risque de faux négatif.

V.5. Comparaison de l'OGM aux techniques conventionnelles et additionnelles

Deux tableaux récapitulatifs des résultats obtenus par les techniques conventionnelles, additionnelles et par OGM sont en Annexe 6 pour les LAL-B et Annexe 7 pour les LAL-T.

Le caryotype et la FISH ont été réalisés pour tous les échantillons à l'exception de LIM42, soit pour 33 échantillons sur 34. Concernant LIM42, s'agissant d'une rechute, les résultats obtenus au diagnostic ont été utilisés pour comparaison.

La RT-MLPA ou RT-qPCR ont été réalisées pour 31 échantillons sur 34. Les trois exceptions concernaient : LIM30 car non indiqué en suivi, LIM45 car non indiqué du fait du mauvais diagnostic et LIM143 car réalisé dans un autre laboratoire suite au transfert du patient.

V.5.1. Faisabilité des techniques et taux d'échec

Nous avons comparé la faisabilité des techniques conventionnelles (caryotype, FISH, RT-MLPA et RT-qPCR) et de l'OGM.

L'obtention de résultats, informatifs ou non, dépend des contraintes dues aux différentes techniques : i) culture et index prolifératif pour la cytogénétique conventionnelle ; ii) quantité et qualité de l'ADN ou de l'ARN pour l'OGM et la RT-MLPA/RT-qPCR respectivement. Ces contraintes peuvent être à l'origine d'échecs par absence totale de résultat.

Sur les 34 échantillons inclus dans l'étude, l'analyse OGM n'a pas pu être réalisée pour deux échantillons (LIM93 et LIM101) à cause d'une qualité et d'une quantité insuffisante s d'ADN après extraction et marquage. Le **taux d'échec** par absence totale de résultat dans cette étude est donc **estimé à 6% pour l'OGM**. La présence de ces échecs est corrélée à la richesse initiale du prélèvement puisque le seuil de 1,5 millions de cellules requises n'avait pu être atteint pour ces deux échantillons. La richesse du prélèvement a également impacté le caryotype puisque peu de mitoses ont été obtenues (4 au total dont 50% de clonales) pour LIM101 et très peu de mitoses clonales étaient présentes pour LIM93 (1 seule sur 20 analysées soit 5%).

Le caryotype et la FISH ont été réalisés pour tous les échantillons à l'exception d'un cas (LIM42) en échec d'aspiration médullaire. Le caryotype a permis d'obtenir des métaphases, clonales ou non, pour 31 échantillons sur les 33 restants. Le **taux d'échec** par absence totale de résultat dans cette étude est donc **estimé à 9% pour le caryotype**. De plus, moins de 10 métaphases ont été obtenues dans 12% des échantillons. La FISH a cependant permis d'obtenir des résultats partiels et ciblés pour les deux échantillons en échec au caryotype (LIM54 et LIM95). Le taux d'échec en prenant en compte le caryotype et la FISH est de 3%. Il est à noter que des résultats ont pu être obtenus par l'OGM pour ces deux échantillons mais également pour LIM42 en utilisant un prélèvement sanguin (infiltré par 10% de blastes) à la place de la moelle inaspirable.

Avec la **RT-MLPA**, des résultats ont été obtenus pour tous les échantillons (n=27) avec donc un **taux d'échec à 0%**. A noter que la RT-MLPA n'a été réalisée que pour un des deux échantillons avec un échec en OGM (LIM101). Sur les 7 échantillons de LAL -B pour lesquels la **RT-qPCR** a été réalisée, un échec a été obtenu pour LIM93 (également en échec en OGM) avec au total un **taux d'échec de 14%**.

Le taux d'échec, du aux conditions pré-analytiques, de l'OGM est donc très légèrement inférieur à celui du caryotype (6% contre 9%). Les deux techniques sont complémentaires puisque des résultats ont été obtenus par une technique en cas d'échec de l'autre. De plus, la FISH permet également d'obtenir des résultats, bien que ciblés, en cas d'échec. En revanche, le taux d'échec de l'OGM est supérieur à celui de la RT-MLPA (6% contre 0%), technique moins contraignante vis-à-vis de la qualité du prélèvement initial.

V.5.2. Sensibilité pour la détection d'anomalies récurrentes et pronostiques

V.5.2.1. Détection des anomalies primaires des LAL-B

Pour les échantillons de LAL-B, en excluant LIM93 dont l'analyse OGM n'a pu être réalisée, l'OGM a détecté toutes les anomalies primaires ayant également été identifiées (totalement ou partiellement) par au moins une autre technique (Figure 40), soit dans 24 cas sur 27.

Pour LIM57, LIM68 et LIM116, ni l'OGM ni les autres techniques n'ont mis en évidence une anomalie primaire. La sensibilité de l'OGM dans ce cadre est donc de 100% avec une concordance totale des résultats.

Anomalie primaire	IGH::CEBPA	ETV6::RUNX1	Hypondiploïdie	BCR::ABL1	IGL::MYC	Hypondiploïdie	ETV6::MGA14C	Hypondiploïdie	IGH::CEBPD	BCR::ABL1	BCR::ABL1	KMT2A::MLL1	Hypondiploïdie	Indéterminé	Indéterminé	Ho-TT	Hypondiploïdie	Hypondiploïdie	BCR::ABL1	BCR::ABL1	Hypondiploïdie	BCR::ABL1	Hypondiploïdie	ZNF384::EP300	BCR::ABL1	DUX4+r	Hypondiploïdie	TCF3::PBX1
Type d'anomalie																												
ID	8	9	14	17	25	30	32	34	35	37	42	45	46	57	68	69	70	74	87	91	92	93	102	104	107	116	139	143
Caryotype																												
FISH																												
RT-MLPA/RT-qPCR																												
RNAseq																												
OGM																												

Détection totale
 Détection partielle
 Non détecté
 Echec technique
 * Réalisé à posteriori
 Réarrangement
 Hyper/Hypodiploïdie
 Indéterminé

Figure 40 : Détection des anomalies primaires des LAL-B par les différentes techniques utilisées.

Pour les 3 échantillons où la détection de l'anomalie primaire était partielle par les techniques conventionnelles, **l'OGM a obtenu une détection totale et précise** de l'anomalie :

- LIM30 (Figure 41A) : Cet échantillon correspondait à un prélèvement de suivi. Au diagnostic (LIM14), l'anomalie primaire identifiée était une hypodiploïdie. Le clone hypodiploïde n'a pas été retrouvé au caryotype au suivi mais une sonde FISH réalisée (*KMT2A*) était compatible avec sa persistance. L'analyse OGM retrouvait bien le clone hypodiploïde comme identifié sur l'échantillon du diagnostic mais à faible VAF (5%).

- LIM8 (Figure 41B) : Une translocation équilibrée entre les chromosomes 14 et 19 était identifiée au caryotype avec une suspicion de réarrangement *IGH*. Trois partenaires récurrents sont localisés sur le chromosome 19 : *EPOR* (19p13.2) et *CEBPA/G* (19q13). La distinction entre ces partenaires n'était pas possible au caryotype. La FISH *IGH* (14q32.3) montrait une séparation des signaux 5' et 3' *IGH* sur 80% des noyaux ainsi qu'une délocalisation du signal 5' sur le dérivé 19. N'ayant pas au laboratoire de sondes FISH spécifiques *EPOR* ou

CEBPA/G, il n'était pas possible d'identifier avec certitude le partenaire de *IGH*. Nous avons tout de même réalisé d'autres sondes FISH pour préciser les points de cassure : *TCF3* (19p13.3) et *ELL* (19p13.11) qui encadrent la localisation de *EPOR* ainsi que *BCL3* (19q13.32). Les signaux *TCF3* et *ELL* étaient présents sur le dérivé 19. Cela permettait d'exclure *EPOR* en tant que partenaire. Le signal *ELL* était délocalisé sur le dérivé 14, ce qui était compatible avec l'un des gènes *CEBP* comme partenaire sans pouvoir l'affirmer. L'analyse OGM a détecté une translocation, t(14;19)(q32.33;q13.11), et a permis d'identifier précisément un réarrangement *IGH::CEBPA*, également identifié en RNAseq.

- LIM35 (Figure 41C) : Une translocation équilibrée entre les chromosomes 8 et 14, t(8;14)(q11;q32), était identifiée sur le caryotype de cet échantillon (rechute) et également au diagnostic. Ces points de cassure faisaient suspecter un réarrangement entre *IGH* (14q32) et *CEBPG* (8q11). La FISH, réalisée au diagnostic et à la rechute, confirmait un réarrangement *IGH* avec délocalisation d'un signal sur un chromosome 8. Cependant, en l'absence de sonde *CEBPD* au laboratoire, il n'était pas possible de confirmer avec certitude le partenaire bien que très probable. De plus, les réarrangements *IGH* ne font pas partis de ceux recherchés en RT-MLPA et une analyse en RNAseq n'avait pas été effectuée pour ce cas. L'analyse OGM a détecté une translocation, t(8;14)(q11.21;q32.33), et a permis d'identifier précisément un réarrangement *IGH::CEBPD*.

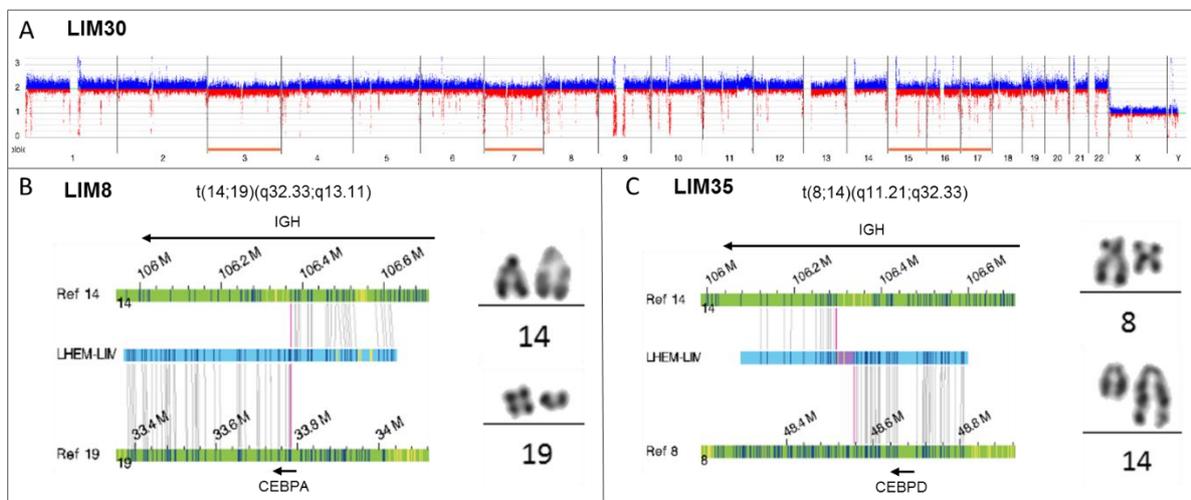


Figure 41 : Précision par l'OGM des anomalies primaires partiellement détectées.

A : Le clone hypodiploïde, non retrouvé au caryotype et partiellement détecté en FISH, était détecté à faible VAF (5%) par OGM avec des monosomies 5, 7, 15, 16 et 17. Ce profil correspondait à celui identifié au diagnostic pour ce patient. **B** : L'OGM a permis de préciser les points de cassure de la t(14;19) identifiée en cytogénétique et de confirmer le partenaire de *IGH* suspecté avec un réarrangement *IGH::CEBPA*. **C** : L'OGM a confirmé les points de cassure de la t(8;14) identifiée en cytogénétique ainsi que le partenaire de *IGH* suspecté avec un réarrangement *IGH::CEBPD*.

De plus, l'OGM a permis la **mise en évidence ou la suspicion d'une anomalie primaire**, non identifiée précédemment par les techniques conventionnelles, pour 3 échantillons :

- LIM32 : Identification par OGM d'une inversion péricentrique, inv(12)(p11q21), entraînant la fusion *ETV6::MGAT4C*. Cette inversion était associée à une délétion de 20Mb, del(12)(p13p11), entraînant la perte de la partie 3' *ETV6* (Figure 42A). Malgré la délétion, ce réarrangement déséquilibré était cryptique au caryotype. De plus, la sonde FISH *ETV6/RUNX1* (Figure 42B) réalisée de façon systématique n'était pas informative à cause de

la taille et la localisation de la sonde pour deux raisons : i) la délétion de la partie 3' *ETV6* ne permettait pas la visualisation d'une délocalisation d'un signal ; ii) à l'inverse, la taille importante (611kb) de la sonde ne permettait pas la visualisation d'un signal diminué par rapport au signal normal. L'analyse RNAseq additionnelle avait également identifié un transcrite de fusion *ETV6::MGAT4C*, rendu de signification incertaine à cause d'un faible nombre de lecture. Cela peut s'expliquer par la délétion qui complexifie la détection du transcrite par séquençage. En revanche, l'OGM a détecté la fusion avec une VAF de 30% et une bonne profondeur (94 molécules). La confirmation de ce transcrite par OGM est importante puisqu'elle permet la stratification pronostique adaptée de la LAL-B en la classant dans le groupe *ETV6::RUNX1*-like. A noter que ce cas correspondait à une rechute et que le RNAseq n'avait pas été réalisé au diagnostic. Une sonde FISH ciblant uniquement *ETV6* (Figure 42C), et donc adaptée à la détection d'une perte d'un signal, a été réalisée à postériori et a confirmé la perte du signal 3' sur 48% des noyaux analysés.

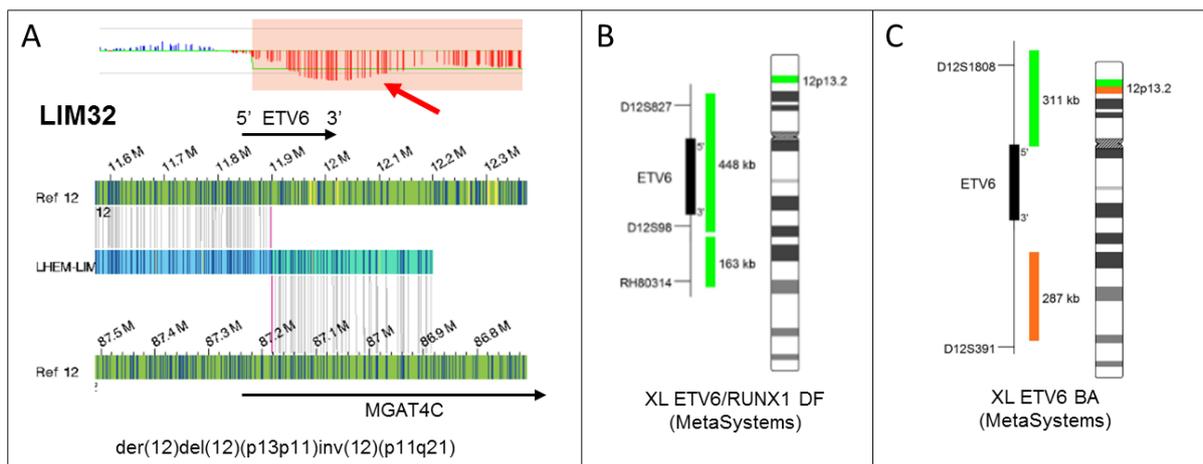


Figure 42 : Identification par OGM d'un transcrite *ETV6::MGAT4C*.

A : L'analyse OGM a détecté une inversion, *inv(12)(p11q21)*, entraînant la fusion *ETV6::MGAT4C* ainsi qu'une délétion, *del(12)(p13p11)*, entraînant la perte de la partie 3' *ETV6* (flèche rouge). **B :** Extrait du design de la sonde XL *ETV6/RUNX1 DF* (MetaSystems) qui n'est pas informative pour la détection d'une perte partielle *ETV6*. **C :** Design de la sonde XL *ETV6 BA* (MetaSystems) adapté à la détection d'une perte 5' ou 3' *ETV6*.

- LIM45 (Figure 43A) : Identification par OGM d'un réarrangement *KMT2A (KMT2A::MLLT1)*. Il correspond à la translocation *t(11;19)(q23.3;p13.3)* difficilement visible au caryotype. Normalement, une FISH *KMT2A* est toujours réalisée pour rechercher les réarrangements de *KMT2A* car souvent cryptiques et avec de multiples partenaires. Cependant, le diagnostic supposé de ce patient était un lymphome B diffus à grandes cellules (DLBCL) et la sonde *KMT2A* n'était donc pas indiquée. Elle a été réalisée à postériori et a confirmé le réarrangement. L'OGM a donc permis le reclassement en LAL-B.

- LIM116 (Figure 43B) : Aucune anomalie primaire n'avait été mise en évidence avec les techniques conventionnelles et additionnelles pour ce cas. L'OGM a détecté une délétion intragénique de *ERG*, *del(21)(q22.2q22.2)*, d'environ 50kb. A noter que la PCR multiplex permettant la recherche des délétions intragéniques *IKZF1* et *ERG* n'a été réalisée que pour *IKZF1* pour ce cas. Les délétions *ERG* sont des événements secondaires uniquement décrits, à ce jour, avec les réarrangements de *DUX4* dans les LAL-B. Les *DUX4-r* (avec *IGH* principalement) sont très difficilement détectables à cause de la toute petite taille du gène

DUX4 ainsi que sa localisation dans des régions très répétées et télomériques. Il était donc attendu de ne pas identifier de réarrangement avec l'OGM. Bien que l'anomalie primaire n'ait pas été détectée, l'OGM a permis de la supposer et une analyse RNAseq pour rechercher une surexpression de *DUX4* est en cours. Les *DUX4-r* étant de pronostic favorable, leur détection est importante pour une prise en charge adaptée du patient.

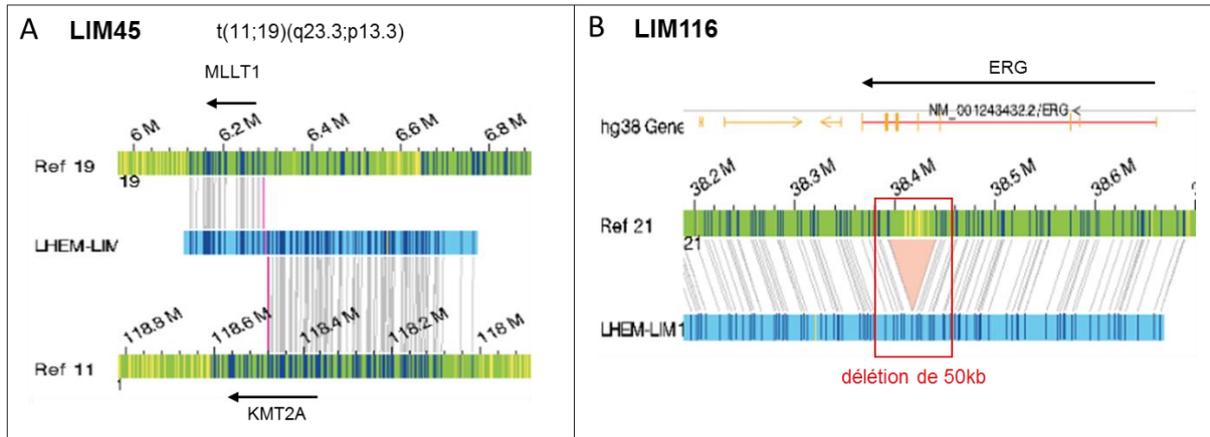


Figure 43 : Précision et identification de nouvelles anomalies primaires par OGM.

A : Identification par OGM d'un réarrangement *KMT2A::MLLT1*. **B** : Mise en évidence par OGM d'une délétion intragénique *ERG*, évènement secondaire fréquent dans les réarrangements de *DUX4*.

Les altérations de la ploïdie sont des anomalies primaires fréquentes des LAL-B. Pour les 10 échantillons concernés, nous avons **comparé les résultats de l'OGM, du caryotype**, ce dernier étant la technique de référence, et de la FISH quand nécessaire :

- LIM34, 46 et 69 : toutes les aneuploïdies détectées par OGM étaient concordantes à celles identifiées au caryotype qui retrouvait une hyperploïdie élevée (Annexe 6).
- LIM14 : 8 monosomies des chromosomes 3, 4, 7, 13, 15, 16, 17 et 18 ainsi que deux marqueurs avaient été identifiés au caryotype (Figure 44A). LA FISH retrouvait 3 copies de *KMT2A* (11q23) dont une sur un marqueur. L'OGM (Figure 44B) détectait 5 monosomies ainsi que des translocations déséquilibrées pour les chromosomes 4, 13 et 18 interprétées en $der(4)t(4;13)$ et $der(18)t(11;18)$. Après relecture du caryotype, ces deux dérivés étaient concordants avec les deux marqueurs.
- LIM30 : cet échantillon correspond au suivi de LIM14. Le caryotype ne retrouvait pas le clone hypodiploïde. En revanche, la FISH de *KMT2A* montrait la présence de 3 signaux sur 22% des noyaux. Les cellules clonales étaient donc toujours présentes mais non proliférantes. L'OGM retrouvait exactement les mêmes anomalies que sur l'échantillon du diagnostic mais à une VAF nettement inférieure (5% contre 45% au diagnostic, LIM14).
- LIM70 : Comme le caryotype, l'OGM retrouvait 6 trisomies mais avec une trisomie 6 à la place d'une trisomie 10. Après relecture du caryotype, la trisomie 10 a effectivement été reclassée en trisomie 6.
- LIM74 : Le caryotype retrouvait des trisomies (4, 6, 7, 8, 10, 14, et 20) une tétrasomie 21, un marqueur et des disomies des chromosomes X et Y. Des discordances étaient observées par OGM : pas de trisomie 7 et 20, tétrasomies 8 et 10, trisomie 18. Après relecture du caryotype, les trisomies 7, 20 et le marqueur ont été reclassés respectivement en tétrasomie 8, trisomie 20 et tétrasomie 10 en accord avec l'OGM.

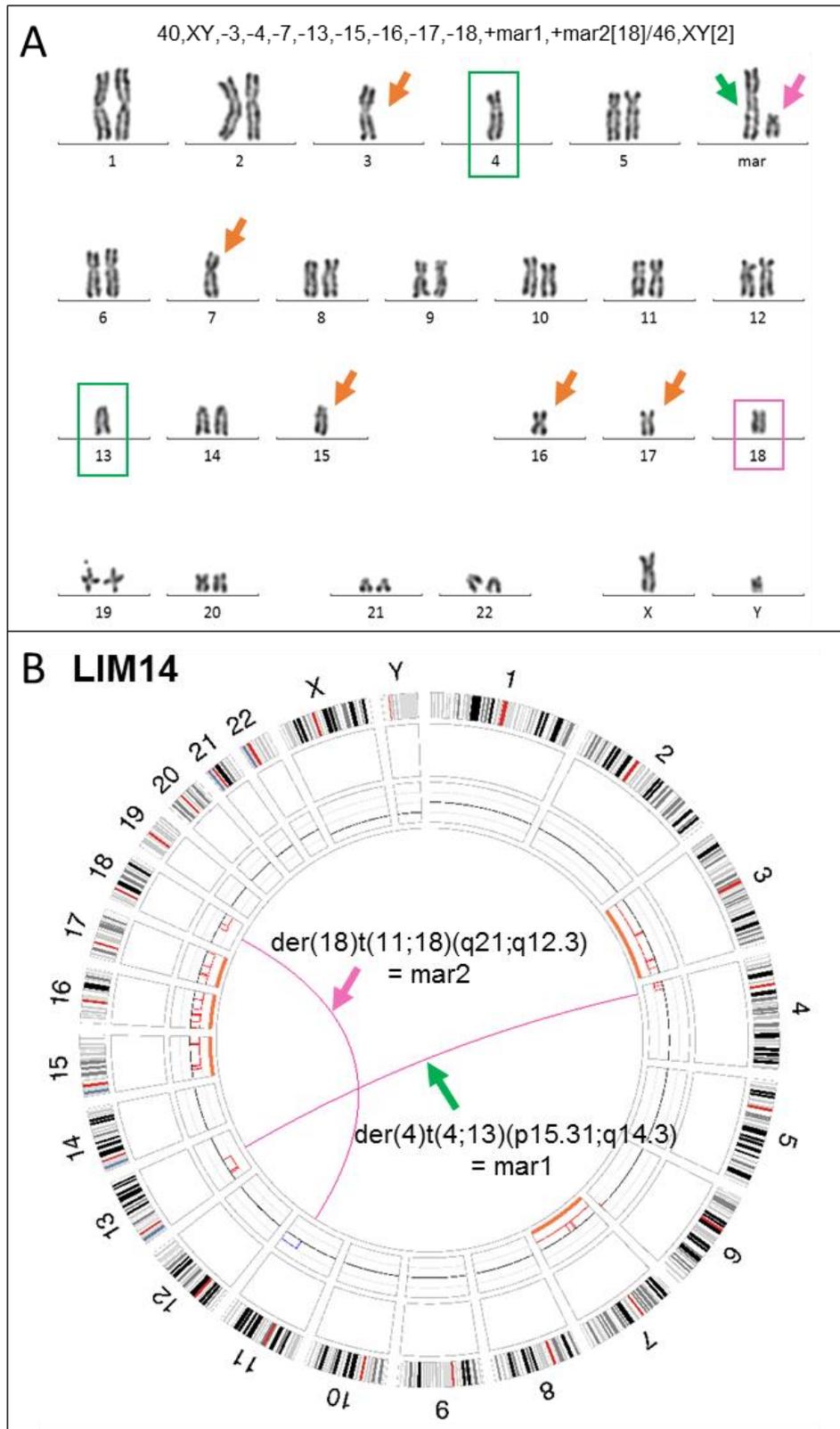


Figure 44 : Précision des aneuploïdies identifiées au caryotype (A) grâce à l'OGM (B) pour LIM14.

Les résultats OGM confirment les monosomies 3, 7, 15, 16 et 17 (flèche orange). A l'inverse, les monosomies 4 et 13 (rectangle vert) supposées au caryotype correspondent à des délétions 4p et 13q partielles avec un dérivé 4, der(4)t(4;13), initialement classé en marqueur (flèche verte). Un dérivé 18, der(18)t(11;18) (flèche rose), a également été identifié par OGM à la place de la monosomie 18 (rectangle rose).

- LIM92 : Le caryotype retrouvait des trisomies (X, 3, 5, 8, 10, 12, 14, 17, 18), une tétrasomie 21, une monosomie 9 et un marqueur. Les discordances suivantes étaient observées par OGM : gain quasi-total du 8 en plus d'une trisomie 8, pas de monosomie 9 mais perte totale 9p, trisomie partielle du 12 faisant partie d'une translocation déséquilibrée t(12;14) avec gain 14q en plus de la trisomie 14. Après relecture du caryotype et des résultats de FISH, les résultats OGM étaient concordants et la nomenclature du caryotype a été modifiée : le marqueur a été décrit comme un der(8)t(8;9) et le chromosome 12 supplémentaire comme un der(12)t(12;14).

- LIM102 : Une seule mitose clonale avait été obtenue et retrouvait des trisomies (4, 6, 10, 14, 17 et 21) et des disomies X et Y. Les résultats de FISH étaient concordants et ont apporté des informations additionnelles : 3 signaux *PBX1* (1q23) en faveur d'une trisomie 1, 3 signaux *RUNX1* (21q22) dans 27% des noyaux mais majoritairement (52%) 4 signaux en faveur d'une tétrasomie 21 prépondérante par rapport à une trisomie 21. L'OGM retrouvait toutes les trisomies et disomies identifiées sur l'unique mitose clonale. Le profil CNV était également en faveur d'une tétrasomie 21 comme la FISH. En revanche, une duplication, dup(1)(q21.1q42.12), de 80Mb était détectée à la place d'une trisomie 1. *PBX1* faisant partie de la région dupliquée, la présence de 3 signaux en FISH est concordante. De plus, un des deux chromosomes 1 sur la mitose était effectivement plus grand. Une trisomie 18 additionnelle était également détectée à la même confiance que les autres aneuploïdies. A noter qu'aucune des sondes FISH réalisées ne ciblait le chromosome 18. Du fait de la concordance générale du reste des résultats, la trisomie 8 a été interprétée comme vraie.

- LIM139 : Le caryotype avait identifié de multiples trisomies (4, 6, 10, 15, 17, 20) et tétrasomies (X et 21). Les discordances suivantes ont été observées par OGM : absence de trisomies 15 et 20, présence d'une trisomie 18 ainsi qu'un gain supplémentaire majeur du chromosome 18 faisant parti d'une translocation déséquilibrée t(8;16) avec gain 16q. Après relecture du caryotype, les trisomies 15 et 20 ont été reclassées en trisomie 18 et der(18)t(8;16).

Au final, les discordances d'aneuploïdies relevées par l'OGM ont toutes été validées après relecture du caryotype dont la qualité des métaphases ne permettait pas un classement correct ou l'identification des marqueurs.

La **distinction entre les trisomies et tétrasomies** a été réalisée correctement, pour les 7 échantillons concernés (34, 46, 69, 74, 92, 102, 139), grâce à l'estimation du nombre de copies de l'OGM proche de 3 ou 4 respectivement. La détection d'un nombre de copies précis a été possible grâce à la forte infiltration des prélèvements et donc des VAF élevées (entre 35 et 45%). A des VAF inférieures, la distinction entre les trisomies et tétrasomies par le nombre de copies estimé par l'OGM sera probablement plus complexe et la réalisation d'un caryotype pour comparaison sera nécessaire.

Cette distinction est particulièrement importante afin de faire la **différence entre l'entité génétique hyperdiploïdie élevée (HeH) et l'entité hypodiploïdie faible/para-triploïdie (Ho-Tr)** lorsque cette dernière est présente sous la forme dupliquée (para-triploïdie). En effet, ces deux entités ont des pronostics opposés, respectivement favorable et défavorable. Leur distinction n'est souvent pas possible avec le nombre modal de chromosomes qui pourra être identique dans les deux cas. En revanche, à l'inverse des HeH qui présentent surtout des trisomies, des tétrasomies seront principalement retrouvées pour la para-triploïdie à la suite de la duplication du clone hypodiploïde. Un seul cas de notre série, LIM69, avait un caryotype para-triploïde identifié sur seulement 3 métaphases clonales (Figure 45A). Les résultats de

FISH étaient en accord avec le caryotype. Toutes les aneuploïdies détectées par OGM étaient concordantes en considérant qu'un nombre de copies supérieur ou inférieur à 3,5 correspondait respectivement à des tétrasomies et trisomies (Figure 45B). Les trisomies et tétrasomies étant très importantes pour ce cas, le profil CNV aurait pu être faussé par une mauvaise normalisation. Dans ce cas, le pipeline De Novo aurait pu nous permettre de déterminer correctement les aneuploïdies grâce aux moyennes des VAF et aux LOH.

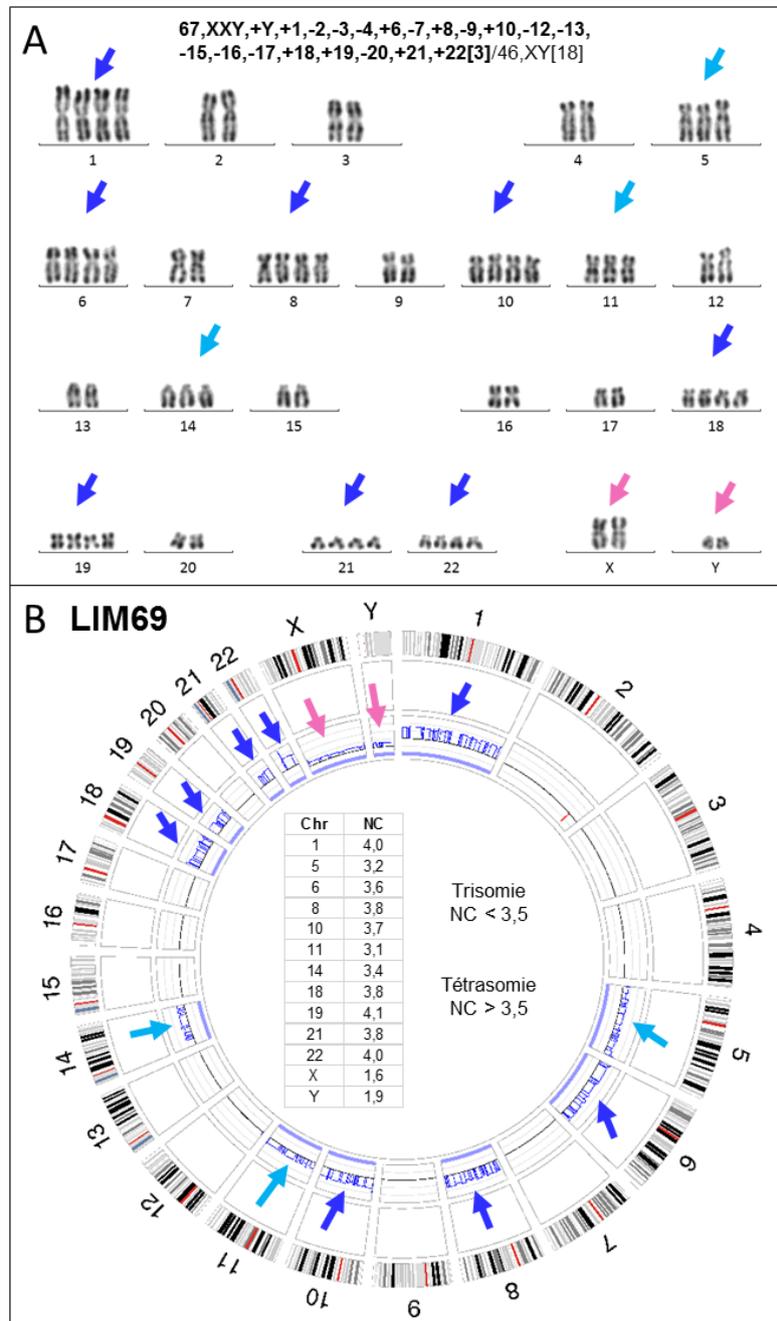


Figure 45 : Identification du clone hypodiploïde dupliqué au caryotype et par OGM pour LIM69.

Les trisomies et tétrasomies sont indiquées par des flèches bleu clair et bleu foncé respectivement. Les flèches roses indiquent des disomies des chromosomes X et Y. **A** : Caryotype de LIM69 retrouvant principalement des tétrasomies, sur seulement 3 mitoses clonales. Ce profil de gain ne correspond pas à une hyperdiploïdie classique mais à un clone hypodiploïde dupliqué. **B** : L'estimation du nombre de copies (NC) de l'OGM a permis de définir les trisomies (NC<3,5) et tétrasomies (NC>3,5) en accord avec le caryotype et donc d'identifier correctement le clone hypodiploïde dupliqué.

Bien que le caryotype soit la technique de référence pour identifier des anomalies primaires de la ploïdie, il dépend de **l'index de prolifération des cellules clonales** pour obtenir des métaphases informatives. Pour 1 cas sur 10 (LIM30), aucune mitose clonale hypodiploïde n'a été obtenue au caryotype et pour 4 cas sur 10 (LIM34, 69, 74 et 102), peu de mitoses clonales (1 à 6 mitoses) étaient obtenues. Le faible nombre de mitoses clonales augmente le risque de mauvais classement. A l'inverse, les **aneuploïdies étaient identifiées facilement et avec des VAF élevées pour l'OGM** (Figure 46, exemple de LIM34).

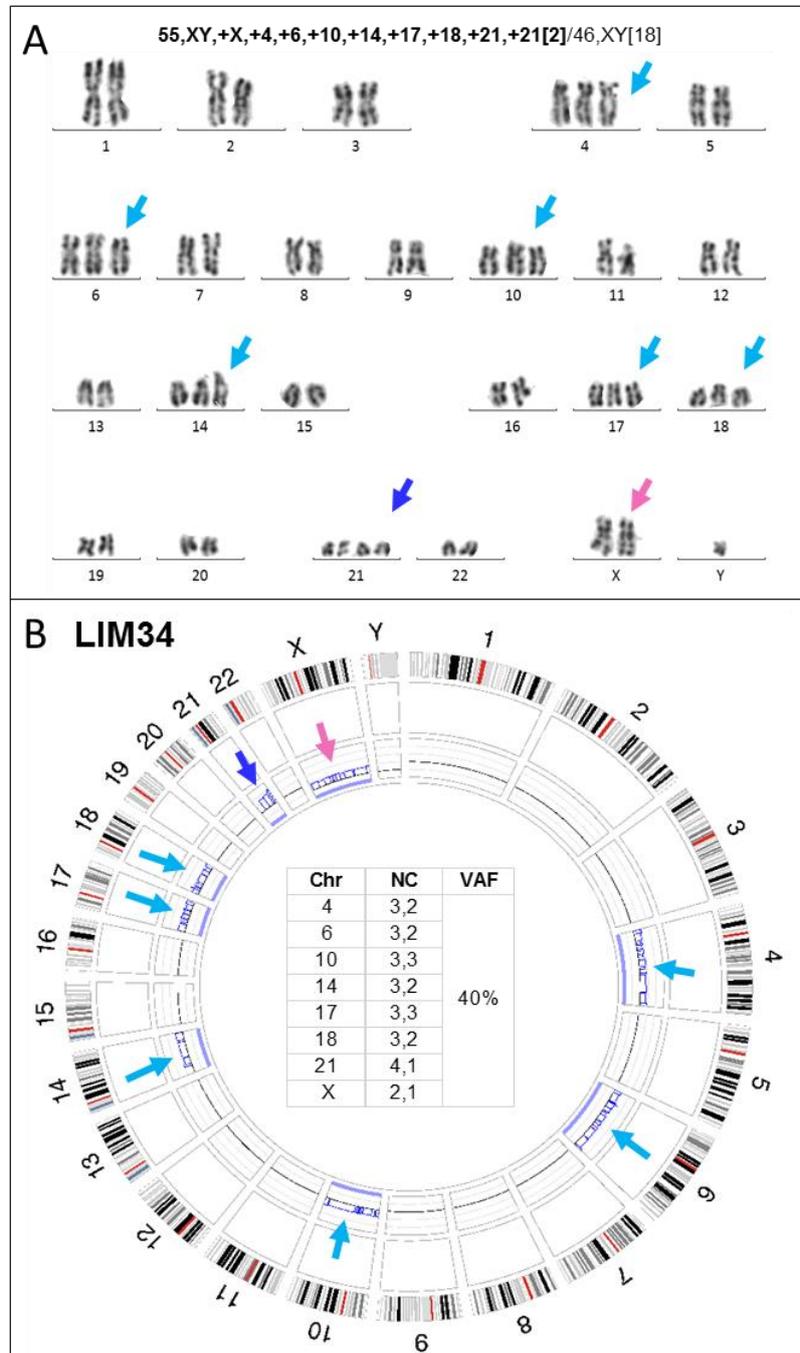


Figure 46 : Sensibilité du caryotype et de l'OGM pour la détection des hyperdiploïdies.

Les trisomies et tétrasomies sont indiquées par des flèches bleu clair ou foncé respectivement. Les flèches roses indiquent une disomie du chromosome X. **A** : Caryotype de LIM34 retrouvant sur seulement 2 mitoses clonales une hyperdiploïdie. **B** : Les aneuploïdies sont détectées à des VAF élevées (40%) par OGM et concordantes avec le caryotype grâce au nombre de copies (NC).

Enfin, des anomalies de la ploïdies, surtout les hyperdiploïdies, peuvent être des évènements secondaires et particulièrement dans les LAL-B Ph+ (104). Il est donc nécessaire de **vérifier l'absence d'une anomalie primaire de type réarrangement en cytogénétique même lorsqu'une hyperdiploïdie est identifiée**. Un classement correct des gains chromosomiques est également très important puisque le profil de gains sera atypique dans le cas d'une hyperdiploïdie secondaire (90). Trois cas de notre série avaient une hyperdiploïdie secondaire, soit d'un réarrangement *BCR::ABL1* (LIM17 et 87), soit d'un réarrangement *IGH::CEBPA* (LIM8). Pour ces trois cas, l'analyse OGM a identifié l'anomalie primaire ainsi que l'hyperdiploïdie secondaire. De plus, pour les 10 cas dont l'hyperdiploïdie était l'anomalie primaire (LIM14, 30, 34, 46, 69, 70, 74, 92, 102 et 139), les résultats OGM étaient concordant avec l'absence d'une autre anomalie primaire.

V.5.2.2. Détection des anomalies primaires des LAL-T

A l'exception de LIM95, une anomalie primaire a été détectée par au moins une des techniques utilisées pour les 5 autres cas de LAL-T (LIM21, 26, 54, 101 et 113) (Figure 47). A noter que la RT-MLPA n'a détecté aucune de ces anomalies puisqu'elles ne font pas partie de celles recherchées.

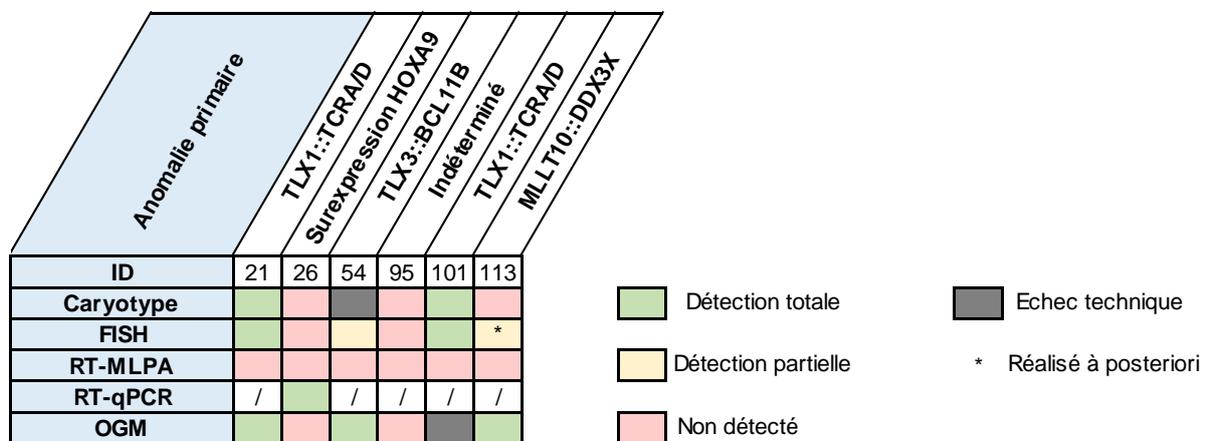


Figure 47 : Détection des anomalies primaires des LAL-T par les différentes techniques utilisées.

En excluant LIM101 dont l'analyse OGM n'a pu être réalisée, l'OGM a détecté une anomalie primaire dans 3 cas sur 5 :

- LIM21 : L'OGM a identifié, à une VAF de 10%, un réarrangement complexe entre les chromosomes 1, 10 et 14 et avec notamment une *t(10;14)(q24.31;q11.2)* avec fusion *TCRA::TLX1*. Cela était concordant avec le caryotype complexe retrouvant des dérivés 1, 10 et 14 ainsi qu'avec la FISH ayant identifié une fusion *TCRA::TLX1*. 9 mitoses sur 29 étaient clonales au caryotype et la fusion était retrouvée sur 38% des noyaux analysés en FISH.
- LIM54 (Figure 48A) : Aucune métaphase n'avait été obtenue au caryotype pour cet échantillon. En revanche, la FISH montrait un réarrangement de *TLX3* (séparation des signaux 5' et 3') sur 85% des noyaux sans identification du partenaire. Une translocation équilibrée, *t(5;14)(q35.1;q32.2)*, avec réarrangement *TLX3::BCL11B* a été détectée par OGM à une VAF de 45%. En effet, la visualisation de cette translocation sur le Genome browser a mis en évidence que le point de cassure en 5q35.1 impactait le gène *TLX3* et que le point de cassure en 14q32.2 était situé à environ 400kb en amont du gène *BCL11B* où sont localisés les

éléments régulateurs transcriptionnels de *BCL11B*. Les résultats OGM étaient donc concordants avec la FISH.

- LIM113 (Figure 48B) : Seulement 9 mitoses normales ont été obtenues au caryotype et les sondes FISH réalisées étaient normales également. L'OGM a détecté une translocation équilibrée, $t(X;10)(p11.4;p12.31)$, avec fusion *MLLT10::DDX3X* à une VAF de 45%. Cette translocation est cryptique au caryotype. Une sonde FISH réalisée à posteriori, ciblant *MLLT10*, a confirmé le réarrangement sur 66% des noyaux. Ce réarrangement assez rare (environ 3% des LAL-T) fait partie du groupe avec surexpression *HOXA*. Son pronostic n'est pas réellement établi mais le taux de survie est décrit comme faible.

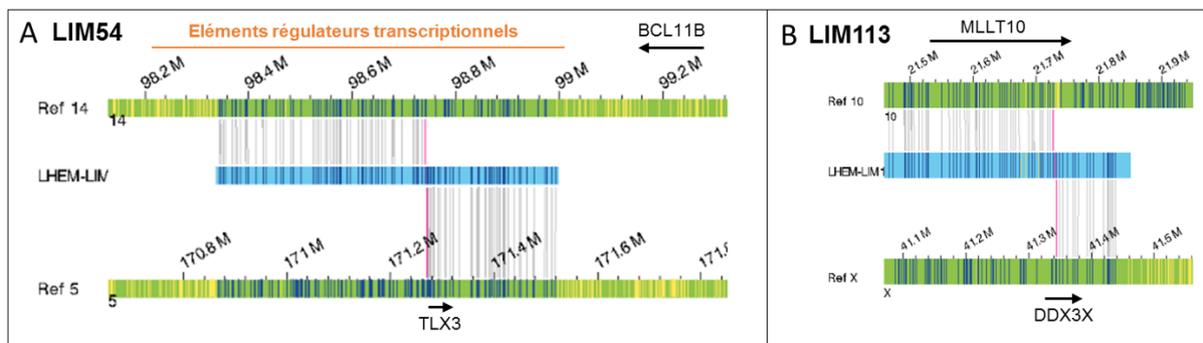


Figure 48 : Exemples de détection de réarrangements récurrents des LAL-T par OGM.

A : Identification par OGM d'une translocation cryptique, $t(5;14)(q35.1;q32.2)$, qui entraîne la surexpression de *TLX3* (5q35) en le plaçant sous le contrôle d'éléments régulateurs transcriptionnels de *BCL11B* (5q32). **B** : Identification d'une translocation $t(X;10)(p11.4;p12.31)$ avec réarrangement *MLLT10::DDX3X* par OGM. Cette translocation est cryptique au caryotype.

Pour LIM26, une surexpression de *HOXA9* avait été détectée par RT-qPCR sur le bilan du diagnostic. Aucun réarrangement expliquant cette surexpression n'a été mis en évidence au diagnostic ou sur le bilan de suivi par les techniques utilisées. Comme le caryotype, l'OGM a détecté une translocation équilibrée, $t(12;15)(q24.31;q22.31)$, avec réarrangement *SNX1::CLIP1* selon les points de cassure de l'OGM. Ce réarrangement n'est pas décrit dans la littérature et n'explique donc a priori pas la surexpression de *HOXA9*.

Enfin, pour LIM95, ni l'OGM ni les autres techniques n'ont identifié une anomalie primaire. Sur les 9 mitoses obtenues pour ce cas, 5 étaient normales et 4 étaient inclassables mais très hyperdiploïdes avec une suspicion de caryotype para-tétraploïde. Les sondes FISH réalisées n'ont pas mis en évidence de réarrangement mais retrouvaient 4 signaux pour *ABL1*, *KMT2A* et *BCR*, 3 signaux pour *TLX3* et 2 signaux pour *TLX1*. L'OGM retrouvait de très nombreux réarrangements complexes déséquilibrés ainsi que de multiples aneuploïdies. Le pipeline De Novo a conforté l'hypothèse d'une para-tétraploïdie et les résultats de FISH étaient concordants avec le profil CNV selon cette hypothèse (Figure 37, page 112).

Au total, le faible nombre de cas de LAL-T n'est pas suffisant pour évaluer la sensibilité de l'OGM mais les deux réarrangements identifiés par le caryotype et/ou la FISH ont également été détectés par OGM et un réarrangement récurrent non identifié en cytogénétique a pu être mis en évidence par OGM.

V.5.2.3. Détection des délétions secondaires pronostiques des LAL-B

- Comparaison des résultats de MLPA et de l'OGM :

Sur les 11 échantillons pour lesquels la MLPA a été réalisée, des délétions récurrentes ont été identifiées pour 6 d'entre eux (LIM9, 32, 69, 70, 74 et 92). Toutes ces délétions ont également été détectées par l'OGM. En plus d'obtenir une sensibilité de 100%, l'OGM a pu faire la distinction entre les délétions mono-alléliques et bi-alléliques au même titre que la MLPA (LIM9 et LIM92). Des délétions additionnelles sous-clonales ont été identifiées par l'OGM dans deux échantillons : LIM 9 (délétion *CDKN2A/B* à une VAF de 6%) et LIM69 (délétion *IKZF1* à une VAF de 11%). Par rapport à la VAF obtenue, on estime que ces délétions étaient présentes dans 10 à 20% des cellules tumorales. Il est donc normal qu'elles ne soient pas détectées par la MLPA dont la limite de détection est supérieure (plus de 20% des cellules) (219). La distinction dans les résultats rendus entre les délétions clonales et sous-clonales est nécessaire puisque l'impact pronostique des délétions sous-clonales n'est pas établi.

Lorsque la MLPA était négative, l'OGM n'a pas détecté de délétion non plus. En revanche, sur les 17 échantillons où la MLPA n'a pas été réalisée, l'OGM a détecté des délétions secondaires pour 10 d'entre eux.

L'OGM a donc permis une détection exhaustive de toutes les délétions récurrentes pronostiques à l'exception de *EBF1*, absente dans tous les échantillons analysés. En effet, au moins une délétion pour les gènes *IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1* et *CRLF2* a été détectée par l'OGM. Aucune délétion de *CRLF2* n'ayant été détectée par la MLPA, la délétion de *CRLF2* identifiée pour LIM37 a été confirmée en FISH et elle était présente sur 32% des noyaux analysés (Figure 48).

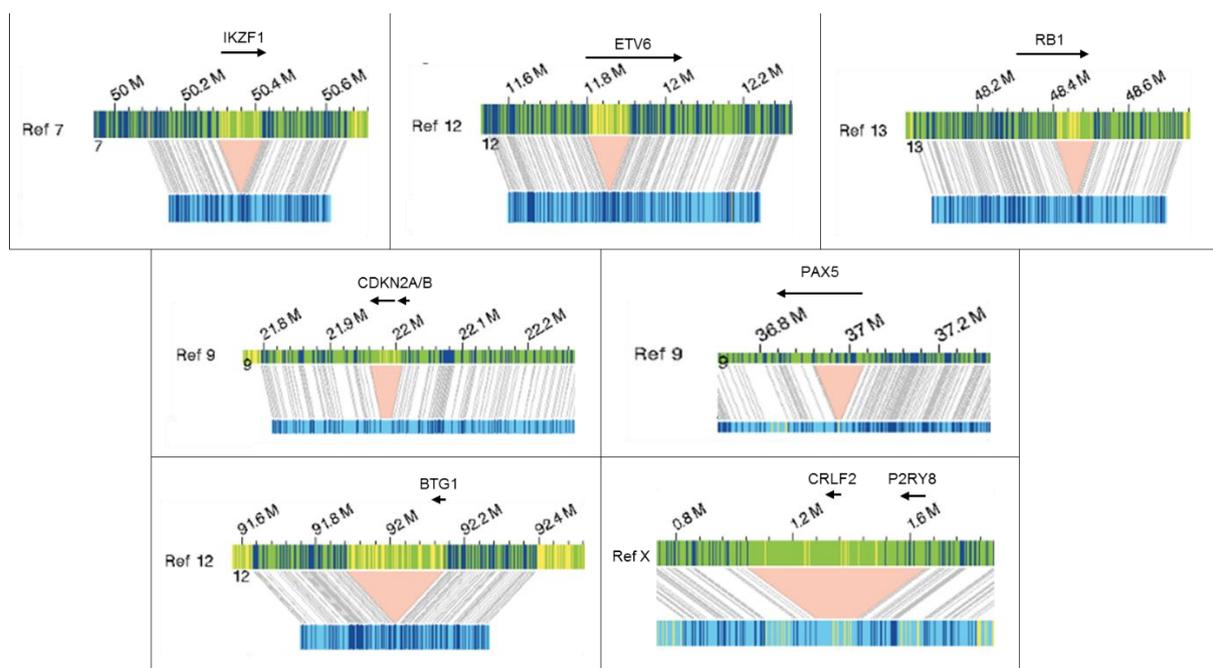


Figure 49 : Exemples de délétions récurrentes identifiées par OGM.

- Comparaison des résultats de PCR mutiplex et de l'OGM :

La PCR multiplex pour la détection des délétions intragéniques récurrentes de *IKZF1* (218) a été réalisée pour 14 échantillons et a détecté une délétion intragénique de *IKZF1* pour 3 d'entre eux. Les délétions concernaient les exons 2 à 7 ($\Delta 2-7$) pour LIM42 et les exons 4 à 7 ($\Delta 4-7$) pour LIM91 et LIM107. L'OGM a parfaitement identifié ces délétions pour les trois échantillons et les points de cassure estimés étaient semblables à ceux de la PCR multiplex (Figure 49A et 49B). Sur les 11 échantillons négatifs en PCR multiplex, l'OGM a détecté une délétion intragénique à une VAF de 45% pour LIM68. D'après les points de cassure estimés, cette délétion concernerait les exons 2 à 3 (Figure 49C). Ces points de cassure ne sont pas récurrents et ne sont pas recherchés par la PCR multiplex. De plus, l'OGM a détecté une délétion intragénique *IKZF1* pour un échantillon (LIM87) sur les 14 échantillons pour lesquels la PCR multiplex n'a pas été réalisée. Les points de cassure estimés correspondaient à une délétion de type $\Delta 4-7$ (Figure 49D).

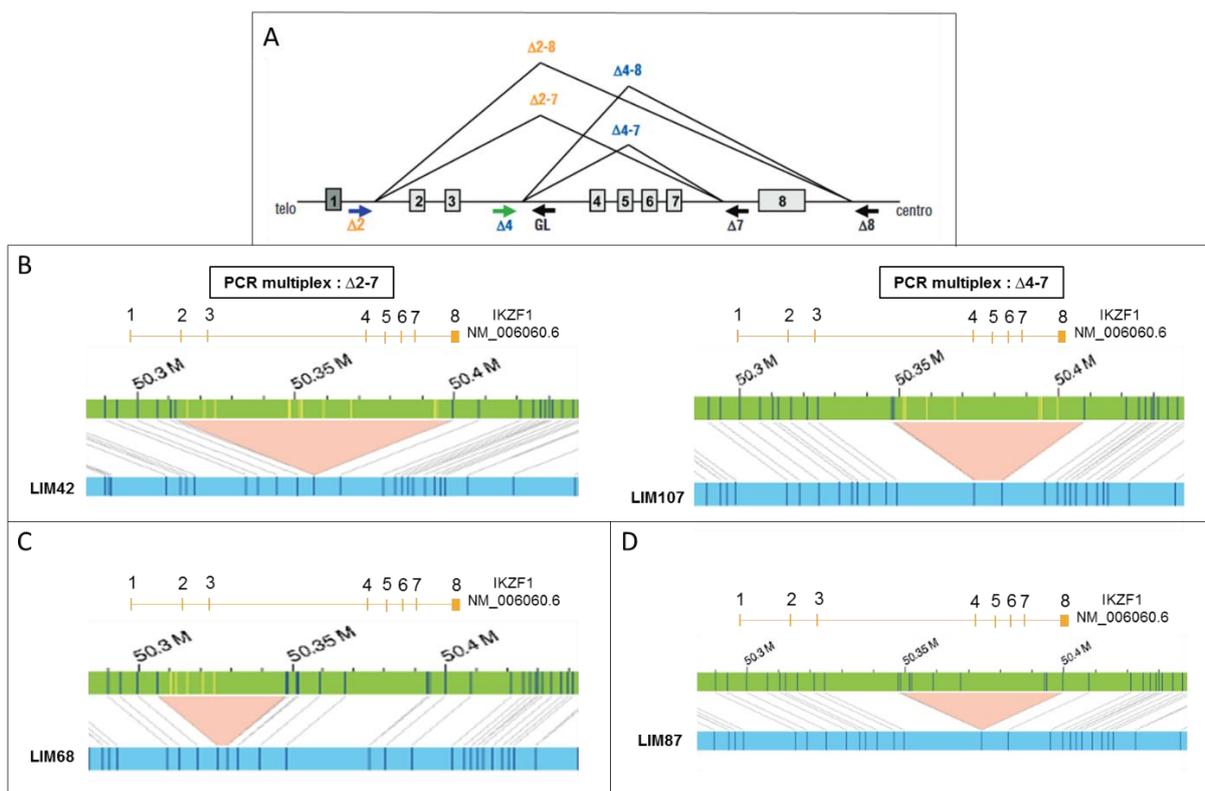


Figure 50 : Détection des délétions intragéniques de *IKZF1* (9p21.3) par OGM.

A : Délétions intragéniques récurrentes recherchées par PCR multiplex (218). **B :** Exemple de délétions intragéniques de *IKZF1* détectées par OGM avec une concordance des points de cassure estimés par OGM et ceux de la PCR multiplex. **C :** Délétion intragénique *IKZF1* détectée par OGM pour LIM68 mais non détectée par PCR multiplex à cause des points de cassure non récurrents. **D :** Délétion intragénique de type $\Delta 4-7$ supposée pour LIM87 (PCR multiplex non réalisée).

La PCR multiplex pour la détection des délétions intragéniques récurrentes de *ERG* (123) a été réalisée pour 6 échantillons et aucune délétion n'a été détectée. L'analyse OGM pour ces échantillons n'a pas non plus identifié de délétion de *ERG*. En revanche, une délétion intragénique de *ERG* a été détectée par OGM pour LIM116. D'après les points de cassure estimés par OGM, la délétion emporterait les exons 2 à 6 plus ou moins les exons 7 à 9 (Figure 50A). Cela correspond aux points de cassure récurrents décrits par *Clappier et al.* (Figure 50B).

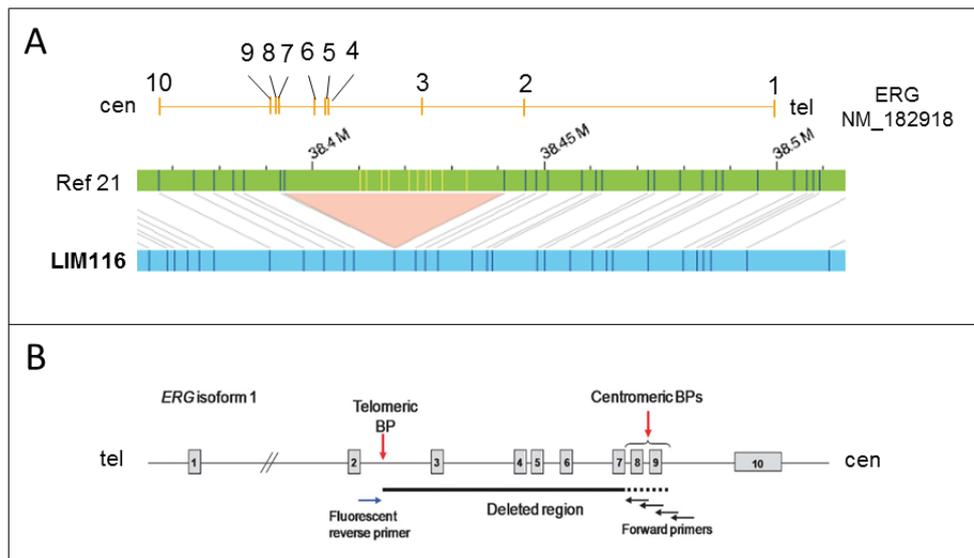


Figure 51 : Détection d'une délétion intragénique de ERG (21q22.2) par OGM.

A : Détection par OGM pour LIM116 d'une délétion intragénique de ERG avec des points de cassure estimés après l'exon 2 et au niveau des exons 7-9. **B :** Points de cassure récurrents recherchés par PCR multiplex (123).

V.5.3. Sensibilité pour la détection des anomalies clonales et sous-clonales

L'OGM étant une analyse pan-génomique, sa capacité à détecter des anomalies clonales a été évaluée par rapport à celle du caryotype principalement mais également à l'association du caryotype et de la FISH (Tableau 9).

L'OGM a permis de détecter au minimum une anomalie clonale dans 100% des échantillons ayant pu être analysés (n=32), même pour ceux avec une plus faible infiltration blastique comme LIM30 (23% de blastes) et LIM42 (10% de blastes). En comparaison, le caryotype a identifié au moins une anomalie clonale dans 28 échantillons sur 31 analysés soit dans 90% des cas (les échecs pour LIM42, 54 et 95 sont exclus). La FISH en a identifié au moins une dans 82% des cas (27 sur 33 échantillons analysés, LIM42 exclu). En absence d'échec de résultat, **l'OGM a donc une sensibilité supérieure** à celle du caryotype et de la FISH pour la détection des anomalies clonales.

De plus, hors échecs et anomalies cryptiques, le caryotype a détecté moins de 5 mitoses clonales dans 31% des cas et son pourcentage de clonalité était plus faible d'au moins 30% par rapport à celui de l'OGM dans 39% des cas. En effet, le **pourcentage de clonalité moyen de l'OGM (78%)** était bien **supérieur à celui du caryotype (50.5%)**. Ces résultats confirment que l'OGM est très sensible pour la détection des anomalies clonales à la différence du caryotype dépendant de l'index prolifératif des cellules tumorales, faible dans les LAL.

En excluant les échantillons pour lesquels aucune anomalie clonale n'était détectée sur les noyaux analysés (LIM26, 32, 57, 68, 104 et 113), le **pourcentage de clonalité moyen de la FISH** était de **72%**, donc similaire à celui de l'OGM. De plus, lorsque la FISH et l'OGM étaient clonaux pour un même échantillon (n=25), leur pourcentage de clonalité était semblable avec une variation inférieure ou égale à 10% dans 72% des cas (n=18) et de 10,1 à 20% dans les 28% des cas restants (n=7). La concordance entre le pourcentage de clonalité estimé de l'OGM par rapport à celui de la FISH, relativement précis par le décompte des noyaux, permet de valider la **fiabilité de la VAF** rendue par l'analyse bio-informatique de l'OGM.

Tableau 9 : Pourcentage de clonalité des échantillons avec le caryotype, la FISH et l'OGM.

* = OGM réalisé sur un échantillon sanguin avec une infiltration inférieure à celle de la moelle.

/ = absence d'anomalie clonale détectée sur les noyaux analysés avec les sondes FISH réalisées.

Les couleurs indiquent : un échec technique (rouge) ; une absence de clonalité ou faible clonalité ou nombre total de mitoses faible (jaune) ; une clonalité supérieure de l'OGM par rapport au caryotype (vert).

ID	Caryotype (mitoses et %)				FISH	OGM
	clonales	normales	total	%		
LIM8	10	17	27	37	80	90
LIM9	24	1	25	96	87	84
LIM14	18	2	20	90	80	90
LIM17	19	1	20	95	77	80
LIM21	9	19	28	32	38	20
LIM25	3	6	9	33	84	70
LIM26	2	18	20	10	/	70
LIM30	5	15	20	25	22	10
LIM32	0 (cryptique)	20	20	0	/	60
LIM34	2	18	20	10	60	80
LIM35	7	13	20	35	85	80
LIM37	4	16	20	20	58	60
LIM42	Non réalisé (échec aspiration moelle)					30*
LIM45	10	0	10	100	90	80
LIM46	16	9	25	64	77	80
LIM54	Echec				85	90
LIM57	0	18	18	0	/	50*
LIM68	6	2	8	75	/	90
LIM69	3	18	21	14	50	70
LIM70	16	4	20	80	75	90
LIM74	6	14	20	30	80	80
LIM87	20	0	20	100	75	70*
LIM91	20	0	20	100	80	80
LIM92	11	1	12	92	90	90
LIM93	1	19	20	5	6	Echec
LIM95	Echec				75	80
LIM101	2	2	4	50	85	Echec
LIM102	1	15	16	6	75	95
LIM104	15	5	20	75	/	95
LIM107	20	0	20	100	90	95
LIM113	0 (cryptique)	9	9	0	/	90
LIM116	11	8	19	58	80	90
LIM139	11	9	20	55	80	80
LIM143	14	4	18	78	90	90
Pourcentage de clonalité moyen (%)				50,5	72	78

Nous avons également analysé la sensibilité de l'OGM pour la détection des anomalies sous-clonales au caryotype. En effet, ces anomalies auront logiquement une VAF plus faible que celles clonales et peuvent donc être en dessous de la limite de détection correspondant à une VAF de 5% d'après le fournisseur.

Sur les 7 échantillons qui avaient un sous-clone identifié au caryotype, l'OGM a détecté le sous-clone pour 6 d'entre eux (soit dans 86% des cas) :

- LIM8 : Le sous-clone, présent sur 50% des mitoses clonales (5 sur 10), présentait de multiples gains ainsi que deux marqueurs. L'OGM a détecté ces anomalies sous-clonales à une VAF de 40% contre 45% pour les anomalies clonales.

- LIM17 : Le sous-clone du caryotype, majoritaire (11 mitoses sur 19 clonales) correspondait à la perte de la trisomie 2 et à une tétrasomie 14 supplémentaire. Les VAF des anomalies clonales étaient de 40 à 45% alors que celle de la tétrasomie 14 était de 35%, donc légèrement plus faible. De plus, la VAF faible (8%) de la trisomie 2 était cohérente avec son absence dans le sous-clone majoritaire.
- LIM37 : Le sous-clone avec une trisomie 20 était détecté pour 2 mitoses sur 4 clonales. Une trisomie 20 a été détectée par OGM avec une VAF de 20%. Les VAF des anomalies clonales étaient d'environ 30%.
- LIM45 : Le sous-clone majoritaire au caryotype (9 mitoses sur 10 clonales) identifiait une translocation équilibrée, t(1;16)(p32;q22). L'OGM a détecté cette translocation à une VAF de 15% contre 30% pour les anomalies clonales.
- LIM46 : Le sous-clone minoritaire au caryotype (2 mitoses sur 16 clonales) identifiait une duplication 1q, dup(1)(q21q31). Une duplication 1q associée à une délétion 1q a été détectée par OGM à une VAF de 30% contre 40% pour les anomalies clonales.
- LIM91 : Le sous-clone majoritaire au caryotype (16 mitoses sur 22 clonales) identifiait une trisomie 4 ainsi qu'un marqueur. L'OGM a détecté une trisomie 4 ainsi qu'un dérivé du chromosome 8, correspondant au marqueur, à des VAF de 20% contre 40% pour les anomalies clonales.

Pour LIM104, l'OGM n'a pas détecté la délétion, del(4)(q31), sous-clonale minoritaire (2 mitoses sur 15 clonales) identifiée au caryotype.

A l'inverse, un sous-clone supplémentaire, non identifié au caryotype, a été détecté par OGM pour LIM8 avec une perte 17p totale (sur un des trois chromosomes 17 car trisomie 17 initiale) à une VAF de 25%. Cela a été confirmé par la technique NGS qui avait été réalisée pour ce cas et qui retrouvait, par l'analyse des CNV, un profil de gains chromosomiques à l'identique de celui du caryotype, à l'exception du chromosome 17 pour lequel un gain 17q était observé et non une trisomie 17.

Logiquement, la sensibilité de l'OGM est plus faible pour la détection des anomalies sous-clonales par rapport aux anomalies clonales mais elle reste élevée. De plus, des anomalies sous-clonales minoritaires au caryotype avaient une VAF élevée en OGM (LIM37) alors que des anomalies sous-clonales très majoritaires au caryotype avaient une VAF beaucoup plus faible que les anomalies clonales en OGM (LIM91). L'absence de corrélation entre la prépondérance d'une anomalie au caryotype et de la VAF en OGM s'explique par l'index prolifératif variable suite à l'acquisition de nouvelles anomalies faussant la proportion des clones et sous-clones les uns par rapport aux autres au caryotype. A l'inverse, l'OGM voit la proportion réelle en terme d'ADN.

Lorsque les VAF des anomalies sont différentes, il est alors possible d'avoir une idée de l'architecture clonale et sous-clonale à condition que le nombre de sous-clones ne soit pas trop important.

V.5.4. Concordance des résultats

Nous avons évalué la concordance des résultats obtenus par OGM pour les 32 échantillons analysés par rapport à ceux des techniques conventionnelles et additionnelles.

Nous avons tout d'abord **recherché et analysé les discordances entre les différentes techniques pour les anomalies chromosomiques non cryptiques** (les translocations et inversions considérées comme cryptiques au caryotype sont incluses).

Pour 19 échantillons sur 32 (59%), des **anomalies différentes de celles du caryotype ou additionnelles étaient détectées par OGM** (Tableau 10). Après comparaison et relecture du caryotype, toutes ces anomalies étaient finalement concordantes et correspondaient à des anomalies non expliquées par le caryotype (principalement des marqueurs et des additions de matériel). Pour LIM92 et LIM143, des FISH réalisées en supplément étaient également concordantes : i) LIM92 : 4 signaux correspondant à un centromère du chromosome 8 dont un situé sur le marqueur du caryotype, cohérent avec un der(8)t(8;9) ; ii) LIM143 : 3 signaux de BCL2 (18q21) dont un situé sur la del(9)(p13) du caryotype, cohérent avec un der(9)t(9;18).

Tableau 10 : Précision et ajustement des résultats du caryotype grâce aux résultats d'OGM.

ID	Précisions du caryotype (et FISH) par l'OGM	
	Caryotype (et FISH)	OGM
LIM8	mar1 mar2	+10 der(11)t(11;11)(p13;q13)
LIM9	t(10;10_)(q21;q23)	der(3_)t(3_;10_)(q27.1;q25.1) der(10_)inv(10_)(q21.1q25.1)t(3_;10_)(q27.1;q21.1)
LIM14	mar1 mar2	der(4)t(4;13)(p15.31;q14.3) der(18)t(11;18)(q21;q12.3)
LIM21	-9 et mar -5, -13, add(18(q21) et 3mar	i(9)(q10) (5,13,18)cx
LIM25	-20 et mar	chromosome 20 normal
LIM35	Nombreuses additions de matériel et nombreux marqueurs	Précision de l'ensemble du caryotype et des marqueurs
LIM42	-3 et mar add(7)(q34) -18	der(17)t(3;17)(q21.2;q25.3) der(7)t(7;8)(q36.3;q11.23) -20
LIM45	add(16)(p13)	der(16)t(6;16)(p21;q24)
LIM46	add(4)(q21)	i(4)(p10)
LIM70	+10	+6
LIM74	+7 mar	+8 +10
LIM87	add(X)(q28) mar	der(X)t(X;5)(q22.3;q15) der(5)inv(X)(q22.3q28)t(X;5)(q28;q15)
LIM91	add(8)(p21) mar	der(8)del(8)(p11.1)t(8;8)(p11.1;q21.11) duplication du der(8)
LIM92	+12 mar	+der(12)t(12;14)(p13.1;q31.3) der(8)t(8;9)(q23.2;q11.1)
LIM102	+1	dup(1)(q21.1q42.12)
LIM104	-9, -9, mar1, mar2 add(17)(p10)	(9,9_)cth t(3;17)(p21.31;q11.2)
LIM116	add(8)(q24) add(11)(p15) der(4)t(1;4)(q23;p16)[4]	dup(8)(q24q24) der(11)t(1;15)(q22;q26.3)t(11;15)(p15.5;q26.3) der(4)inv(1)(q21.3q32.1)t(1;4)(q32.1;p16.3)
LIM139	+15 +20	+18 der(18)t(18;16)(q21.1;q23.3)
LIM143	del(9)(p13)	der(9)t(9;18)(p11.1;q21.2)

Pour LIM95, le caryotype était en échec mais les résultats OGM étaient concordants à ceux obtenus en FISH.

Pour 5 échantillons sur 32 (16%), des anomalies additionnelles étaient détectées par OGM mais non retrouvées par les autres techniques. Elles ont toutes été confirmées par des sondes FISH :

- LIM9 : Détection d'une translocation déséquilibrée, der(10)t(10;19)(q26.3;q13.11), confirmée par une sonde FISH ciblant *BCL3* (19q13.3).
- LIM32 : Détection d'une translocation déséquilibrée, der(3)t(3;6)(q26.32;p21.1), confirmée par une sonde FISH ciblant *DEK* (6p22.3).
- LIM45 : Détection d'un gain total du chromosome X confirmé par une sonde ciblant le centromère du chromosome X.
- LIM57 : Détection de multiples anomalies en discordance avec un caryotype normal. Deux sondes FISH ciblant *DLEU* (13q14) et *BLC2* (18q21.3) ont confirmé l'informativité des résultats obtenus par OGM.
- LIM113 : Détection d'une translocation cryptique, t(X;10)(p11.4;p12.31), confirmée par une sonde FISH ciblant *MLLT10* (10p12).

Pour 4 échantillons sur 32 (12,5%), une ou deux anomalies identifiées au caryotype n'étaient pas détectées par OGM :

- LIM21 : Deux anomalies identifiées au caryotype, l'add(4)(q11) et la monosomie 7, n'étaient pas retrouvées par OGM. Pour le reste, les résultats OGM étaient compatibles avec le caryotype complexe (Figure 23). Ils ont confirmé un réarrangement complexe entre les chromosomes 1, 10 et 14 sans pouvoir le décrire précisément. De même, ils ont mis en évidence un réarrangement complexe entre les chromosomes 5, 13 et 18 expliquant partiellement les monosomies et les marqueurs du caryotype. L'OGM ne retrouvait cependant pas de réarrangement impliquant le chromosome 7 et seulement une délétion de 2Mb, del(7)(q22.2q22.3). La réalisation d'une sonde FISH, XL del(7)(q22q31) (MetaSystems) a permis de confirmer l'absence de monosomie 7 et a mis en évidence une perte d'un signal en 7q22 uniquement. En l'absence de métaphase clonale, elle n'a pas permis de localiser la délocalisation des signaux ciblant le centromère et la région 7q31. De plus, aucun CNV ou SV n'a été détecté par OGM pour expliquer l'add(4)(q11) identifié au caryotype. Une sonde FISH ciblant *PDGFRA* (4q12) a été réalisée et retrouvait 2 signaux sur la totalité des noyaux. Une métaphase a également été analysée avec deux signaux présents mais la qualité des chromosomes ne permettait pas de les identifier. Le résultat de la FISH est donc concordant avec l'absence de perte au sein du chromosome 4. Notre hypothèse est que des réarrangements impactent les chromosomes 4 et 7 mais qu'ils ne sont pas détectés par OGM à cause de points de cassure centromériques et/ou télomériques. Ni la cytogénétique ni l'OGM n'ont permis d'expliquer les anomalies impactant les chromosomes 4 et 7 donc on ne peut pas considérer les résultats OGM comme discordants.

- LIM30 (Figure 51A) : Le caryotype retrouvait uniquement une translocation équilibrée, t(9;14)(q22;q32), sur 25% des mitoses analysées (5 sur 20 mitoses). Cet échantillon correspondait au suivi d'une LAL-B pour laquelle une hypodiploïdie avait été identifiée au diagnostic (LIM14). Le résultat du suivi étant discordant, une sonde FISH ciblant *KMT2A* a été réalisée afin de rechercher la présence du clone initial au niveau interphasique. Elle retrouvait 3 signaux de *KMT2A* (comme au diagnostic) pour 22% des noyaux analysés. Le clone hypodiploïde était donc toujours présent mais non prolifératif. A l'inverse, la t(9;14) n'avait pas été détectée au diagnostic. Des métaphases additionnelles ont alors été analysées et une

t(9;14) a été retrouvée pour 1 seule mitose sur 66 sans hypodiploïdie associée. Les deux clones sont donc distincts. Il semble que celui avec la t(9;14), quasiment indétectable au diagnostic, ait progressé et qu'il soit plus prolifératif. L'OGM n'a détecté que le clone hypodiploïde en concordance avec la FISH. Les données OGM de LIM14 ont également été revues et la t(9;14) n'était pas non plus détectée sur cet échantillon. Il semble donc que le clone avec la t(9;14) soit en dessous de la limite de détection de l'OGM (VAF>5%).

- LIM104 (Figure 51B) : Le caryotype avait détecté un clone majoritaire (13 mitoses sur 20, 65%) ainsi qu'un sous-clone (2 mitoses sur 20, 10%) avec une délétion 4q, del(4)(q31). Les résultats OGM étaient concordants avec le clone majoritaire et ont permis de préciser les anomalies. En revanche, la délétion 4q n'a pas été détectée, probablement car en dessous de la limite de détection.

- LIM107 : Sur les 4 anomalies identifiées au caryotype, une seule n'était pas détectée par OGM. Il s'agissait de la délétion 13q, del(13)(?q13q14), dont les points de cassure n'avaient pu être définis précisément. Une sonde FISH ciblant *DLEU* (13q14) a alors été réalisée et n'a pas retrouvée de perte d'un signal, en concordance avec l'OGM. Après ré-analyse du caryotype, les chromosomes précédemment identifiés en tant que del(13q) ont été reclassés différemment.

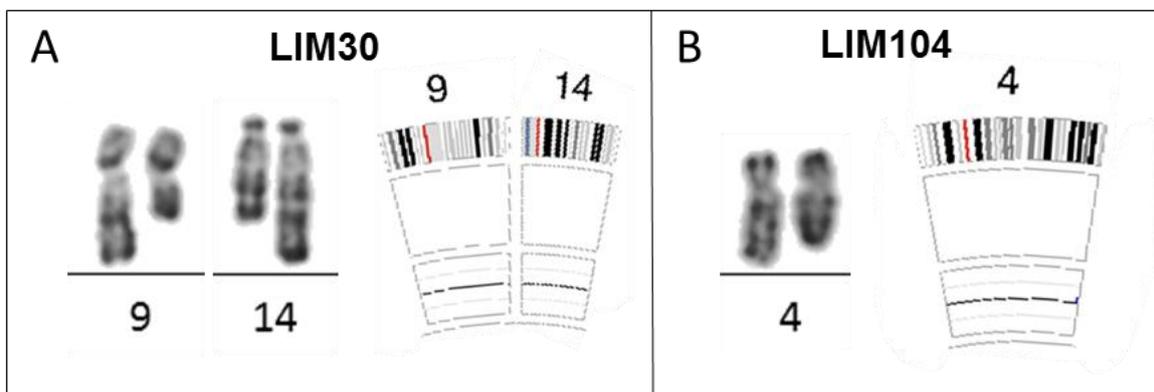


Figure 52 : Deux résultats discordants entre l'OGM et le caryotype.

A : Translocation t(9;14)(q22;q32), identifiée au caryotype sur 25% des mitoses, non retrouvée par OGM. **B** : Délétion 4q sous-clonale, del(4)(q31), identifiée au caryotype sur 10% des mitoses, non retrouvée par OGM.

Au total, les **résultats OGM étaient donc concordants pour 30 échantillons sur 32, soit dans 94% des cas**. Les deux cas discordants étaient des échantillons de LAL-B (LIM30 et LIM104). Les deux discordances étaient dues à la non détection par OGM d'une seule anomalie pour chaque échantillon. De plus, l'anomalie en cause était faiblement présente au caryotype pour les deux cas.

Nous avons ensuite **recherché et analysé les discordances pour les anomalies cryptiques**.

Concernant les LAL-B, toutes les délétions récurrentes et pronostiques identifiées en MLPA ou PCR multiplex ont également été détectées par OGM. Pour les 3 cas où l'OGM avait détecté une délétion non retrouvée en MLPA, la discordance a été expliquée par la non informativité de la MLPA ou de la PCR multiplex (voir partie V.5.2.3). Au final, les résultats

OGM étaient **concordants dans 100% des échantillons** (n=21) pour lesquels la MLPA et/ou la PCR multiplex avaient été réalisées.

Concernant les LAL-T, la MLPA et l'OGM ont été réalisés conjointement pour un seul échantillon, LIM54, pour lequel la délétion homozygote de *CDKN2A/B* identifiée par MLPA était également détectée par OGM. Pour LIM26, une analyse MLPA avait été réalisée sur le prélèvement du diagnostic et retrouvait une délétion *PTEN*. L'OGM ne détectait pas de délétion *PTEN* mais, comme la MLPA n'a pas été refaite sur l'échantillon correspondant à LIM26, nous n'avons pas pu conclure sur cette discordance.

V.5.5. Résolution de l'OGM

V.5.5.1. Taille minimale des anomalies détectées par OGM

Nous avons pu confirmer la résolution de l'OGM établie par le fournisseur (à partir de 5kb pour la détection des insertions/délétions avec le pipeline RVA) en détectant de multiples délétions récurrentes dans les LAL-B avec une taille :

- Comprise entre 50kb et 100kb : C'est le cas par exemple de la plupart des délétions impliquant *IKZF1*, *PAX5*, *ETV6* et *RB1* (Figure 32).
- Inférieure à 50kb : C'est le cas par exemple pour les délétions de *CDKN2A/B* (Figure 32), *IKZF1* (intragénique) (Figure 33), *ERG* (intragénique) (Figure 34) ou encore *CREBBP* (Figure 35A). La plus petite délétion détectée était une délétion intragénique de 15kb de *KDM6A* pour LIM37 (Figure 35B). Dans la littérature, les altérations de *KDM6A* sont récurrentes dans les LAL-T, avec principalement des mutations, mais des délétions sont également décrites dans les LAL-B et en particulier en association aux rechutes (220).

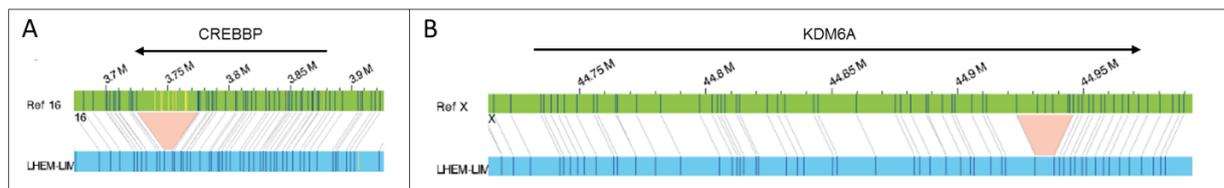


Figure 53 : Exemple de délétions détectées d'une taille inférieure à 50kb.

A : Délétion intragénique de *CREBBP* de 43kb détectée en 16p13.3 pour LIM46. **B** : Délétion intragénique de *KDM6A* de 15kb détectée en Xp11.3 pour LIM37.

Toutes ces délétions étaient identifiées par les pipelines RVA et De Novo lorsque les deux étaient réalisées. De multiples altérations d'une taille inférieure à 10kb ont également été détectées, en particulier par le pipeline De Novo, mais aucune d'entre elles n'a été rendue car non décrite à ce jour comme ayant un intérêt dans les LAL.

Pour les échantillons de LAL-T, la majorité des délétions impactant des gènes récurrents (par exemple *CDKN2A/B*, *FBXW7*, *RPL22*, *NRAS* et *JAK1*) étaient de taille supérieure à 1Mb. La plus petite délétion récurrente détectée était une délétion *IKZF1* de 318kb pour LIM95.

V.5.5.2. Précision des résultats de cytogénétique grâce à l'OGM

La résolution puissante de l'OGM a permis de préciser et d'ajuster les résultats obtenus en cytogénétique (caryotype et FISH) pour 29 échantillons sur 32 analysés, soit dans 91 % des cas. Différents types de précisions ont été possibles avec plus ou moins d'impact :

- **Précision des points de cassure** pour 9 anomalies réparties sur 8 échantillons (Tableau 11).

- L'OGM a permis de visualiser si ces anomalies impactaient des gènes d'intérêt en fonction des points de cassure adaptés. Pour un cas (LIM45), le point de cassure en 16p13 de la t(1;16) selon l'OGM impactait le gène *CREBBP* mais sans identification d'un partenaire en 1p33. En plus des délétions et mutations secondaires récurrentes de *CREBBP* dans les LAL, des réarrangements récurrents primaires de *CREBBP* sont décrits principalement avec *ZNF384* et plus rarement avec *KMT2A* (106) et *ETV6* (119). Pour ce cas, l'anomalie primaire était un réarrangement *KMT2A::MLLT1* et il est donc possible que la t(1;16) altère secondairement *CREBBP*.
- A l'inverse, cela a également permis de vérifier l'absence d'anomalie récurrente non mise en évidence par le caryotype ou les sondes FISH pour deux cas où une translocation était retrouvée au caryotype : i) LIM26 : la t(12;15) identifié au caryotype et précisée par OGM n'entraînait pas de réarrangement récurrent ; ii) LIM68 : les points de cassure supposés au caryotype de la t(1;19) faisait suspecter un réarrangement de *TCF3* (19p13) mais la FISH était normale. L'OGM a permis de préciser les points de cassure sur le chromosome 19 en 19q13 au lieu de 19p13 et de confirmer l'absence de réarrangement *TCF3*.

- **Précision des anomalies non complètement identifiées au caryotype** (addition de matériel et marqueur) **et modification du classement en accord avec les résultats d'OGM** après relecture du caryotype pour 19 échantillons sur 32 (voir Tableau 10) précédent.

- **Précision des résultats de cytogénétique** pour les 2 cas où le **caryotype était en échec avec alors des résultats uniquement ciblés et partiels obtenus en FISH** : i) LIM54 : identification d'une t(5;14)(q35.1;q32.2) avec fusion *TLX3::BCL11B* par l'OGM permettant de préciser le réarrangement *TLX3* détecté en FISH et absence d'autre anomalie non cryptique ; ii) LIM95 : obtention de résultats informatifs par l'OGM, en accord avec les résultats de FISH, ayant permis de décrire une nomenclature du caryotype supposé selon l'OGM.

- **Précision des résultats de FISH** pour 1 cas (LIM30) où deux clones différents étaient identifiés au caryotype et partiellement en FISH. L'OGM a permis de confirmer et de préciser le clone détecté en FISH.

Tableau 11 : Précision par l'OGM des points de cassure suspectés au caryotype.

ID	Caryotype	OGM	Impact de la précision
LIM9	t(3;11)(p21;q12)	t(3;11)(p21.31;q13.1)	
LIM26	t(12;15)(q23;q22)	t(12;15)(q24.31;q22.31)	Réarrangement <i>SNX1::CLIP1</i> non récurrent
LIM37	del(6)(q14q24) del(9_)(p13)	del(6)(q14.3q22.33) del(9_)(p21.1)	
LIM21	del(6)(q21)	del(6)(q14.1q21)	
LIM45	t(1;16)(p32;q22)	t(1;16_)(p33;p13)	<i>CREBBP</i> impliqué en 16p13 sans partenaire identifié
LIM46	dup(1)?(q21q31)	der(1)dup(1)(q23.1q32.2)del(1)(q32.2q44)	
LIM68	t(1;19)(q12;p13)	t(1;19)(q23.3;q13.42)	<i>TCF3</i> non impliqué
LIM107	del(9_)(p13)	del(9_)(p23p12)	

V.5.5.3. Détection d'anomalies additionnelles

La résolution supérieure de l'OGM a permis la **détection d'anomalies additionnelles non cryptiques** (à l'exception des translocations) par rapport aux résultats de cytogénétique (caryotype et FISH) **dans 28% des échantillons** (9 cas sur 32) (Tableau 12).

Tableau 12 : Anomalies additionnelles non cryptiques détectées par OGM et non identifiées par le caryotype ou la FISH.

LIM8	sl,-17,+del(17)(p13p12)	LIM57	Caryotype non clonal → OGM informatif (voir Annexe 6)
LIM9	der(10)t(10;19)(q26.3;q13.11)	LIM70	del(13)(q14.2q31.3)
LIM32	der(3)t(3;6)(q26.32;p21.1)	LIM74	del(13)(q13.1q21.31)
LIM45	+X	LIM95	Echec caryotype → OGM informatif (voir Annexe 7)
LIM30	-3,der(4)t(4;13)(p15.31;q14.3),-7,-13,-15,-16,-17,der(18)t(11;18)(q21;q12.3)		

Elle a également permis la **détection d'une anomalie cryptique correspondant à l'anomalie primaire** et non identifiée en FISH **dans 12,5% des échantillons** (4 cas sur 32) (Tableau 13) :

- LIM32 : remaniement déséquilibré complexe avec notamment une inversion au sein du chromosome 12 induisant une fusion *ETV6::MGAT4C*. Cette fusion avait uniquement été suspectée en RNAseq.
- LIM45 : translocation t(11;19) avec réarrangement *KMT2A::MLLT1*.
- LIM104 : translocation t(12;22) avec réarrangement *ZNF384::EP300*, détecté également en RT-MLPA.
- LIM113 : translocation t(X;10) avec réarrangement *DDX3X::MLLT10*.

Tableau 13 : Anomalies primaires cryptiques détectées par OGM et non identifiées en FISH.

LIM32	der(12)del(12)(p13p11)inv(12)(p11q21)	LIM104	t(12;22)(p13.31;q13.2)
LIM45	t(11;19)(q23.3;p13.3)	LIM113	t(X;10)(p11.4;p12.31)

De plus, elle a également permis la **détection additionnelle de délétions cryptiques pronostiques ou récurrentes dans 56% des échantillons** (18 cas sur 32), 14 cas de LAL-B sur 27 et 4 cas de LAL-T sur 5 (Tableau 14). Pour ces délétions, les autres techniques réalisées ne permettaient pas de les détecter.

Concernant les LAL-B :

- La détection additionnelle des délétions pronostiques des LAL-B a permis d'établir le pronostic selon le classifieur UKALL-CNA et selon le profil IKZF1plus pour 10 des 12 échantillons concernés. Pour LIM9 et LIM69, ce pronostic était également établi par la MLPA et les délétions sous-clonales additionnelles n'ont, à ce jour, pas d'impact décrit.
- LIM116 : la délétion de *ERG* a permis d'orienter vers une anomalie primaire de type réarrangement *DUX4*.

- LIM69 : cet échantillon correspond à une LAL-B hypodiploïde dupliquée et les altérations de *IKZF2* sont récurrentes avec cette anomalie primaire. Une délétion *SH2B3* a également été détectée. Les délétions de ce gène sont surtout décrites dans les LAL-B avec *iAMP21*.
- LIM37, 46 et 104 : des délétions de *KDM6A*, *CREBBP* et *SETD2* ont été respectivement détectées. Des altérations de ces trois gènes sont décrites comme associées aux rechutes et les trois échantillons correspondaient à des rechutes (70,220,221).
- LIM139 : une délétion de *CTCF* a été détectée. Les altérations de *CTCF* sont surtout décrites dans les LAL-T mais elles sont également décrites dans les LAL-B hyperdiploïdes (222).

Concernant les LAL-T :

- Des délétions de *FBXW7*, *NRAS*, *IDH2* (LIM21) et *IKZF1* (LIM95) ont été détectées par OGM. Les mutations de ces gènes font parties de celles ayant un impact pronostic d'après le classifieur de *Simonin et al* et les délétions *IKZF1* sont également décrites comme défavorables.
- Des délétions récurrentes ont été détectées avec principalement des délétions de *CDKN2A/B* (3 cas sur 5 LAL-T analysées par OGM) et *RPL22* (2 cas sur 5 LAL-T analysées par OGM).
- Une délétion de *NR3C1* a été détectée pour LIM21. Les altérations de ce gène sont associées à une résistance aux glucocorticoïdes et plus souvent retrouvées à la rechute. Cet échantillon correspondait à un diagnostic. A ce jour, la patiente n'a pas rechuté et elle est en rémission complète.

Tableau 14 : Anomalies additionnelles cryptiques récurrentes détectées par OGM

ID	Anomalies cryptiques additionnelles détectées par OGM	
	Délétions pronostiques	Autres délétions récurrentes
LAL-B		
LIM9	<i>CDKN2A/B</i> (sous-clonale)	
LIM25	<i>ETV6</i>	
LIM37	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote), <i>IKZF1</i> , <i>PAX5</i> , <i>CRLF2</i>	<i>KDM6A</i>
LIM42	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote), <i>BTG1</i> , <i>RB1</i>	
LIM45	<i>CDKN2A/B</i>	
LIM46		<i>CREBBP</i>
LIM57	<i>CDKN2A/B</i> , <i>RB1</i>	
LIM68	<i>IKZF1</i> , <i>RB1</i> , <i>BTG1</i> (homozygote)	
LIM69	<i>IKZF1</i> (sous-clonale)	<i>IKZF2</i> , <i>SH2B3</i>
LIM87	<i>IKZF1</i> (homozygote), <i>CDKN2A/B</i> (homozygote), <i>BTG1</i>	
LIM104	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote)	<i>SETD2</i>
LIM107	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote)	
LIM116		<i>ERG</i>
LIM139		<i>CTCF</i>
LAL-T		
LIM21	<i>FBXW7</i> , <i>NRAS</i> , <i>IDH2</i>	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote), <i>ETV6</i> , <i>NR3C1</i> , <i>CDKN1B</i> , <i>RPL22</i>
LIM26		<i>RPL22</i> , <i>CTCF</i> , <i>DLEU</i>
LIM54		<i>CDKN2A/B</i> (homozygote)
LIM95	<i>IKZF1</i>	<i>CDKN2A/B</i> (homozygote), <i>JAK1</i> , <i>RB1</i>

V.5.5.4. Evaluation de la complexité génomique par OGM

La complexité génomique est définie par le nombre d'anomalies cryptiques ou non identifiées respectivement par la FISH et le caryotype. Deux seuils de complexité sont décrits pour les LAL avec un premier à partir de 3 anomalies (complexe) et un deuxième pour plus de 5 anomalies (très complexe). L'OGM a précisé la nomenclature de nombreuses anomalies par rapport au caryotype et en a identifié de nouvelles. Cela a permis de redéfinir le niveau de complexité.

Nous avons donc comparé le niveau de complexité selon les résultats de cytogénétique et de l'OGM. Cette comparaison a été effectuée sur les 29 échantillons pour lesquels des résultats de cytogénétique et d'OGM étaient obtenus (Tableau 14).

Sans distinction entre les deux seuils de complexité, **les résultats de cytogénétique et d'OGM étaient complexes dans 45% des cas (n=13) et 69% des cas (n=20)** respectivement. La cytogénétique retrouvait un caryotype complexe dans 14% des cas (n=4) et très complexe dans 31% des cas (n=9). Les résultats OGM étaient complexes dans 28% des cas (n=8) et très complexes dans 41% des cas (n=12)

Un niveau de complexité identique entre la cytogénétique et l'OGM a été retrouvé dans 66% des cas (n=19). Une **complexité supérieure a été obtenue par OGM dans 31% des cas (n=9)** et pour deux cas (LIM45 et 57) les résultats OGM étaient très complexes alors que la cytogénétique n'était pas complexe. A l'inverse, une complexité inférieure a été obtenue par OGM pour 1 seul cas (3%), LIM25.

Tableau 15 : Complexité génomique selon la cytogénétique conventionnelle ou de l'OGM.

		Complexité génomique selon la cytogénétique (caryotype/FISH) et l'OGM																												
		LAL-B																								LAL-T				
ID		8	9	14	17	25	30	32	34	35	37	45	46	57	68	69	70	74	87	91	92	102	104	107	116	139	143	21	26	113
Caryotype/FISH		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
OGM		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Nombre d'anomalies ■ ≥5 ■ 3-4 ■ <3

VI. Discussion

Grâce aux techniques hautement résolutive, le nombre d'entités génétiques distinctes des LAL et particulièrement des LAL-B a fortement augmenté au cours des dix dernières années. Etant associées à des pronostics différents, la plupart ont déjà été ajoutées au sein des classifications internationales (OMS et ICC). En plus des entités génétiques, définies par une anomalie primaire, de multiples altérations secondaires récurrentes sont également de plus en plus décrites avec un impact pronostique associé. L'évaluation exhaustive du bilan génétique des LAL est donc primordial pour la stratification pronostique et la prise en charge des patients. Cependant, le nombre très important d'anomalies différentes et leur hétérogénéité (anomalies du nombre de copies (CNV), grands et petits réarrangements de structures (SV) et mutations) nécessite l'association de plusieurs techniques pour les détecter. De plus, la majorité des laboratoires d'hématologie ne disposent pas des techniques à haute résolution et sont donc dans l'incapacité de rendre des résultats exhaustifs.

Pour répondre à cette problématique, nous avons considéré l'OGM comme une alternative intéressante pour le laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges et nous avons réalisé cette étude afin de confirmer les performances décrites par le fournisseur et dans la littérature mais également de valider la faisabilité de cette technique en pratique.

La faisabilité de l'analyse OGM dépend tout d'abord de sa réalisation technique, divisée en phases pré-analytique, analytique et post-analytique, et ensuite de l'interprétation des données obtenues afin d'obtenir des résultats informatifs. N'ayant pas à disposition les réactifs nécessaires à l'extraction et au marquage de l'ADN ainsi que l'automate permettant la construction optique du génome, les différentes étapes analytiques ont été effectuées directement par les équipes des laboratoires du fournisseur (plateforme Gentyane à Clermont-Ferrand et Data Services Lab de San Diego, US). Nous n'avons donc pas pu évaluer la faisabilité de la phase analytique en routine pendant cette étude. Nous avons à l'inverse ciblé notre étude sur les deux étapes critiques à la faisabilité technique et à l'obtention de résultats informatifs : la phase pré-analytique et l'interprétation.

VI.1. Bilan de l'étape de stockage spécifique à l'OGM

La phase pré-analytique est déterminante pour obtenir un ADN de très haut poids moléculaire qui est lui-même nécessaire à l'obtention de données brutes de bonne qualité. En effet, même avec une extraction adaptée, les fragments d'ADN obtenus ne seront pas compatibles avec une analyse fiable si le stockage des prélèvements n'est pas adapté à la conservation de l'ADN sans fragmentation. Pour limiter la dégradation de l'ADN, la solution la plus simple théoriquement serait de réaliser l'extraction sur le prélèvement frais mais cela n'est pas adapté au fonctionnement de notre laboratoire en pratique.

Les différents stockages des prélèvements médullaires et sanguins que nous avons réalisés ont tous permis l'obtention d'un ADN de bonne qualité lorsque les conditions recommandées par le fournisseur étaient respectées au niveau du volume de prélèvement ou de la quantité de cellules. De plus, nous avons pu mettre en évidence qu'une quantité de cellules plus faible (entre 1 et 1,5 millions) peut permettre d'obtenir des résultats. S'il n'est pas possible d'obtenir un prélèvement plus riche, nous recommandons donc de réaliser tout de même l'analyse dans ces conditions non optimales puisque les résultats obtenus pour les deux échantillons concernés ont apporté des informations additionnelles par rapport aux autres techniques.

Pour la mise en place en routine, nous avons mis au point un **protocole de stockage à partir des prélèvements médullaires en milieu de culture adapté à notre pratique**. Il ne nécessite qu'environ 10 à 30 minutes de temps technique en fonction du nombre d'échantillons à stocker et a donc pu être inséré dans la routine et réalisé par les techniciennes du secteur de cytogénétique. L'obtention d'une bonne qualité d'ADN, pour les échantillons analysés par la suite, a permis de valider la reproductibilité de ce protocole. Cette pratique de stockage est maintenant incluse dans notre pratique de routine pour les LAL et elle a été élargie à d'autres indications où l'OGM a un intérêt (par exemple LAM, SMD de haut risque, caryotypes complexes, échec du caryotype ...).

En l'absence de prélèvement médullaire par échec d'aspiration, nous avons également mis en évidence qu'un **prélèvement sanguin infiltré permet d'obtenir des résultats informatifs** alors que les analyses de cytogénétiques après culture du sang infiltré ne sont souvent pas informatives. Il sera intéressant par la suite de déterminer si un prélèvement sanguin faiblement infiltré peut permettre l'obtention de résultats, au moins suffisamment informatifs pour la prise en charge, en cas d'échec de prélèvement médullaire.

Au final, nous avons confirmé la **faisabilité d'un protocole de stockage** adapté à l'analyse OGM qui est maintenant complètement **intégré à notre pratique**.

VI.2. Bilan de l'étape d'interprétation de l'OGM

VI.2.1. Réglage des filtres

Comme pour toute technique à haute résolution, l'analyse bio-informatique des données brutes est nécessaire pour obtenir des données interprétables. L'avantage de l'OGM par rapport aux techniques de type NGS est que la bio-informatique est incluse dans le logiciel du fournisseur, Bionano Access, avec deux pipelines différentes, RVA et De Novo, réalisables séparément ou en association. La mise en place de l'analyse OGM en pratique ne requiert donc pas d'avoir des compétences en bio-informatique.

Après analyse bio-informatique des données brutes par le pipeline, la quantité très importante d'anomalies détectées peut rendre l'étape d'interprétation complexe. Toutes les anomalies détectées par le pipeline sont annotées et des paramètres jugent de leur fiabilité plus ou moins élevée (en particulier : confiance, profondeur et VAF). Comme pour les autres techniques nécessitant une analyse bio-informatique, des filtres, dont le rôle est de masquer les anomalies considérées comme des faux-positifs par le pipeline, sont appliqués afin de faciliter l'interprétation pour l'analyseur. A l'inverse, le risque avec ces filtres est de masquer trop d'anomalies dont certaines sont vraies et d'induire ainsi des faux-négatifs. L'avantage de l'OGM est que ces filtres ne sont pas verrouillés. Il est donc possible de choisir un réglage adapté en fonction des indications mais également de modifier facilement le réglage pendant l'interprétation si l'analyseur estime qu'une anomalie réelle a pu être détectée mais n'est pas visualisée à cause des filtres.

Par comparaison des résultats obtenus par OGM à ceux des techniques de référence, cette étude nous a permis d'optimiser les filtres recommandés par le fournisseur à notre indication. Au début de l'étude, le seul réglage différent du fournisseur concernait le filtre « % control database » puisque nous souhaitions visualiser uniquement les anomalies non rares, c'est-à-dire détectées dans 0% de la population de référence. Nous n'avons manqué aucune anomalie mise en évidence par les techniques de référence à cause de ce réglage. Cependant, après

observation d'une discordance concernant la visualisation d'une délétion de *IKZF1* entre les deux pipelines à cause du réglage, nous avons finalement choisi de visualiser les anomalies détectées dans 0 à 1% de la population de référence. Au cours de l'étude, le réglage de trois autres filtres (« SV masking filter », « CNV masking filter » et confiance des aneuploïdies) a été modifié en les désactivant de façon permanente après avoir prouvé que le réglage initial entraînait un risque non négligeable de faux négatif. Enfin, nous avons identifié qu'il peut être nécessaire de désactiver les filtres de confiance pour les translocations inter-chromosomiques et les CNV si l'analyseur estime qu'il y a un risque de faux-négatif. Les réglages que nous avons validé suite à cette étude sont concordants avec ceux recommandés pour les hémopathies par *Levy et al* en 2024 (212) à l'exception du réglage de la confiance des aneuploïdies pour lequel l'équipe précise tout de même qu'une modification au cas par cas peut être nécessaire (Tableau 16). Nos réglages de filtres sont également concordants à ceux utilisés par les autres équipes francophones du consortium FROGG utilisant l'OGM.

Au final, **un réglage adapté des filtres limite la complexité de l'interprétation** en réduisant le nombre d'anomalies à vérifier sans augmenter le risque de faux-négatifs. Il est possible de **créer un « profil » avec le réglage des différents filtres** sur Bionano Access. Nous recommandons donc de créer ce profil afin d'appliquer le réglage adapté facilement au début de l'interprétation de chaque analyse.

Tableau 16 : Comparaison des réglages de filtres validés dans notre étude par rapport aux recommandations du fournisseur et de *Levy et al*.

Rouge = réglage différent des recommandations du fournisseur. * = réglage à modifier au cas par cas.

Fitres	Recommandation fournisseur	Réglages choisis initialement	Réglages validés suite à l'étude	Réglages proposés par Levy et al
SV Confidence				
Insertion	0	0	0	0
Deletion	0	0	0	0
Inversion	0,02	0,02	0,02	0,02
Duplication	0	0	0	0
Intra-fusion	0,02	0,02	0,02	0,02
Inter-translocation	0,02	0,02	0,02*	0,02
SV filters				
SV masking filter	Non-Masked only	Non-Masked only	All SV	All SV
VAF filter	0 à 1	0 à 1	0 à 1	0 à 1
Variant Annotation Filters				
% control database	100	0	1	1
Self molecule count	5	5	5	5
Copy Number Variant Filters				
Confidence	0,99	0,99	0,99*	0,99*
Size	500 kb	500 kb	500 kb	500 kb
CNV masking filter	Non-Masked only	Non-Masked only	All CNV	All CNV
Aneuploidy filters				
Confidence	0,95	0,95	0	0,95*
Feature Filters				
SV precision	12 kb	12 kb	50 kb	25-50 kb
CNV precision	500 kb	500 kb	500 kb	≥ 10 kb

VI.2.2. Identification et interprétation des anomalies

Avant de commencer l'interprétation, il est obligatoire de regarder les rapports de contrôles qualités. Les CQ relatifs aux molécules (profondeur, couverture, N50 et répartition des labels) permettent de vérifier que la qualité des données brutes est suffisante et donc que l'analyse sera informative. L'interprétation pourra être réalisée si ces CQ sont corrects ou dans le seuil de tolérance. Dans le cas où un ou plusieurs CQ est en dehors du seuil de tolérance, il est conseillé de recommencer la technique à partir d'un autre aliquot, si disponible. Dans le cas contraire, l'interprétation pourra être effectuée mais l'impact potentiel de la qualité non optimale sur l'informativité de l'analyse devra être précisé sur le compte rendu. Les CQ relatifs à l'analyse bio-informatique par le pipeline sont importants pour mettre en évidence la présence d'un bruit de fond non négligeable pour les CNV pouvant impacter leur interprétation. Dans ce cas, il faudra interpréter les CNV avec précaution et effectuer des vérifications par le caryotype ou la FISH si nécessaire. De plus, la diminution probable de l'informativité concernant les CNV devra également être mentionnée sur le compte-rendu.

L'interprétation peut être difficile en cas de complexité et d'hétérogénéité des anomalies chromosomiques détectées. Pour pallier à cette problématique, le logiciel Bionano Access dispose de plusieurs interfaces permettant chacune une visualisation adaptée aux différents types d'anomalies (SV et CNV). Un des objectifs de cette étude était donc de confirmer en pratique la facilité d'utilisation de ces différentes interfaces et leur pertinence pour l'identification et l'interprétation correcte des différentes altérations.

Les documents explicatifs du fournisseur permettent une prise en main assez aisée du logiciel et expliquent comment visualiser les anomalies et les interpréter correctement. L'interface Circos plot permet d'avoir une vue d'ensemble sur toutes les anomalies détectées, comme le caryotype. Il est cependant nécessaire de visualiser les anomalies sur l'interface adaptée (Genome browser ou Whole genome) afin d'avoir plus de détails (annotations et alignement sur le génome de référence) pour les interpréter comme vrais ou faux-positifs. Les 32 échantillons analysés nous ont permis de visualiser quasiment tous les types d'anomalies détectables par OGM et donc de mettre au point des recommandations pour considérer les anomalies comme vraies :

- Une confiance élevée, une VAF supérieure à 5% et une profondeur supérieure à 10 molécules permettent de considérer les SV de petite taille (<500kb) sans réarrangement et les CNV comme vrais. En effet, aucun faux-positif n'a été identifié dans cette situation.
- Pour les aneuploïdies, une confiance élevée (>0,95) est associée à de réels gains ou pertes chromosomiques mais il est nécessaire de vérifier que les gains ou pertes concernent l'entièreté du chromosome. Dans le cas contraire, l'anomalie n'est pas interprétée comme une aneuploïdie mais comme un CNV. Pour les aneuploïdies du chromosome Y, en revanche, la vérification du profil CNV est obligatoire peu importe la confiance. Les aneuploïdies détectées à une confiance plus faible peuvent être considérées comme vraies si le profil CNV est concordant. En cas de doute, nous recommandons de confirmer l'aneuploïdie au caryotype ou en FISH.
- Pour les SV avec réarrangement équilibré (translocation inter- ou intra-chromosomique), les paramètres précédents (confiance, VAF et profondeur) ne sont pas toujours corrélés à la fiabilité de l'anomalie détectée. La distinction entre les vrais réarrangements et ceux artefactuels est cependant aisée par la vérification de l'alignement sur le génome de référence et la présence d'un nombre de molécules chimériques adapté.

- Les translocations avec un alignement correct sur le génome mais une seule molécule chimérique doivent également être considérées comme vraies si elles sont associées à un ou plusieurs CNV dans le cadre d'un réarrangement déséquilibré. L'interface Circos plot permet de voir rapidement l'association entre une translocation et un CNV.

Des vérifications supplémentaires sont nécessaires pour les CNV pour faire la distinction entre un CNV simple et un CNV complexe (faisant parti d'un réarrangement déséquilibré). En effet, l'OGM a de grandes difficultés pour détecter des réarrangements impliquant les régions centromériques et télomériques. Notre étude a confirmé cette limite et tout particulièrement lorsque les deux points de cassure sont centromériques (0% d'informativité) ou lorsque des points de cassure centromérique et télomérique sont associés (33% d'informativité). La comparaison avec les résultats obtenus en cytogénétique nous a permis de mettre en évidence les situations dans lesquelles l'interprétation des CNV est délicate et de proposer des recommandations :

- un CNV complexe (translocation déséquilibrée ou isochromosome) doit être suspecté en l'absence d'une translocation associée dans les situations suivantes : i) présence d'un ou plusieurs CNV (gain et/ou perte) sur la totalité d'un bras, court ou long, d'un ou plusieurs chromosomes ; ii) présence d'un gain d'une partie terminale d'un chromosome.

- Des profils CNV particuliers permettent de suspecter un isochromosome plutôt qu'une translocation déséquilibrée. Si le profil est en faveur d'un isochromosome classique, la confirmation de l'anomalie n'est pas obligatoire, sinon le caryotype et/ou la FISH sont nécessaires pour confirmer la caractérisation.

- En l'absence d'identification précise, la nomenclature utilisée ne fera apparaître que la notion de gain ou de perte chromosomique.

Malgré les filtres, le nombre d'anomalie à interpréter reste très important. La majorité de ces anomalies sont des SV de petite taille. Si elles n'impliquent pas un gène récurrent, ces altérations ne sont pas considérées comme ayant un intérêt clinique. Pour faciliter l'interprétation et limiter le temps nécessaire, nous recommandons d'utiliser des beds files pour réduire le nombre de petits SV à visualiser sur l'interface Genome browser. L'utilisation d'un premier bed file spécifique aux gènes récurrents dans les LAL permet de rapidement identifier les petits SV d'intérêt. De plus, l'utilisation également d'un bed file avec les gènes impliqués dans les cancers de façon générale peut également être utilisé pour identifier des anomalies d'intérêt potentiel. Ces dernières ne seront rendues que si des preuves de leur intérêt dans les LAL sont décrites dans la littérature.

La visualisation de tous les autres SV et CNV (incluant les aneuploïdies) est en revanche nécessaire, respectivement sur les interfaces Genome browser et Whole genome. Lors de cette visualisation, il est important de regarder les gènes impliqués selon l'annotation du pipeline. Nous recommandons tout de même une vérification manuelle par l'affichage des gènes sur le génome de référence afin de visualiser les gènes présents à proximité de l'anomalie, non annotés, mais également d'identifier des anomalies intragéniques ou encore la localisation des points de cassure par rapport aux gènes.

Comme les autres équipes ayant utilisé l'OGM dans les LAL, cette étude confirme la nécessité de réaliser le pipeline De Novo en plus du RVA pour pallier à deux limites :

- L'absence de couverture de la région *PAR1* avec le pipeline RVA. En revanche, cette région est bien couverte par le pipeline De Novo ce qui permet de visualiser les altérations, notamment celles impliquant le gène *CRLF2*.

- L'absence d'identification d'une ploïdie anormale. Dans cette situation, le profil CNV obtenu ne sera pas fiable suite à une mauvaise normalisation du nombre de copies. Cela sera également le cas avec le pipeline De Novo mais deux outils présents uniquement sur ce pipeline peuvent permettre d'identifier, ou à minima de suspecter, une modification de la ploïdie : la détection des LOH et la représentation des moyennes des VAF. N'ayant eu qu'un seul cas dans cette situation, nous recommandons pour l'instant de réaliser un caryotype et des sondes FISH si nécessaire pour confirmer la modification de la ploïdie.

Cependant, le pipeline De Novo est moins sensible. Pour qu'il soit informatif (limite de détection > 15-20%), il faut une infiltration suffisante du prélèvement (>30-40%). Dans le cas contraire, nous recommandons de rechercher une anomalie de *CRLF2* par une autre technique (FISH ou RT-MLPA).

Une fois les vrais positifs identifiés et les vérifications effectuées, l'étape suivante consiste à déterminer les anomalies d'intérêt clinique. Il est optionnel à cette étape de réutiliser les bed files afin de vérifier que toutes les anomalies impactant un gène récurrent dans les LAL ont été prises en compte. Nous recommandons, en accord avec *Levy et al*, de prendre en compte :

- Toutes les aneuploïdies et tous les réarrangements, équilibrés ou déséquilibrés.
- Les CNV simples d'une taille supérieure à 5Mb et ceux d'une taille inférieure si au moins un gène récurrent est impacté.
- Les petits SV uniquement s'ils impactent un ou plusieurs gènes récurrents.

L'étape finale de l'interprétation consiste à faire la description des anomalies sélectionnées selon la nomenclature. Pour les SV et les aneuploïdies, nous avons tout d'abord utilisé une nomenclature adaptée de celle du caryotype selon l'ISCN alors que pour les CNV, la nomenclature de la CGH selon l'ISCN a été utilisée. Nous avons ensuite suivi les recommandations de l'ISCN spécifiques à la nomenclature de l'OGM lorsqu'elles sont parues (215).

Cette étude nous a au final permis de mettre au point une **méthode d'interprétation fiable et reproductible** (Figure 54). Nous estimons que cette méthode permet de **faciliter l'analyse et l'interprétation des anomalies détectées par OGM**. La durée requise à l'interprétation est très variable en fonction de la complexité des cas (de quelques heures à 2 jours environ). En comparaison, plusieurs jours sont nécessaires pour classer et interpréter un caryotype complexe ainsi qu'analyser les nombreuses sondes FISH nécessaires.

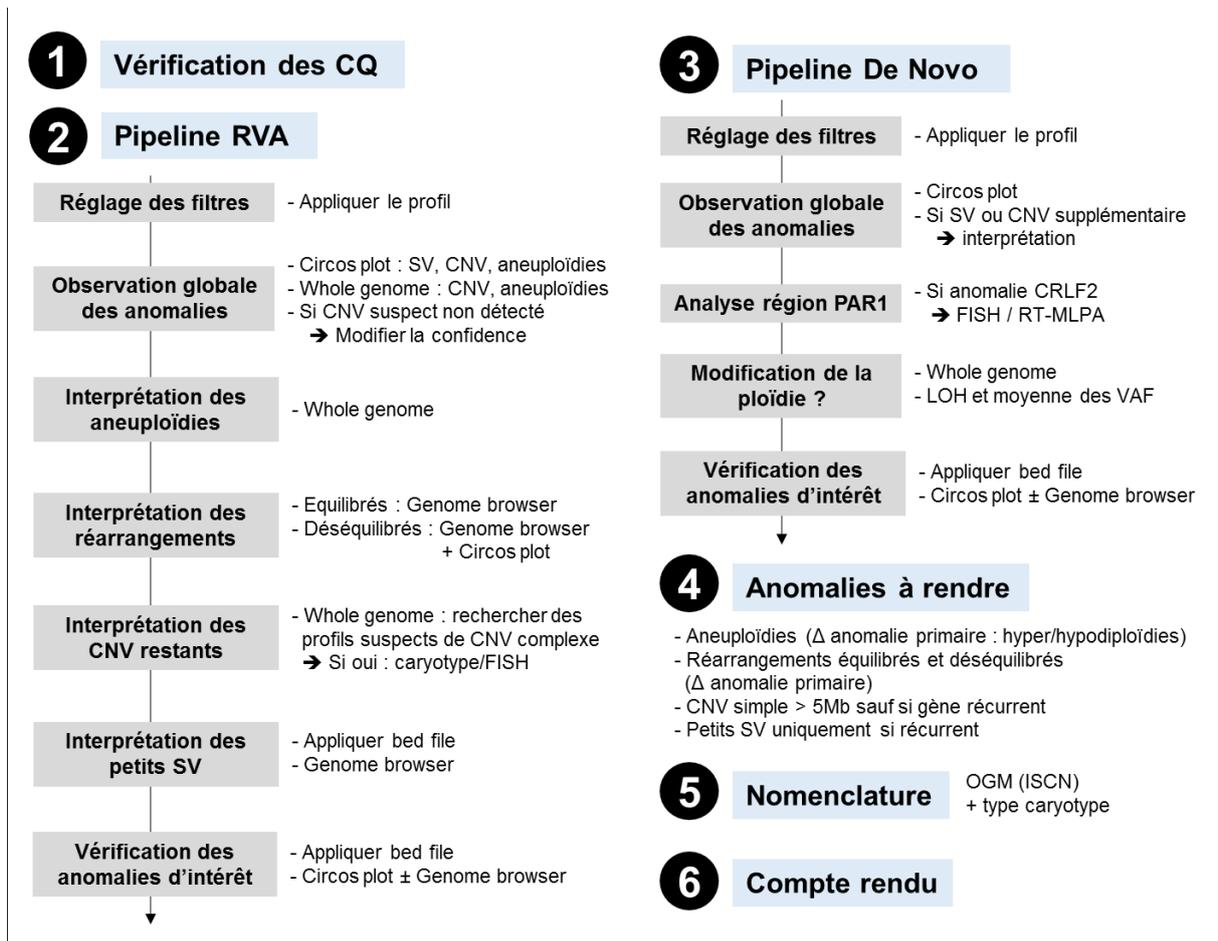


Figure 54 : Organigramme d'interprétation de l'analyse OGM proposé pour les LAL.

VI.2.3. Proposition de compte-rendu

L'analyse OGM des LAL détecte les nombreuses altérations chromosomiques des LAL. Il est donc important d'avoir un compte-rendu adapté permettant au clinicien de visualiser rapidement et facilement les informations relatives au pronostic et ayant un impact sur la prise en charge. Nous avons élaboré une trame de compte rendu qui a été améliorée tout au long de l'étude. Les différents éléments que nous estimons être nécessaires au compte rendu sont les suivants :

- Informations liées au prélèvements.
- Algorithme d'analyse (RVA ± De Novo), profondeur et critère qualité (optimal ou non).
- Résultat : Caryotype adapté aux résultats OGM et anomalies cryptiques récurrentes (selon la nomenclature OGM).
- Interprétation : Description des anomalies identifiées avec les gènes impliqués. Comparaison avec les résultats du caryotype et/ou de la FISH si réalisés.
- Conclusion : Pronostic associé aux anomalies détectées.
- Informativité de la technique dans l'indication.
- Annexe technique et méthodologique : méthode d'analyse, anomalies rapportées, limites de la technique.

Une trame de compte rendu avec ces éléments a déjà été créé dans le logiciel GLIMS. Nous aimerions également inclure la possibilité de visualiser une image du Circos plot, avec uniquement les anomalies d'intérêt.

VI.3. Bilan de l'informativité et des performances de l'analyse OGM

L'OGM nous a permis d'obtenir des résultats pour la quasi-totalité des échantillons avec un taux d'échec inférieur à celui du caryotype (6% contre 9% respectivement). Les échantillons en échec n'étaient pas les mêmes pour les deux techniques qui sont donc complémentaires. Cela montre l'importance de conserver la réalisation du caryotype en parallèle de l'OGM.

Concernant la détection des anomalies primaires, la sensibilité de l'OGM était de 100% pour les LAL-B avec la détection de toutes les anomalies de la ploïdie et tous les réarrangements récurrents identifiés par une autre technique. Pour les LAL-T, la sensibilité était également de 100% lorsque l'anomalie primaire était un réarrangement. Pour LIM26, l'OGM ne permet pas de détecter une surexpression et aucun réarrangement n'a été identifié pour expliquer la surexpression de *HOXA9* par aucune des autres techniques.

Concernant la détection des délétions secondaires pronostiques des LAL-B, une sensibilité et une spécificité de 100% ont été obtenues par rapport à la MLPA et la PCR multiplex. La distinction entre les délétions mono-alléliques et bi-alléliques était également concordante. A l'exception de *EBF1*, au moins une délétion sur toutes celles pronostiques (*IKZF1*, *CDKN2A/B*, *PAX5*, *ETV6*, *RB1*, *BTG1* et *CRLF2*) a été détectée par OGM. Cela confirme son informativité exhaustive pour ce type d'anomalie. De plus, la forte résolution de l'OGM a permis une estimation des points de cassure pour les délétions intragéniques cohérente avec les résultats de PCR multiplex.

De façon plus globale, l'OGM a montré une sensibilité supérieure à celle du caryotype et de la FISH pour la détection des anomalies clonales. En effet, en excluant les échecs pour les trois techniques, au moins une anomalie clonale a été détectée dans 100% des échantillons par l'OGM contre 90% pour le caryotype et 82% pour la FISH. En plus de la sensibilité, le pourcentage de clonalité de l'OGM était également largement supérieur à celui du caryotype (78% contre 50,5%). Par comparaison des pourcentages de clonalité de l'OGM et de la FISH, nous avons pu montrer la fiabilité de la VAF estimée par l'OGM. Les résultats de l'OGM étaient concordants à ceux du caryotype pour 94% des échantillons. Cependant, sur la totalité des anomalies identifiées au caryotype pour tous les échantillons (environ 185), seulement deux n'ont pas été détectées par l'OGM. On peut donc estimer une sensibilité de 99% de l'OGM par rapport au caryotype. A l'inverse, plusieurs anomalies non cryptiques détectées par l'OGM n'avaient pas été identifiées au caryotype. Toutes ces anomalies ayant été confirmées par une autre technique, la spécificité de l'OGM pour les anomalies non cryptiques est de 100%.

Comme attendu, nous avons confirmé que la résolution de l'OGM est l'avantage le plus important par rapport au caryotype. En effet, l'OGM a permis de détecter des anomalies additionnelles non cryptiques dans 28% des échantillons et de décrire des anomalies non élucidées au caryotype (principalement des marqueurs et des additions de matériel) dans 59% des échantillons. Pour ces deux raisons, l'évaluation de la complexité génomique par OGM est plus complète et fiable que par le caryotype. La détermination des points de cassure est complexe au caryotype puisqu'elle dépend de la qualité des chromosomes et de la capacité à distinguer les bandes chromosomiques à l'œil. Plusieurs points de cassure ont alors pu être

précisés par l'OGM. Cela permet de mettre en évidence des gènes impactés par les anomalies ou au contraire de vérifier l'absence d'un réarrangement pronostique. Grâce à cette résolution importante et au fait que l'analyse soit pan-génomique, plusieurs translocations et délétions cryptiques pronostiques, non détectées par les autres techniques, ont également pu être mises en évidence.

Comme attendu, trois limites principales ont été observées pendant cette étude. La première concerne la mauvaise couverture de certaines régions du génome et en particulier les régions centromériques et télomériques. Cela entraîne un défaut d'informativité pour les réarrangements ayant des points de cassure dans ces régions. Si le réarrangement est déséquilibré, le profil CNV permet de suspecter la non-détection d'un réarrangement et le caryotype et/ou la FISH permettront alors la caractérisation de l'anomalie. En revanche, si le réarrangement est équilibré, il n'est pas possible d'anticiper un défaut de détection sans caryotype associé. Pour le seul échantillon concerné par cette situation dans notre série (LIM21 avec réarrangement des chromosomes 4 et 7 non détecté), les résultats OGM étaient très complexes. Nous recommandons alors la réalisation d'un caryotype pour comparaison des résultats OGM si la complexité est importante. La deuxième limite concerne le mauvais alignement sur le génome de référence des régions répétées et polymorphiques. Notre étude a en effet mis en évidence la non détection des réarrangements de *DUX4*. Comme pour notre cas concerné, LIM116, la détection d'une délétion de *ERG*, permet la supposition d'un réarrangement *DUX4* puisqu'elle est associée dans la majorité des cas. Si aucune anomalie primaire n'est identifiée et qu'une délétion de *ERG* n'est pas présente, il sera alors nécessaire de réaliser une analyse RNAseq pour rechercher un réarrangement *DUX4*. La troisième limite concerne la mauvaise normalisation du profil CNV dans les cas avec une modification importante de la ploïdie. La réalisation du pipeline De Novo est donc nécessaire pour tous les échantillons de LAL. On peut ainsi vérifier les profils de LOH et de moyenne de VAF pour identifier ou, à minima, suspecter cette situation et réaliser un caryotype si nécessaire. Des solutions permettent donc de pallier aux limites identifiées.

En accord avec plusieurs autres études sur l'OGM dans les LAL (223–226), nous avons pu confirmer les performances supérieures de cette technique et donc ses avantages par rapport aux techniques conventionnelles et complémentaires : i) la sensibilité est au moins égale voire même supérieure pour la détection de certaines anomalies ; ii) la résolution largement supérieure par rapport au caryotype principalement ; iii) l'analyse pan-génomique par rapport aux techniques ciblées (FISH, MLPA, RT-MLPA...). Nous avons également identifié quelques limites qui nécessitent dans certaines situations la réalisation d'une autre technique en parallèle.

Au final, l'OGM, en une analyse unique, est informatif pour quasiment toutes les anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL alors qu'au moins 5 techniques différentes (caryotype, FISH, RT-MLPA, MLPA et PCR multiplex) sont actuellement nécessaires pour identifier ces anomalies. Cela est particulièrement flagrant pour les LAL-B où l'OGM permet une vue d'ensemble avec l'anomalie primaire, les délétions récurrentes pronostiques et d'intérêt ainsi que la complexité génomique (Figure 55). Pour les LAL-T, l'impact de l'informativité de l'OGM est légèrement moins important puisque de nombreuses anomalies secondaires sont des mutations et donc non détectables par cette technique.

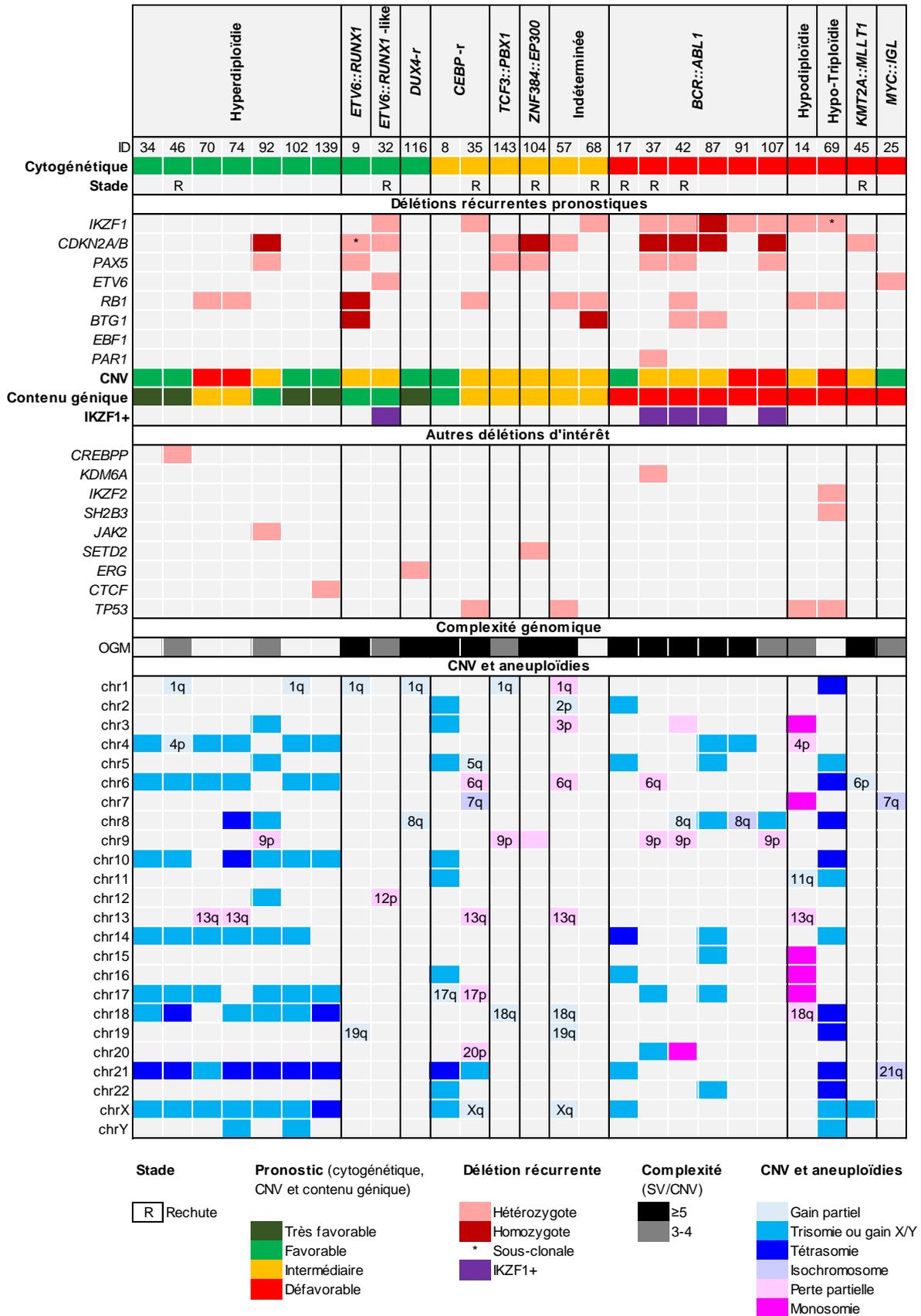


Figure 55 : Vue d'ensemble des anomalies détectées par OGM pour les échantillons de LAL-B.

VI.4. Impact des résultats de l'OGM sur le pronostic dans notre série

La stratification pronostique des LAL-B est actuellement basée principalement sur l'anomalie primaire identifiée. Sur les 28 échantillons de LAL-B, l'OGM a permis la stratification de 14% d'échantillons supplémentaires (n=4) par rapport à l'ensemble des autres techniques : l'anomalie primaire a pu être identifiée pour LIM45 (*KMT2A::MLLT1*) et supposée pour LIM116 (*DUX4-r*) ; les partenaires de *IGH*, impactant sur la valeur pronostique, ont été caractérisés pour LIM14 (*CEBPA*) et LIM35 (*CEBPD*). En prenant en compte uniquement les échantillons pour lesquels l'anomalie primaire n'était pas identifiée ou complètement caractérisée avant l'analyse OGM (n=6), un pronostic a pu être établi pour 67% (n=4). De plus, une anomalie primaire supposée par le RNAseq (*ETV6::MGAT4C*, LIM32) a été confirmée par l'OGM.

Bien que non pris en compte actuellement pour la prise en charge thérapeutique, un impact pronostique est décrit pour certaines délétions récurrentes dans les LAL-B. Le classifieur proposé par *Moorman et al* (146) et validé par *Hamadeh et al* (227) établi un risque au contenu génique global, c'est-à-dire par rapport à l'anomalie primaire (risque cytogénétique) mais également aux délétions (risque CNV, UKALL-CNA), et permet donc de préciser la stratification des patients en 4 catégories de risque au lieu de 3 actuellement. Cette stratification sur le contenu génique total a un impact tout particulièrement pour les LAL-B initialement de pronostic favorable selon la cytogénétique. En effet, celles-ci peuvent être reclassées en risque très favorable ou bien intermédiaire. Les LAL-B de pronostic initial intermédiaire peuvent également être reclassées en risque favorable. En revanche, l'impact du risque associé aux CNV n'est pas encore bien décrit pour les LAL-B de pronostic initial défavorable selon la cytogénétique. L'OGM nous a permis de caractériser le risque associé aux CNV dans la totalité des échantillons analysés, dont plusieurs échantillons pour lesquels la MLPA et/ou la PCR multiplex n'avaient pas été réalisées. Nous avons donc pu définir le risque associé au contenu génique (cytogénétique et CNV). En ne prenant pas en compte LIM30 (suivi de LIM14) et LIM93 (échec OGM), l'OGM a permis de définir une stratification pronostique selon le contenu génique global différente de celle selon l'anomalie primaire cytogénétique pour 31% des patients (8 sur 26 LAL-B) : 5 pronostics favorables sont passés très favorables, 1 pronostic intermédiaire est passé favorable et 2 pronostics favorables sont passés intermédiaires (Figure 55). De plus, d'autres délétions récurrentes associées à la rechute ou au risque de rechute ont pu être identifiées grâce à l'OGM pour 11% des échantillons (3 sur 27). Ces trois échantillons (LIM37, 46 et 104) correspondaient effectivement à des rechutes de LAL-B. Ces anomalies associées à un risque de rechute peuvent être présentes dès le diagnostic mais elles sont souvent sous-clonales. Il sera intéressant de voir par la suite si l'OGM permettra la mise en évidence précocement de ces anomalies.

Concernant les LAL-T, l'impact pronostique des anomalies primaires est moins bien établi dans la littérature. En effet, la faible incidence de cette hémopathie et le nombre très important de réarrangements décrits compliquent l'identification d'un pronostic associé à chacun de ces réarrangements. A l'inverse, les altérations secondaires, principalement des mutations mais également des délétions, sont très fréquentes dans les LAL-T. La stratification pronostique des LAL-T est donc actuellement plutôt basée sur ces altérations avec notamment le classifieur NFRP (182) de l'équipe française de l'hôpital Necker et sa version actualisée récemment (184). Cette équipe a également décrit en 2024 l'association de CNV spécifiques (délétion ou gain) et de la complexité génomique à un risque défavorable (185). Le faible nombre d'échantillons de LAL-T dans notre étude (5 analysés en OGM sur 6 au total) ne permet pas de conclure sur l'impact de l'OGM pour la stratification pronostique. Cependant, une anomalie primaire a pu être identifiée grâce à l'OGM pour LIM45 (*MLLT10::DDX3X*) et le pronostic de

ce réarrangement est plutôt décrit comme défavorable. L'analyse OGM a identifié, pour LIM21, des délétions de deux gènes (*NRAS* et *IDH2*) pour lesquels les mutations sont associées à un risque défavorable. Pour LIM95, les résultats OGM seraient associés à un pronostic défavorable, selon *Balducci et al*, de par la présence d'une délétion *IKZF1* et d'une complexité génomique importante avec des chromothripsis. L'OGM pourrait donc avoir un impact important sur la stratification pronostique des LAL-T à l'avenir lorsque les risques associés aux anomalies primaires, aux CNV secondaires et à la complexité génomique seront mieux établis. En revanche, la réalisation d'une technique de type NGS est nécessaire en parallèle pour la détection des mutations.

Au final, l'OGM a un impact majeur sur la stratification pronostique des LAL-B et probable pour les LAL-T. De plus, grâce à ses performances, l'OGM permettra probablement de participer à l'évolution de la stratification pronostique dans les prochaines années.

VI.5. Perspectives et impact de l'OGM dans notre laboratoire

Grâce à cette étude, nous avons confirmé la faisabilité de la technique OGM dans notre laboratoire pour le pré-analytique et l'interprétation. La faisabilité des phases analytiques et post-analytiques n'a en revanche pas pu être déterminée. Pour la partie analytique, nous estimons que les étapes d'extraction et de marquage, selon les protocoles du fournisseur, ne poseront pas de difficulté pour leur réalisation en pratique, à la différence de techniques de type NGS dont les étapes sont beaucoup plus nombreuses et complexes. Plusieurs études internationales (211,223,225,228) ainsi que les laboratoires déjà équipés faisant parti du consortium FROGG confirment également la réalisation relativement aisée d'un point de vue technique de l'analyse OGM. De plus, comme nous disposons uniquement des fonctionnalités limitées à l'interprétation sur le logiciel du fournisseur Bionano Access, le lancement des pipelines pour l'analyse bio-informatique (phase post-analytique) était réalisé par le fournisseur. Cette étape n'est également pas limitante pour l'évaluation de la faisabilité puisque les algorithmes d'analyse sont inclus dans le logiciel.

D'un point de vue pratique, les phases analytiques et post-analytiques nécessitent 4 à 5 jours avec respectivement 3 jours et 1 à 2 jours. Cette durée inclut environ 5 à 6 heures de temps réellement technique et majoritairement des temps d'incubation ou d'acquisition des données. L'implantation de la partie technique nous semble compatible avec l'organisation de notre laboratoire. En effet, l'extraction manuelle et le marquage seront réalisés par les techniciens des secteurs de biologie moléculaire et de cytogénétique respectivement. L'analyse OGM permettra de réduire le nombre de FISH et de RT-MLPA réalisées et donc de répartir les temps techniciens attribués à ces techniques sur l'analyse OGM. L'interprétation sera effectuée par les 4 biologistes intervenant actuellement sur l'interprétation des résultats de cytogénétique et de biologie moléculaire. En simplifiant l'évaluation globale du bilan génétique des LAL et particulièrement la durée importante d'interprétation du caryotype et des sondes FISH, le temps biologiste requis pour l'interprétation devrait être inférieur par rapport à la situation actuelle.

D'un point de vue clinique sur la prise en charge des patients, la durée totale (technique et interprétation) estimée de 5 à 7 jours pour l'analyse OGM est compatible avec la nécessité de rendre des résultats rapidement.

Les résultats de l'étude nous ont permis d'adapter notre organigramme actuel des techniques à réaliser pour l'évaluation du bilan génétique des LAL en incluant l'OGM :

- L'analyse OGM sera réalisée en priorité, à partir du prélèvement médullaire en milieu de culture, avec les deux pipelines pour les LAL-B et LAL-T. Si l'infiltration n'est pas suffisante pour le pipeline De Novo, le caryotype doit être réalisé en plus (pour rechercher une ploïdie anormale) et une anomalie de *CRLF2* doit être recherchée par FISH ou RT-MLPA.
- Le reste du prélèvement sera mis en culture comme actuellement. Après culture, l'étalement et la recherche automatique des métaphases seront toujours réalisés afin de pouvoir faire le caryotype. Ce dernier étant toujours la technique de référence notamment pour les protocoles, il sera toujours analysé en parallèle de l'OGM.
- Une sonde FISH pour la recherche de *BCR::ABL1* pourra être réalisée en parallèle de l'OGM dans le cadre des LAL-B afin d'ajouter des ITK au traitement dès que possible si indiqué. Des FISH complémentaires seront réalisées si nécessaire en fonction des résultats de l'OGM et du caryotype.
- La RT-qPCR sera réalisée si un réarrangement *BCR::ABL1* est identifié pour le suivi. De même, la PCR multiplex sera réalisée si une délétion intragénique de *IKZF1* est détectée afin de vérifier les points de cassure et pouvoir faire le suivi.
- Si une délétion de *ERG* est détectée ou si aucune anomalie primaire n'est identifiée après ces différentes étapes, un RNAseq sera réalisé.
- Pour les LAL-T spécifiquement, une technique complémentaire type NGS sera réalisée comme actuellement pour la recherche des mutations pronostiques. Et si aucune anomalie primaire n'est mise en évidence, il faudra rechercher une surexpression *HOXA9* par qPCR.

En parallèle de cette étude, l'analyse OGM a également été réalisée dans d'autres indications pour lesquelles des études avaient déjà montré un intérêt de l'OGM. Les deux autres indications principalement évaluées pour l'instant sont les LAM (41 échantillons) et les SMD (18 échantillons). Les résultats obtenus ont confirmé l'apport des performances de l'analyse OGM dans ces indications. Toute indication confondue, l'OGM a également permis d'obtenir des résultats dans 90% des échantillons pour lesquels le caryotype était en échec. Au final, l'ensemble des analyses OGM réalisées nous a permis de valider le projet d'internalisation de la technique et nous espérons pouvoir commencer la validation de méthode dès cette fin d'année et rendre des résultats en routine à partir de début 2025. Enfin, une étude pour évaluer l'apport de l'OGM dans les LLC débutera en 2025 dans notre laboratoire grâce à l'obtention d'un financement.

Conclusion

L'intérêt de l'Optical Genome Mapping dans l'évaluation du bilan génétique des LAL était déjà démontré par plusieurs études internationales. Notre étude a confirmé ses performances, en terme de sensibilité et particulièrement de résolution ainsi que ses nombreux avantages par rapport aux techniques conventionnelles. En effet, le caryotype, peu résolutif ne permet pas l'identification des anomalies de petites tailles (<10Mb) et la caractérisation précise des anomalies complexes. La FISH, la RT-MLPA et la MLPA sont résolutive mais ne permettent qu'une détection ciblée. A l'inverse, l'OGM permet en une analyse unique pan-génomique la détection de la quasi-totalité des anomalies chromosomiques récurrentes dans les LAL : aneuploïdies, CNV, réarrangements déséquilibrés de grande taille (>500kb), réarrangements équilibrés mais également SV et CNV de petite taille (>5kb). Quelques limites attendues ont également été confirmées mais les situations dans lesquelles elles peuvent avoir un impact sont facilement identifiables et sont compensées par la réalisation de techniques complémentaires. Des améliorations ont déjà été apportées par le fournisseur et d'autres sont prévues pour réduire au maximum ces limites.

En plus de permettre une évaluation du bilan génétique beaucoup plus exhaustive par rapport aux techniques utilisées en routine, l'OGM simplifie également l'organisation du laboratoire en réduisant le nombre d'analyses différentes requises. Contrairement aux techniques très résolutive basées sur le séquençage, le coût non excessif de l'analyse OGM et sa relative simplicité de réalisation sont compatibles avec une mise en place en routine plus facilement pour de nombreux laboratoires. Dans ce contexte, notre étude nous a surtout permis de confirmer la faisabilité de l'OGM en pratique dans notre laboratoire d'un point de vue pré-analytique et interprétatif. La faisabilité purement technique n'a pas pu être évaluée mais les expériences d'autres laboratoires francophones du consortium FROGG sont favorables à une mise en place technique aisée.

En grande partie grâce aux résultats de cette étude sur les LAL mais également à ceux obtenus dans d'autres indications, l'implantation de la technique OGM au sein de notre laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges a été validée et sa réalisation en routine est prévue pour début 2025.

Références bibliographiques

1. Malard F, Mohty M. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. avr 2020;395(10230):1146-62.
2. Alaggio R, Amador C, Anagnostopoulos I, Attygalle AD, Araujo IB de O, Berti E, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Lymphoid Neoplasms. *Leukemia*. juill 2022;36(7):1720-48.
3. Panorama des cancers en France - édition 2023 - Ref : PANOKFR2023B [Internet]. [cité 16 juill 2024]. Disponible sur: <https://www.e-cancer.fr/Expertises-et-publications/Catalogue-des-publications/Panorama-des-cancers-en-France-edition-2023>
4. Estimations nationales de l'incidence et de la mortalité par cancer en France métropolitaine entre 1990 et 2018. Volume 2 – Hémopathies malignes. Étude à partir des registres des cancers du réseau Francim.
5. Howlader N, Noone AM, Krapcho M, Miller D, Brest A, Yu M, Ruhl J, Tatalovich Z, Mariotto A, Lewis DR, Chen HS, Feuer EJ, Cronin KA (eds). SEER. [cité 22 juill 2024]. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2018, National Cancer Institute. Bethesda, MD, https://seer.cancer.gov/csr/1975_2018/, based on November 2020 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2021. Disponible sur: https://seer.cancer.gov/archive/csr/1975_2018/
6. Schmidt JA, Hornhardt S, Erdmann F, Sánchez-García I, Fischer U, Schüz J, et al. Risk Factors for Childhood Leukemia: Radiation and Beyond. *Front Public Health*. 24 déc 2021;9:805757.
7. Gocho Y, Yang JJ. Genetic defects in hematopoietic transcription factors and predisposition to acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 5 sept 2019;134(10):793-7.
8. Fong C to, Brodeur GM. Down's syndrome and leukemia: Epidemiology, genetics, cytogenetics and mechanisms of leukemogenesis. *Cancer Genetics and Cytogenetics*. sept 1987;28(1):55-76.
9. Mateos MK, Barbaric D, Byatt SA, Sutton R, Marshall GM. Down syndrome and leukemia: insights into leukemogenesis and translational targets. *Transl Pediatr*. avr 2015;4(2):76-92.
10. Athale UH, Puligandla M, Stevenson KE, Asselin B, Clavell LA, Cole PD, et al. Outcome of children and adolescents with Down syndrome treated on Dana-Farber Cancer Institute Acute Lymphoblastic Leukemia Consortium protocols 00-001 and 05-001. *Pediatric Blood & Cancer*. oct 2018;65(10):e27256.
11. Forestier E, Izraeli S, Beverloo B, Haas O, Pession A, Michalová K, et al. Cytogenetic features of acute lymphoblastic and myeloid leukemias in pediatric patients with Down syndrome: an iBFM-SG study. *Blood*. 1 févr 2008;111(3):1575-83.
12. Mullighan CG, Collins-Underwood JR, Phillips LAA, Loudin MG, Liu W, Zhang J, et al. Rearrangement of CRLF2 in B-progenitor- and Down syndrome-associated acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. nov 2009;41(11):1243-6.
13. Harrison CJ, Schwab C. Constitutional abnormalities of chromosome 21 predispose to iAMP21-acute lymphoblastic leukaemia. *European Journal of Medical Genetics*. mars 2016;59(3):162-5.
14. Bloom M, Maciaszek JL, Clark ME, Pui CH, Nichols KE. Recent advances in genetic predisposition to pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Expert Review of Hematology*. 2 janv 2020;13(1):55-70.
15. Matthias P, Rolink AG. Transcriptional networks in developing and mature B cells. *Nat Rev Immunol*. juin 2005;5(6):497-508.
16. Shah S, Schrader KA, Waanders E, Timms AE, Vijai J, Miething C, et al. A recurrent germline PAX5 mutation confers susceptibility to pre-B cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. oct 2013;45(10):1226-31.
17. Merckenschlager M. Ikaros in immune receptor signaling, lymphocyte differentiation, and function. *FEBS Letters*. 15 déc 2010;584(24):4910-4.
18. Churchman ML, Qian M, Te Kronnie G, Zhang R, Yang W, Zhang H, et al. Germline Genetic IKZF1 Variation and Predisposition to Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell*. mai 2018;33(5):937-948.e8.

19. Wang LC, Swat W, Fujiwara Y, Davidson L, Visvader J, Kuo F, et al. The *TEL/ETV6* gene is required specifically for hematopoiesis in the bone marrow. *Genes Dev.* 1 août 1998;12(15):2392-402.
20. Moriyama T, Metzger ML, Wu G, Nishii R, Qian M, Devidas M, et al. Germline genetic variation in *ETV6* and risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia: a systematic genetic study. *The Lancet Oncology.* déc 2015;16(16):1659-66.
21. Kanagal-Shamanna R, Loghavi S, DiNardo CD, Medeiros LJ, Garcia-Manero G, Jabbour E, et al. Bone marrow pathologic abnormalities in familial platelet disorder with propensity for myeloid malignancy and germline *RUNX1* mutation. *Haematologica.* oct 2017;102(10):1661-70.
22. Preudhomme C, Renneville A, Bourdon V, Philippe N, Roche-Lestienne C, Boissel N, et al. High frequency of *RUNX1* biallelic alteration in acute myeloid leukemia secondary to familial platelet disorder. *Blood.* 28 mai 2009;113(22):5583-7.
23. Schlegelberger B, Heller PG. *RUNX1* deficiency (familial platelet disorder with predisposition to myeloid leukemia, FPDMM). *Seminars in Hematology.* avr 2017;54(2):75-80.
24. Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, et al. Noonan Syndrome: Clinical Features, Diagnosis, and Management Guidelines. *Pediatrics.* 1 oct 2010;126(4):746-59.
25. Cavé H, Caye A, Strullu M, Aladjidi N, Vignal C, Ferster A, et al. Acute lymphoblastic leukemia in the context of RASopathies. *European Journal of Medical Genetics.* mars 2016;59(3):173-8.
26. Friedman JM. Neurofibromatosis 1. In: Adam MP, Feldman J, Mirzaa GM, Pagon RA, Wallace SE, Bean LJ, et al., éditeurs. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993 [cité 23 juill 2024]. Disponible sur: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1109/>
27. Shannon KM, O'Connell P, Martin GA, Paderanga D, Olson K, Dinndorf P, et al. Loss of The Normal *NF1* Allele from the Bone Marrow of Children with Type 1 Neurofibromatosis and Malignant Myeloid Disorders. *N Engl J Med.* 3 mars 1994;330(9):597-601.
28. Balgobind BV, Van Vlierberghe P, Van Den Ouweland AMW, Beverloo HB, Terlouw-Kromosoeto JNR, Van Wering ER, et al. Leukemia-associated *NF1* inactivation in patients with pediatric T-ALL and AML lacking evidence for neurofibromatosis. *Blood.* 15 avr 2008;111(8):4322-8.
29. Lane DP. p53, guardian of the genome. *Nature.* juill 1992;358(6381):15-6.
30. Olivier M, Hollstein M, Hainaut P. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology.* 1 janv 2010;2(1):a001008-a001008.
31. Correa H. Li–Fraumeni Syndrome. *J Pediatr Genet.* 13 avr 2016;05(02):084-8.
32. Comeaux EQ, Mullighan CG. *TP53* Mutations in Hypodiploid Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* mars 2017;7(3):a026286.
33. Ripperger T, Schlegelberger B. Acute lymphoblastic leukemia and lymphoma in the context of constitutional mismatch repair deficiency syndrome. *European Journal of Medical Genetics.* mars 2016;59(3):133-42.
34. Suarez F, Mahlaoui N, Canioni D, Andriamanga C, Dubois d'Enghien C, Brousse N, et al. Incidence, Presentation, and Prognosis of Malignancies in Ataxia-Telangiectasia: A Report From the French National Registry of Primary Immune Deficiencies. *JCO.* 10 janv 2015;33(2):202-8.
35. Chrzanowska KH, Gregorek H, Dembowska-Bagińska B, Kalina MA, Digweed M. Nijmegen breakage syndrome (NBS). *Orphanet J Rare Dis.* 2012;7(1):13.
36. Arora H, Chacon AH, Choudhary S, McLeod MP, Meshkov L, Nouri K, et al. Bloom syndrome. *Int J Dermatology.* juill 2014;53(7):798-802.
37. Alter BP. Fanconi anemia and the development of leukemia. *Best Practice & Research Clinical Haematology.* sept 2014;27(3-4):214-21.
38. Pui CH, Nichols KE, Yang JJ. Somatic and germline genomics in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Clin Oncol.* avr 2019;16(4):227-40.
39. Sandoval C, Swift M. Treatment of lymphoid malignancies in patients with ataxia-telangiectasia. *Med Pediatr Oncol.* déc 1998;31(6):491-7.

40. Lage H, Dietel M. Involvement of the DNA mismatch repair system in antineoplastic drug resistance. *Journal of Cancer Research and Clinical Oncology*. 1 avr 1999;125(3-4):156-65.
41. Westdorp H, Kolders S, Hoogerbrugge N, De Vries IJM, Jongmans MCJ, Schreibeit G. Immunotherapy holds the key to cancer treatment and prevention in constitutional mismatch repair deficiency (CMMRD) syndrome. *Cancer Letters*. sept 2017;403:159-64.
42. Porter CC, Druley TE, Erez A, Kuiper RP, Onel K, Schiffman JD, et al. Recommendations for Surveillance for Children with Leukemia-Predisposing Conditions. *Clinical Cancer Research*. 1 juin 2017;23(11):e14-22.
43. Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. juill 1999;234(2):177-86.
44. Xu H, Yang W, Perez-Andreu V, Devidas M, Fan Y, Cheng C, et al. Novel Susceptibility Variants at 10p12.31-12.2 for Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia in Ethnically Diverse Populations. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute*. 15 mai 2013;105(10):733-42.
45. Greaves M. A causal mechanism for childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. août 2018;18(8):471-84.
46. Schäfer D, Olsen M, Lähnemann D, Stanulla M, Slany R, Schmiegelow K, et al. Five percent of healthy newborns have an ETV6-RUNX1 fusion as revealed by DNA-based GIPFEL screening. *Blood*. 15 févr 2018;131(7):821-6.
47. Hauer J, Fischer U, Borkhardt A. Toward prevention of childhood ALL by early-life immune training. *Blood*. 21 oct 2021;138(16):1412-28.
48. Rodríguez-Hernández G, Casado-García A, Isidro-Hernández M, Picard D, Raboso-Gallego J, Alemán-Arteaga S, et al. The Second Oncogenic Hit Determines the Cell Fate of ETV6-RUNX1 Positive Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 15 juill 2021;9:704591.
49. Gayon J. From Mendel to epigenetics: History of genetics. *Comptes Rendus Biologies*. 2 juin 2016;339(7-8):225-30.
50. Vicente-Dueñas C, Hauer J, Cobaleda C, Borkhardt A, Sánchez-García I. Epigenetic Priming in Cancer Initiation. *Trends in Cancer*. juin 2018;4(6):408-17.
51. Raboso-Gallego J, Casado-García A, Isidro-Hernández M, Vicente-Dueñas C. Epigenetic Priming in Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *Front Cell Dev Biol*. 17 juill 2019;7:137.
52. Linet MS, Brown LM, Mbulaiteye SM, Check D, Ostroumova E, Landgren A, et al. International long-term trends and recent patterns in the incidence of leukemias and lymphomas among children and adolescents ages 0–19 years. *Intl Journal of Cancer*. 15 avr 2016;138(8):1862-74.
53. Hjalgrim LL. Birth Weight as a Risk Factor for Childhood Leukemia: A Meta-Analysis of 18 Epidemiologic Studies. *American Journal of Epidemiology*. 15 oct 2003;158(8):724-35.
54. Kutanzi K, Lumen A, Koturbash I, Miousse I. Pediatric Exposures to Ionizing Radiation: Carcinogenic Considerations. *IJERPH*. 28 oct 2016;13(11):1057.
55. Kinlen L. EVIDENCE FOR AN INFECTIVE CAUSE OF CHILDHOOD LEUKAEMIA: COMPARISON OF A SCOTTISH NEW TOWN WITH NUCLEAR REPROCESSING SITES IN BRITAIN. *The Lancet*. déc 1988;332(8624):1323-7.
56. Greaves M. Aetiology of acute leukaemia. *The Lancet*. févr 1997;349(9048):344-9.
57. Martín-Lorenzo A, Hauer J, Vicente-Dueñas C, Auer F, González-Herrero I, García-Ramírez I, et al. Infection Exposure Is a Causal Factor in B-cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia as a Result of *Pax5*-Inherited Susceptibility. *Cancer Discovery*. 1 déc 2015;5(12):1328-43.
58. Rodríguez-Hernández G, Hauer J, Martín-Lorenzo A, Schäfer D, Bartenhagen C, García-Ramírez I, et al. Infection Exposure Promotes *ETV6-RUNX1* Precursor B-cell Leukemia via Impaired H3K4 Demethylases. *Cancer Research*. 15 août 2017;77(16):4365-77.
59. Hwee J, Tait C, Sung L, Kwong JC, Sutradhar R, Pole JD. A systematic review and meta-analysis of the association between childhood infections and the risk of childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Br J Cancer*. janv 2018;118(1):127-37.
60. Bernt KM, Armstrong SA. Leukemia Stem Cells and Human Acute Lymphoblastic Leukemia. *Seminars in Hematology*. janv 2009;46(1):33-8.

61. Pui CH, Robison LL, Look AT. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. mars 2008;371(9617):1030-43.
62. Harrison CJ. The detection and significance of chromosomal abnormalities in childhood acute lymphoblastic leukaemia. *Blood Reviews*. mars 2001;15(1):49-59.
63. Inaba H, Greaves M, Mullighan CG. Acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet*. juin 2013;381(9881):1943-55.
64. Mullighan CG, Goorha S, Radtke I, Miller CB, Coustan-Smith E, Dalton JD, et al. Genome-wide analysis of genetic alterations in acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. avr 2007;446(7137):758-64.
65. Kuiper RP, Schoenmakers EFPM, Van Reijmersdal SV, Hehir-Kwa JY, Van Kessel AG, Van Leeuwen FN, et al. High-resolution genomic profiling of childhood ALL reveals novel recurrent genetic lesions affecting pathways involved in lymphocyte differentiation and cell cycle progression. *Leukemia*. juin 2007;21(6):1258-66.
66. Hunger SP, Mullighan CG. Redefining ALL classification: toward detecting high-risk ALL and implementing precision medicine. *Blood*. 25 juin 2015;125(26):3977-87.
67. Mullighan CG. Molecular genetics of B-precursor acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest*. 1 oct 2012;122(10):3407-15.
68. Tzoneva G, Perez-Garcia A, Carpenter Z, Khiabani H, Tosello V, Allegretta M, et al. Activating mutations in the *NT5C2* nucleotidase gene drive chemotherapy resistance in relapsed ALL. *Nat Med*. mars 2013;19(3):368-71.
69. Li B, Li H, Bai Y, Kirschner-Schwabe R, Yang JJ, Chen Y, et al. Negative feedback–defective *PRPS1* mutants drive thiopurine resistance in relapsed childhood ALL. *Nat Med*. juin 2015;21(6):563-71.
70. Mullighan CG, Zhang J, Kasper LH, Lerach S, Payne-Turner D, Phillips LA, et al. *CREBBP* mutations in relapsed acute lymphoblastic leukaemia. *Nature*. mars 2011;471(7337):235-9.
71. Van Der Zwet JCG, Smits W, Buijs-Gladdines JGCAM, Pieters R, Meijerink JPP. Recurrent *NR3C1* Aberrations at First Diagnosis Relate to Steroid Resistance in Pediatric T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia Patients. *HemaSphere*. janv 2021;5(1):e513.
72. Hof J, Krentz S, Van Schewick C, Körner G, Shalpour S, Rhein P, et al. Mutations and Deletions of the *TP53* Gene Predict Nonresponse to Treatment and Poor Outcome in First Relapse of Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO*. 10 août 2011;29(23):3185-93.
73. Onciu M. Acute Lymphoblastic Leukemia. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. août 2009;23(4):655-74.
74. 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.
75. Bennett JM, Catovsky D, Daniel M, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias FRENCH -A MERICAN -B RITISH (FAB) CO-OPERATIVE GROUP. *Br J Haematol*. août 1976;33(4):451-8.
76. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DAG, Gralnick HR, et al. The Morphological Classification of Acute Lymphoblastic Leukaemia: Concordance among Observers and Clinical Correlations. *Br J Haematol*. avr 1981;47(4):553-61.
77. Harris NL, Jaffe ES, Diebold J, Flandrin G, Muller-Hermelink HK, Vardiman J, et al. World Health Organization Classification of Neoplastic Diseases of the Hematopoietic and Lymphoid Tissues: Report of the Clinical Advisory Committee Meeting—Airlie House, Virginia, November 1997. *JCO*. déc 1999;17(12):3835-49.
78. Kalina T, Flores-Montero J, Van Der Velden VHJ, Martin-Ayuso M, Böttcher S, Ritgen M, et al. EuroFlow standardization of flow cytometer instrument settings and immunophenotyping protocols. *Leukemia*. sept 2012;26(9):1986-2010.

79. Béné MC, Nebe T, Bettelheim P, Buldini B, Bumbea H, Kern W, et al. Immunophenotyping of acute leukemia and lymphoproliferative disorders: a consensus proposal of the European LeukemiaNet Work Package 10. *Leukemia*. avr 2011;25(4):567-74.
80. Vitale A, Guarini A, Ariola C, Meloni G, Perbellini O, Pizzuti M, et al. Absence of prognostic impact of CD13 and/or CD33 antigen expression in adult acute lymphoblastic leukemia. Results of the GIMEMA ALL 0496 trial. *Haematologica*. 1 mars 2007;92(3):342-8.
81. Maury S, Huguet F, Leguay T, Lacombe F, Maynadie M, Girard S, et al. Adverse prognostic significance of CD20 expression in adults with Philadelphia chromosome-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 févr 2010;95(2):324-8.
82. Coustan-Smith E, Mullighan CG, Onciu M, Behm FG, Raimondi SC, Pei D, et al. Early T-cell precursor leukaemia: a subtype of very high-risk acute lymphoblastic leukaemia. *The Lancet Oncology*. févr 2009;10(2):147-56.
83. Bond J, Graux C, Lhermitte L, Lara D, Cluzeau T, Leguay T, et al. Early Response–Based Therapy Stratification Improves Survival in Adult Early Thymic Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia: A Group for Research on Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study. *JCO*. 10 août 2017;35(23):2683-91.
84. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, Dombret H, Doubek M, Fielding A, et al. Management of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 9 mai 2024;143(19):1903-30.
85. 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.
86. Khoury JD, Solary E, Abla O, Akkari Y, Alaggio R, Apperley JF, et al. The 5th edition of the World Health Organization Classification of Haematolymphoid Tumours: Myeloid and Histiocytic/Dendritic Neoplasms. *Leukemia*. juill 2022;36(7):1703-19.
87. Arber DA, Orazi A, Hasserjian RP, Borowitz MJ, Calvo KR, Kvasnicka HM, et al. International Consensus Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemias: integrating morphologic, clinical, and genomic data. *Blood*. 15 sept 2022;140(11):1200-28.
88. Duffield AS, Mullighan CG, Borowitz MJ. International Consensus Classification of acute lymphoblastic leukemia/lymphoma. *Virchows Arch*. janv 2023;482(1):11-26.
89. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *haematol*. 10 sept 2020;105(11):2524-39.
90. Lafage-Pochitaloff M, Baranger L, Hunault M, Cuccuini W, Lefebvre C, Bidet A, et al. Impact of cytogenetic abnormalities in adults with Ph-negative B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 19 oct 2017;130(16):1832-44.
91. Dastugue N, Suci S, Plat G, Speleman F, Cavé H, Girard S, et al. Hyperdiploidy with 58-66 chromosomes in childhood B-acute lymphoblastic leukemia is highly curable: 58951 CLG-EORTC results. *Blood*. 28 mars 2013;121(13):2415-23.
92. Enshaei A, Vora A, Harrison CJ, Moppett J, Moorman AV. Defining low-risk high hyperdiploidy in patients with paediatric acute lymphoblastic leukaemia: a retrospective analysis of data from the UKALL97/99 and UKALL2003 clinical trials. *The Lancet Haematology*. nov 2021;8(11):e828-39.
93. Brady SW, Roberts KG, Gu Z, Shi L, Pounds S, Pei D, et al. The genomic landscape of pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. sept 2022;54(9):1376-89.
94. Inthal A, Zeitlhofer P, Zeginigg M, Morak M, Grausenburger R, Fronkova E, et al. CREBBP HAT domain mutations prevail in relapse cases of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. août 2012;26(8):1797-803.
95. Paulsson K, Lilljebjörn H, Biloglav A, Olsson L, Rissler M, Castor A, et al. The genomic landscape of high hyperdiploid childhood acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. juin 2015;47(6):672-6.
96. Safavi S, Paulsson K. Near-haploid and low-hypodiploid acute lymphoblastic leukemia: two distinct subtypes with consistently poor prognosis. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):420-3.

97. Holmfeldt L, Wei L, Diaz-Flores E, Walsh M, Zhang J, Ding L, et al. The genomic landscape of hypodiploid acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* mars 2013;45(3):242-52.
98. Harrison CJ. An international study of intrachromosomal amplification of chromosome 21 (iAMP21): cytogenetic characterization and outcome. 2014;
99. Harrison CJ. Blood Spotlight on iAMP21 acute lymphoblastic leukemia (ALL), a high-risk pediatric disease. *Blood.* 26 févr 2015;125(9):1383-6.
100. Koleilat A, Smadbeck JB, Zepeda-Mendoza CJ, Williamson CM, Pitel BA, Golden CL, et al. Characterization of unusual iAMP21 B-lymphoblastic leukemia (iAMP21-ALL) from the Mayo Clinic and Children's Oncology Group. *Genes Chromosomes & Cancer.* déc 2022;61(12):710-9.
101. Gao Q, Ryan SL, Iacobucci I, Ghate PS, Cranston RE, Schwab C, et al. The genomic landscape of acute lymphoblastic leukemia with intrachromosomal amplification of chromosome 21. *Blood.* 24 août 2023;142(8):711-23.
102. Ryan SL, Matheson E, Grossmann V, Sinclair P, Bashton M, Schwab C, et al. The role of the RAS pathway in iAMP21-ALL. *Leukemia.* sept 2016;30(9):1824-31.
103. Foà R, Chiaretti S. Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med.* 23 juin 2022;386(25):2399-411.
104. Motlló C, Ribera JM, Morgades M, Granada I, Montesinos P, Mercadal S, et al. Frequency and prognostic significance of additional cytogenetic abnormalities to the Philadelphia chromosome in young and older adults with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia & Lymphoma.* 2 janv 2018;59(1):146-54.
105. Tueur G, Quessada J, De Bie J, Cucchini W, Toujani S, Lefebvre C, et al. Cytogenetics in the management of B-cell acute lymphoblastic leukemia: Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Current Research in Translational Medicine.* oct 2023;71(4):103434.
106. Meyer C, Larghero P, Almeida Lopes B, Burmeister T, Gröger D, Sutton R, et al. The *KMT2A* recombinome of acute leukemias in 2023. *Leukemia.* mai 2023;37(5):988-1005.
107. Richard-Carpentier G, Kantarjian HM, Tang G, Yin CC, Khoury JD, Issa GC, et al. Outcomes of acute lymphoblastic leukemia with *KMT2A* (*MLL*) rearrangement: the MD Anderson experience. *Blood Advances.* 14 déc 2021;5(23):5415-9.
108. Barber KE, Ford AM, Harris RL, Harrison CJ, Moorman AV. *MLL* translocations with concurrent 3' deletions: Interpretation of FISH results. *Genes Chromosomes & Cancer.* nov 2004;41(3):266-71.
109. Andersson AK, Ma J, Wang J, Chen X, Gedman AL, Dang J, et al. The landscape of somatic mutations in infant *MLL*-rearranged acute lymphoblastic leukemias. *Nat Genet.* avr 2015;47(4):330-7.
110. Moorman AV, Barretta E, Butler ER, Ward EJ, Twentyman K, Kirkwood AA, et al. Prognostic impact of chromosomal abnormalities and copy number alterations in adult B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia: a UKALL14 study. *Leukemia.* mars 2022;36(3):625-36.
111. Van Der Sluis IM, De Lorenzo P, Kotecha RS, Attarbaschi A, Escherich G, Nysom K, et al. Blinatumomab Added to Chemotherapy in Infant Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med.* 27 avr 2023;388(17):1572-81.
112. Kotecha RS. Updates in infant acute lymphoblastic leukemia and the potential for targeted therapy. *Hematology.* 9 déc 2022;2022(1):611-7.
113. Raynaud S, Dastugue N, Zoccola D, Shurtleff S, Mathew S, Raimondi S. Cytogenetic abnormalities associated with the t(12;21): a collaborative study of 169 children with t(12;21)-positive acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia.* 1 sept 1999;13(9):1325-30.
114. Barber KE, Harrison CJ, Broadfield ZJ, Stewart ARM, Wright SL, Martineau M, et al. Molecular cytogenetic characterization of *TCF3* (*E2A*) /19p13.3 rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer.* mai 2007;46(5):478-86.
115. Fischer U, Forster M, Rinaldi A, Risch T, Sungalee S, Warnatz HJ, et al. Genomics and drug profiling of fatal *TCF3*-*HLF*-positive acute lymphoblastic leukemia identifies recurrent mutation patterns and therapeutic options. *Nat Genet.* sept 2015;47(9):1020-9.

116. Mouttet B, Vinti L, Ancliff P, Bodmer N, Brethon B, Cario G, et al. Durable remissions in *TCF3-HLF* positive acute lymphoblastic leukemia with blinatumomab and stem cell transplantation. *Haematologica*. juin 2019;104(6):e244-7.
117. Fournier B, Balducci E, Duployez N, Clappier E, Cuccuini W, Arfeuille C, et al. B-ALL With t(5;14)(q31;q32); IGH-IL3 Rearrangement and Eosinophilia: A Comprehensive Analysis of a Peculiar IGH-Rearranged B-ALL. *Front Oncol*. 10 déc 2019;9:1374.
118. Li J, Dai Y, Wu L, Zhang M, Ouyang W, Huang J, et al. Emerging molecular subtypes and therapeutic targets in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Front Med*. juin 2021;15(3):347-71.
119. Lilljebjörn H, Henningsson R, Hyrenius-Wittsten A, Olsson L, Orsmark-Pietras C, Von Palffy S, et al. Identification of ETV6-RUNX1-like and DUX4-rearranged subtypes in paediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 6 juin 2016;7(1):11790.
120. Zhang J, McCastlain K, Yoshihara H, Xu B, Chang Y, Churchman ML, et al. Dereglulation of DUX4 and ERG in acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. déc 2016;48(12):1481-9.
121. Siegele BJ, Stemmer-Rachamimov AO, Lilljebjorn H, Fioretos T, Winters AC, Dal Cin P, et al. N-terminus DUX4 -immunohistochemistry is a reliable methodology for the diagnosis of DUX4 -fused B-lymphoblastic leukemia/lymphoma (N-terminus DUX4 IHC for DUX4 -fused B-ALL). *Genes Chromosomes & Cancer*. août 2022;61(8):449-58.
122. Schinnerl D, Mejstrikova E, Schumich A, Zaliova M, Fortschegger K, Nebral K, et al. CD371 cell surface expression: a unique feature of DUX4 -rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. août 2019;104(8):e352-5.
123. Clappier E, Auclerc MF, Rapion J, Bakkus M, Caye A, Khemiri A, et al. An intragenic ERG deletion is a marker of an oncogenic subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a favorable outcome despite frequent IKZF1 deletions. *Leukemia*. janv 2014;28(1):70-7.
124. Alexander TB, Gu Z, Iacobucci I, Dickerson K, Choi JK, Xu B, et al. The genetic basis and cell of origin of mixed phenotype acute leukaemia. *Nature*. oct 2018;562(7727):373-9.
125. Hirabayashi S, Ohki K, Nakabayashi K, Ichikawa H, Momozawa Y, Okamura K, et al. *ZNF384*-related fusion genes define a subgroup of childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with a characteristic immunotype. *Haematologica*. janv 2017;102(1):118-29.
126. Qian M, Zhang H, Kham SKY, Liu S, Jiang C, Zhao X, et al. Whole-transcriptome sequencing identifies a distinct subtype of acute lymphoblastic leukemia with predominant genomic abnormalities of *EP300* and *CREBBP*. *Genome Res*. févr 2017;27(2):185-95.
127. Ohki K, Kiyokawa N, Saito Y, Hirabayashi S, Nakabayashi K, Ichikawa H, et al. Clinical and molecular characteristics of *MEF2D* fusion-positive B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia in childhood, including a novel translocation resulting in *MEF2D-HNRNPH1* gene fusion. *Haematologica*. janv 2019;104(1):128-37.
128. Boer JM, Valsecchi MG, Hormann FM, Antić Ž, Zaliova M, Schwab C, et al. Favorable outcome of NUTM1-rearranged infant and pediatric B cell precursor acute lymphoblastic leukemia in a collaborative international study. *Leukemia*. oct 2021;35(10):2978-82.
129. Bomken S, Enshaei A, Schwalbe EC, Mikulasova A, Dai Y, Zaka M, et al. Molecular characterization and clinical outcome of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with IGH-MYC rearrangement. *haematol*. 28 avr 2022;108(3):717-31.
130. Jeffries SJ, Jones L, Harrison CJ, Russell LJ. IGH@ translocations co-exist with other primary rearrangements in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 août 2014;99(8):1334-42.
131. Akasaka T, Balasas T, Russell LJ, Sugimoto K ji, Majid A, Walewska R, et al. Five members of the CEBP transcription factor family are targeted by recurrent IGH translocations in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia (BCP-ALL). *Blood*. 15 avr 2007;109(8):3451-61.
132. Li JF, Dai YT, Lilljebjörn H, Shen SH, Cui BW, Bai L, et al. Transcriptional landscape of B cell precursor acute lymphoblastic leukemia based on an international study of 1,223 cases. *Proc Natl Acad Sci USA [Internet]*. 11 déc 2018 [cité 17 juill 2024];115(50). Disponible sur: <https://pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1814397115>

133. Marketa Zaliova, Eliska Potuckova, Julius Lukes, Lucie Winkowska, Julia Starkova, Iveta Janotova, et al. Frequency and prognostic impact of ZEB2 H1038 and Q1072 mutations in childhood B-other acute lymphoblastic leukemia. *haematol.* 4 juin 2020;106(3):886-90.
134. Coyaud E, Struski S, Prade N, Familiades J, Eichner R, Quelen C, et al. Wide diversity of PAX5 alterations in B-ALL: a Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique study. *Blood.* 15 avr 2010;115(15):3089-97.
135. Schwab C, Cranston RE, Ryan SL, Butler E, Winterman E, Hawking Z, et al. Integrative genomic analysis of childhood acute lymphoblastic leukaemia lacking a genetic biomarker in the UKALL2003 clinical trial. *Leukemia.* mars 2023;37(3):529-38.
136. Gu Z, Churchman ML, Roberts KG, Moore I, Zhou X, Nakitandwe J, et al. PAX5-driven subtypes of B-progenitor acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* févr 2019;51(2):296-307.
137. Jia Z, Gu Z. PAX5 alterations in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol.* 25 oct 2022;12:1023606.
138. Passet M, Kim R, Gachet S, Sigaux F, Chaumeil J, Galland A, et al. Concurrent *CDX2 cis*-deregulation and *UBTF::ATXN7L3* fusion define a novel high-risk subtype of B-cell ALL. *Blood.* 16 juin 2022;139(24):3505-18.
139. Passet M, Boissel N, Sigaux F, Saillard C, Bargetzi M, Ba I, et al. PAX5 P80R mutation identifies a novel subtype of B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia with favorable outcome. *Blood.* 17 janv 2019;133(3):280-4.
140. Iacobucci I, Roberts KG. Genetic Alterations and Therapeutic Targeting of Philadelphia-Like Acute Lymphoblastic Leukemia. *Genes.* 1 mai 2021;12(5):687.
141. Den Boer ML, Van Slegtenhorst M, De Menezes RX, Cheek MH, Buijs-Gladdines JG, Peters ST, et al. A subtype of childhood acute lymphoblastic leukaemia with poor treatment outcome: a genome-wide classification study. *The Lancet Oncology.* févr 2009;10(2):125-34.
142. Moorman AV, Schwab C, Winterman E, Hancock J, Castleton A, Cummins M, et al. Adjuvant tyrosine kinase inhibitor therapy improves outcome for children and adolescents with acute lymphoblastic leukaemia who have an ABL-class fusion. *Br J Haematol.* déc 2020;191(5):844-51.
143. Russell LJ, Jones L, Enshaei A, Tonin S, Ryan SL, Eswaran J, et al. Characterisation of the genomic landscape of *CRLF2*-rearranged acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer.* mai 2017;56(5):363-72.
144. Steeghs EMP, Boer JM, Hoogkamer AQ, Boeree A, De Haas V, De Groot-Kruseman HA, et al. Copy number alterations in B-cell development genes, drug resistance, and clinical outcome in pediatric B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Sci Rep.* 15 mars 2019;9(1):4634.
145. Song Y, Fang Q, Mi Y. Prognostic significance of copy number variation in B-cell acute lymphoblastic leukemia. *Front Oncol.* 4 août 2022;12:981036.
146. Moorman AV, Enshaei A, Schwab C, Wade R, Chilton L, Elliott A, et al. A novel integrated cytogenetic and genomic classification refines risk stratification in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 28 août 2014;124(9):1434-44.
147. Stanulla M, Dagdan E, Zaliova M, Möricke A, Palmi C, Cazzaniga G, et al. IKZF1plus Defines a New Minimal Residual Disease-Dependent Very-Poor Prognostic Profile in Pediatric B-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO.* 20 avr 2018;36(12):1240-9.
148. Liu H, Huang Y, Jaing T, Wu K, Chen S, Wang S, et al. Refining risk stratification in paediatric B-ACUTE lymphoblastic leukaemia: Combining *IKZF1^{PLUS}* and Day 15 MRD positivity. *Br J Haematol.* avr 2024;204(4):1344-53.
149. Gupta SK, Bakhshi S, Kamal VK, Gupta R, Sharma P, Pushpam D, et al. Proposal and clinical application of molecular genetic risk scoring system, "MRplus", for BCR-ABL1 negative pediatric B-cell acute lymphoblastic leukemia- report from a single centre. *Leukemia Research.* déc 2021;111:106683.
150. Waanders E, Gu Z, Dobson SM, Antić Ž, Crawford JC, Ma X, et al. Mutational Landscape and Patterns of Clonal Evolution in Relapsed Pediatric Acute Lymphoblastic Leukemia. *Blood Cancer Discovery.* 1 juill 2020;1(1):96-111.

151. Ma X, Edmonson M, Yergeau D, Muzny DM, Hampton OA, Rusch M, et al. Rise and fall of subclones from diagnosis to relapse in pediatric B-acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun.* 19 mars 2015;6(1):6604.
152. Van Vlierberghe P, Ferrando A. The molecular basis of T cell acute lymphoblastic leukemia. *J Clin Invest.* 1 oct 2012;122(10):3398-406.
153. Inaba H, Mullighan CG. Pediatric acute lymphoblastic leukemia. *haematol.* 10 sept 2020;105(11):2524-39.
154. Iacobucci I, Kimura S, Mullighan CG. Biologic and Therapeutic Implications of Genomic Alterations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCM.* 25 août 2021;10(17):3792.
155. Pagliaro L, Chen SJ, Herranz D, Mecucci C, Harrison CJ, Mullighan CG, et al. Acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Rev Dis Primers.* 13 juin 2024;10(1):41.
156. Genescà E, González-Gil C. Latest Contributions of Genomics to T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia (T-ALL). *Cancers.* 17 mai 2022;14(10):2474.
157. Bardelli V, Amiani S, Pierini V, Di Giacomo D, Pierini T, Gorello P, et al. T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: Biomarkers and Their Clinical Usefulness. *Genes.* 23 juill 2021;12(8):1118.
158. Di Giacomo D, La Starza R, Gorello P, Pellanera F, Kalender Atak Z, De Keersmaecker K, et al. 14q32 rearrangements deregulating *BCL11B* mark a distinct subgroup of T and myeloid immature acute leukemia. *Blood.* 19 avr 2021;blood.2020010510.
159. Montefiori LE, Bendig S, Gu Z, Chen X, Pölönen P, Ma X, et al. Enhancer Hijacking Drives Oncogenic *BCL11B* Expression in Lineage-Ambiguous Stem Cell Leukemia. *Cancer Discovery.* 1 nov 2021;11(11):2846-67.
160. Yang L, Chen F, Zhu H, Chen Y, Dong B, Shi M, et al. 3D genome alterations associated with dysregulated *HOXA13* expression in high-risk T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Commun.* 17 juin 2021;12(1):3708.
161. De Bie J, Quessada J, Tueur G, Lefebvre C, Luquet I, Toujani S, et al. Cytogenetics in the management of T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL): Guidelines from the Groupe Francophone de Cytogénétique Hématologique (GFCH). *Current Research in Translational Medicine.* oct 2023;71(4):103431.
162. Brandimarte L, La Starza R, Gianfelici V, Barba G, Pierini V, Di Giacomo D, et al. *DDX3X-MLLT10* fusion in adults with *NOTCH1* positive T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica.* 1 mai 2014;99(5):64-6.
163. Liu Y, Easton J, Shao Y, Maciaszek J, Wang Z, Wilkinson MR, et al. The genomic landscape of pediatric and young adult T-lineage acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* août 2017;49(8):1211-8.
164. La Starza R, Pierini V, Pierini T, Nofrini V, Matteucci C, Amiani S, et al. Design of a Comprehensive Fluorescence in Situ Hybridization Assay for Genetic Classification of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *The Journal of Molecular Diagnostics.* mai 2020;22(5):629-39.
165. Seki M, Kimura S, Ise T, Yoshida K, Ueno H, Nakajima-Takagi Y, et al. Recurrent *SPI1* (*PU.1*) fusions in high-risk pediatric T cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet.* août 2017;49(8):1274-81.
166. Gianni F, Belver L, Ferrando A. The Genetics and Mechanisms of T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cold Spring Harb Perspect Med.* mars 2020;10(3):a035246.
167. La Starza R, Cambò B, Pierini A, Bornhauser B, Montanaro A, Bourquin JP, et al. Venetoclax and Bortezomib in Relapsed/Refractory Early T-Cell Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia. *JCO Precision Oncology.* déc 2019;(3):1-6.
168. Homminga I, Pieters R, Langerak AW, de Rooi JJ, Stubbs A, Verstegen M, et al. Integrated Transcript and Genome Analyses Reveal *NKX2-1* and *MEF2C* as Potential Oncogenes in T Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancer Cell.* avr 2011;19(4):484-97.
169. Clappier E, Cucchini W, Kalota A, Crinquette A, Cayuela JM, Dik WA, et al. The *C-MYB* locus is involved in chromosomal translocation and genomic duplications in human T-cell acute leukemia

- (T-ALL), the translocation defining a new T-ALL subtype in very young children. *Blood*. 15 août 2007;110(4):1251-61.
170. Bardelli V, Amiani S, Pierini V, Pierini T, Di Giacomo D, Gorello P, et al. MYB rearrangements and over-expression in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer*. juill 2021;60(7):482-8.
 171. Follini E, Marchesini M, Roti G. Strategies to Overcome Resistance Mechanisms in T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *IJMS*. 20 juin 2019;20(12):3021.
 172. Zheng R, Li M, Wang S, Liu Y. Advances of target therapy on NOTCH1 signaling pathway in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Exp Hematol Oncol*. déc 2020;9(1):31.
 173. Cordo' V, Van Der Zwet JCG, Canté-Barrett K, Pieters R, Meijerink JPP. T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Roadmap to Targeted Therapies. *Blood Cancer Discovery*. 1 janv 2021;2(1):19-31.
 174. Courtois L, Cabannes-Hamy A, Kim R, Delecourt M, Pinton A, Charbonnier G, et al. IL7-receptor expression is frequent in T-cell acute lymphoblastic leukemia and predicts sensitivity to JAK-inhibition. *Blood*. 6 avr 2023;blood.2022017948.
 175. Graux C, Cools J, Melotte C, Quentmeier H, Ferrando A, Levine R, et al. Fusion of NUP214 to ABL1 on amplified episomes in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Nat Genet*. oct 2004;36(10):1084-9.
 176. Serafin V, Capuzzo G, Milani G, Minuzzo SA, Pinazza M, Bortolozzi R, et al. Glucocorticoid resistance is reverted by LCK inhibition in pediatric T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 21 déc 2017;130(25):2750-61.
 177. Silveira AB, Laranjeira ABA, Rodrigues GOL, Leal PC, Cardoso BA, Barata JT, et al. PI3K inhibition synergizes with glucocorticoids but antagonizes with methotrexate in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Oncotarget*. 30 mai 2015;6(15):13105-18.
 178. Irving J, Matheson E, Minto L, Blair H, Case M, Halsey C, et al. Ras pathway mutations are prevalent in relapsed childhood acute lymphoblastic leukemia and confer sensitivity to MEK inhibition. *Blood*. 27 nov 2014;124(23):3420-30.
 179. Vicente C, Schwab C, Broux M, Geerdens E, Degryse S, Demeyer S, et al. Targeted sequencing identifies associations between IL7R-JAK mutations and epigenetic modulators in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 oct 2015;100(10):1301-10.
 180. Pinton A, Courtois L, Doublet C, Cabannes-Hamy A, Andrieu G, Smith C, et al. *PHF6*-altered T-ALL Harbor Epigenetic Repressive Switch at Bivalent Promoters and Respond to 5-Azacitidine and Venetoclax. *Clinical Cancer Research*. 5 janv 2024;30(1):94-105.
 181. Andrieu GP, Kohn M, Simonin M, Smith CL, Cieslak A, Dourthe MÉ, et al. PRC2 loss of function confers a targetable vulnerability to BET proteins in T-ALL. *Blood*. 11 nov 2021;138(19):1855-69.
 182. Trinquand A, Tanguy-Schmidt A, Ben Abdelali R, Lambert J, Beldjord K, Lengliné E, et al. Toward a *NOTCH1/FBXW7/RAS/PTEN*-Based Oncogenetic Risk Classification of Adult T-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia: A Group for Research in Adult Acute Lymphoblastic Leukemia Study. *JCO*. 1 déc 2013;31(34):4333-42.
 183. Peng LJ, Wang SS, Guo SS, Zhang JJ, Liu YF, Rousseaux S, et al. Optimized outcome prediction of oncogenetic mutations in non-early T-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Immunobiology*. mai 2022;227(3):152205.
 184. Simonin M, Vasseur L, Lengliné E, Lhermitte L, Cabannes-Hamy A, Balsat M, et al. NGS-based stratification refines the risk stratification in T-ALL and identifies a Very High-Risk subgroup of patients. *Blood Journal*. 7 juin 2024;blood.2023023754.
 185. Balducci E, Simonin M, Duployez N, Steimlé T, Dourthe ME, Villarese P, et al. Genomic imbalances analysis provides new insight into prognostic factors in adult and pediatric T-ALL. *Blood Journal*. 22 mars 2024;blood.2023022154.
 186. Simonin M, Lhermitte L, Dourthe ME, Lengliné E, Graux C, Gardel N, et al. *IKZF1* alterations predict poor prognosis in adult and pediatric T-ALL. *Blood*. 25 mars 2021;137(12):1690-4.

187. Tesio M, Trinquand A, Ballerini P, Hypolite G, Lhermitte L, Petit A, et al. Age-related clinical and biological features of PTEN abnormalities in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Leukemia*. déc 2017;31(12):2594-600.
188. Simonin M, Andrieu GP, Birsén R, Balsat M, Hypolite G, Courtois L, et al. Prognostic value and oncogenic landscape of TP53 alterations in adult and pediatric T-ALL. *Blood*. 16 mars 2023;141(11):1353-8.
189. Arniani S, Pierini V, Pellanera F, Matteucci C, Di Giacomo D, Bardelli V, et al. Chromothripsis is a frequent event and underlies typical genetic changes in early T-cell precursor lymphoblastic leukemia in adults. *Leukemia*. nov 2022;36(11):2577-85.
190. Genescà E, Morgades M, González-Gil C, Fuster-Tormo F, Haferlach C, Meggendorfer M, et al. Adverse prognostic impact of complex karyotype (≥ 3 cytogenetic alterations) in adult T-cell acute lymphoblastic leukemia (T-ALL). *Leukemia Research*. oct 2021;109:106612.
191. Ceppi F, Gotti G, Möricke A, Silvestri D, Poyer F, Lentès J, et al. Near-tetraploid T-cell acute lymphoblastic leukaemia in childhood: Results of the AIEOP-BFM ALL studies. *European Journal of Cancer*. nov 2022;175:120-4.
192. Gianfelici V, Chiaretti S, Demeyer S, Di Giacomo F, Messina M, La Starza R, et al. RNA sequencing unravels the genetics of refractory/relapsed T-cell acute lymphoblastic leukemia. Prognostic and therapeutic implications. *Haematologica*. 1 août 2016;101(8):941-50.
193. Richter-Pechańska P, Kunz JB, Hof J, Zimmermann M, Rausch T, Bandapalli OR, et al. Identification of a genetically defined ultra-high-risk group in relapsed pediatric T-lymphoblastic leukemia. *Blood Cancer Journal*. 3 févr 2017;7(2):e523-e523.
194. Van Der Zwet JCG, Cordo' V, Canté-Barrett K, Meijerink JPP. Multi-omic approaches to improve outcome for T-cell acute lymphoblastic leukemia patients. *Advances in Biological Regulation*. déc 2019;74:100647.
195. Hunger SP, Mullighan CG. Acute Lymphoblastic Leukemia in Children. Longo DL, éditeur. *N Engl J Med*. 15 oct 2015;373(16):1541-52.
196. Gökbüget N, Boissel N, Chiaretti S, Dombret H, Doubek M, Fielding A, et al. Diagnosis, prognostic factors, and assessment of ALL in adults: 2024 ELN recommendations from a European expert panel. *Blood*. 9 mai 2024;143(19):1891-902.
197. Kruse, Abdel-Azim, Kim, Ruan, Phan, Ogana, et al. Minimal Residual Disease Detection in Acute Lymphoblastic Leukemia. *IJMS*. 5 févr 2020;21(3):1054.
198. Salvaris R, Fedele PL. Targeted Therapy in Acute Lymphoblastic Leukaemia. *JPM*. 25 juill 2021;11(8):715.
199. Maury S, Chevret S, Thomas X, Heim D, Leguay T, Huguet F, et al. Rituximab in B-Lineage Adult Acute Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. 15 sept 2016;375(11):1044-53.
200. Sasaki K, Kantarjian HM, Morita K, Short NJ, Konopleva M, Jain N, et al. Hyper-CVAD plus ofatumumab versus hyper-CVAD plus rituximab as frontline therapy in adults with Philadelphia chromosome-negative acute lymphoblastic leukemia: A propensity score analysis. *Cancer*. 15 sept 2021;127(18):3381-9.
201. Bride KL, Vincent TL, Im SY, Aplenc R, Barrett DM, Carroll WL, et al. Preclinical efficacy of daratumumab in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood*. 1 mars 2018;131(9):995-9.
202. Kantarjian HM, DeAngelo DJ, Stelljes M, Liedtke M, Stock W, Gökbüget N, et al. Inotuzumab ozogamicin versus standard of care in relapsed or refractory acute lymphoblastic leukemia: Final report and long-term survival follow-up from the randomized, phase 3 INO-VATE study. *Cancer*. 15 juill 2019;125(14):2474-87.
203. Inaba H, Pui CH. Immunotherapy in pediatric acute lymphoblastic leukemia. *Cancer Metastasis Rev*. déc 2019;38(4):595-610.
204. Maude SL, Laetsch TW, Buechner J, Rives S, Boyer M, Bittencourt H, et al. Tisagenlecleucel in Children and Young Adults with B-Cell Lymphoblastic Leukemia. *N Engl J Med*. févr 2018;378(5):439-48.

205. Shah BD, Ghobadi A, Oluwole OO, Logan AC, Boissel N, Cassaday RD, et al. KTE-X19 for relapsed or refractory adult B-cell acute lymphoblastic leukaemia: phase 2 results of the single-arm, open-label, multicentre ZUMA-3 study. *The Lancet*. août 2021;398(10299):491-502.
206. Schultz KR, Bowman WP, Aledo A, Slayton WB, Sather H, Devidas M, et al. Improved Early Event-Free Survival With Imatinib in Philadelphia Chromosome–Positive Acute Lymphoblastic Leukemia: A Children’s Oncology Group Study. *JCO*. 1 nov 2009;27(31):5175-81.
207. Aumann S, Shaulov A, Haran A, Gross Even-Zohar N, Vainstein V, Nachmias B. The Emerging Role of Venetoclax-Based Treatments in Acute Lymphoblastic Leukemia. *IJMS*. 19 sept 2022;23(18):10957.
208. DeAngelo DJ. Nelarabine for the Treatment of Patients with Relapsed or Refractory T-cell Acute Lymphoblastic Leukemia or Lymphoblastic Lymphoma. *Hematology/Oncology Clinics of North America*. oct 2009;23(5):1121-35.
209. Bashton M, Hollis R, Ryan S, Schwab CJ, Moppett J, Harrison CJ, et al. Concordance of copy number abnormality detection using SNP arrays and Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) in acute lymphoblastic leukaemia. *Sci Rep*. 8 janv 2020;10(1):45.
210. Akkari YMN, Baughn LB, Dubuc AM, Smith AC, Mallo M, Dal Cin P, et al. Guiding the global evolution of cytogenetic testing for hematologic malignancies. *Blood*. 14 avr 2022;139(15):2273-84.
211. Cocco N, Anelli L, Zagaria A, Tarantini F, Cumbo C, Tota G, et al. Feasibility of Optical Genome Mapping in Cytogenetic Diagnostics of Hematological Neoplasms: A New Way to Look at DNA. *Diagnostics*. 24 mai 2023;13(11):1841.
212. Levy B, Kanagal-Shamanna R, Sahajpal NS, Neveling K, Rack K, Dewaele B, et al. A framework for the clinical implementation of optical genome mapping in hematologic malignancies. *American J Hematol*. avr 2024;99(4):642-61.
213. bionanogenomics [Internet]. [cité 22 août 2024]. Saphyr™ System for Structural Variation Detection | Bionano. Disponible sur: <https://bionano.com/saphyr-systems/>
214. Chaisson MJP, Sanders AD, Zhao X, Malhotra A, Porubsky D, Rausch T, et al. Multi-platform discovery of haplotype-resolved structural variation in human genomes. *Nat Commun*. 16 avr 2019;10(1):1784.
215. Moore S, McGowan-Jordan J, Smith AC, Rack K, Koehler U, Stevens-Kroef M, et al. Genome Mapping Nomenclature. *Cytogenet Genome Res*. 2023;163(5-6):236-46.
216. Schoumans J, Suela J, Hastings R, Muehlematter D, Rack K, Van Den Berg E, et al. Guidelines for genomic array analysis in acquired haematological neoplastic disorders. *Genes Chromosomes & Cancer*. mai 2016;55(5):480-91.
217. Pellestor F. Chromoanagenesis: cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Mol Cytogenet*. déc 2019;12(1):6.
218. Caye A, Beldjord K, Mass-Malo K, Drunat S, Soulier J, Gandemer V, et al. Breakpoint-specific multiplex polymerase chain reaction allows the detection of IKZF1 intragenic deletions and minimal residual disease monitoring in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica*. 1 avr 2013;98(4):597-601.
219. Schwab CJ, Jones LR, Morrison H, Ryan SL, Yigittop H, Schouten JP, et al. Evaluation of multiplex ligation-dependent probe amplification as a method for the detection of copy number abnormalities in B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia. *Genes Chromosomes & Cancer*. déc 2010;49(12):1104-13.
220. Ribera J, Zamora L, Morgades M, Mallo M, Solanes N, Batlle M, et al. Copy number profiling of adult relapsed B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia reveals potential leukemia progression mechanisms. *Genes Chromosomes & Cancer*. nov 2017;56(11):810-20.
221. Mar BG, Bullinger LB, McLean KM, Grauman PV, Harris MH, Stevenson K, et al. Mutations in epigenetic regulators including SETD2 are gained during relapse in paediatric acute lymphoblastic leukaemia. *Nat Commun*. 24 mars 2014;5(1):3469.

222. Studd JB, Cornish AJ, Hoang PH, Law P, Kinnersley B, Houlston R. Cancer drivers and clonal dynamics in acute lymphoblastic leukaemia subtypes. *Blood Cancer J.* 9 nov 2021;11(11):177.
223. Rack K, De Bie J, Ameye G, Gielen O, Demeyer S, Cools J, et al. Optimizing the diagnostic workflow for acute lymphoblastic leukemia by optical genome mapping. *American J Hematol.* mai 2022;97(5):548-61.
224. Lestringant V, Duployez N, Penther D, Luquet I, Derrieux C, Lutun A, et al. Optical genome mapping, a promising alternative to gold standard cytogenetic approaches in a series of acute lymphoblastic leukemias. *Genes Chromosomes & Cancer.* oct 2021;60(10):657-67.
225. Lühmann JL, Stelter M, Wolter M, Kater J, Lentjes J, Bergmann AK, et al. The Clinical Utility of Optical Genome Mapping for the Assessment of Genomic Aberrations in Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers.* 30 août 2021;13(17):4388.
226. Gao H, Xu H, Wang C, Cui L, Huang X, Li W, et al. Optical Genome Mapping for Comprehensive Assessment of Chromosomal Aberrations and Discovery of New Fusion Genes in Pediatric B-Acute Lymphoblastic Leukemia. *Cancers.* 21 déc 2022;15(1):35.
227. Hamadeh L, Enshaei A, Schwab C, Alonso CN, Attarbaschi A, Barbany G, et al. Validation of the United Kingdom copy-number alteration classifier in 3239 children with B-cell precursor ALL. *Blood Advances.* 22 janv 2019;3(2):148-57.
228. Pang AWC, Kosco K, Sahajpal NS, Sridhar A, Hauenstein J, Clifford B, et al. Analytic Validation of Optical Genome Mapping in Hematological Malignancies. *Biomedicines.* 9 déc 2023;11(12):3263.

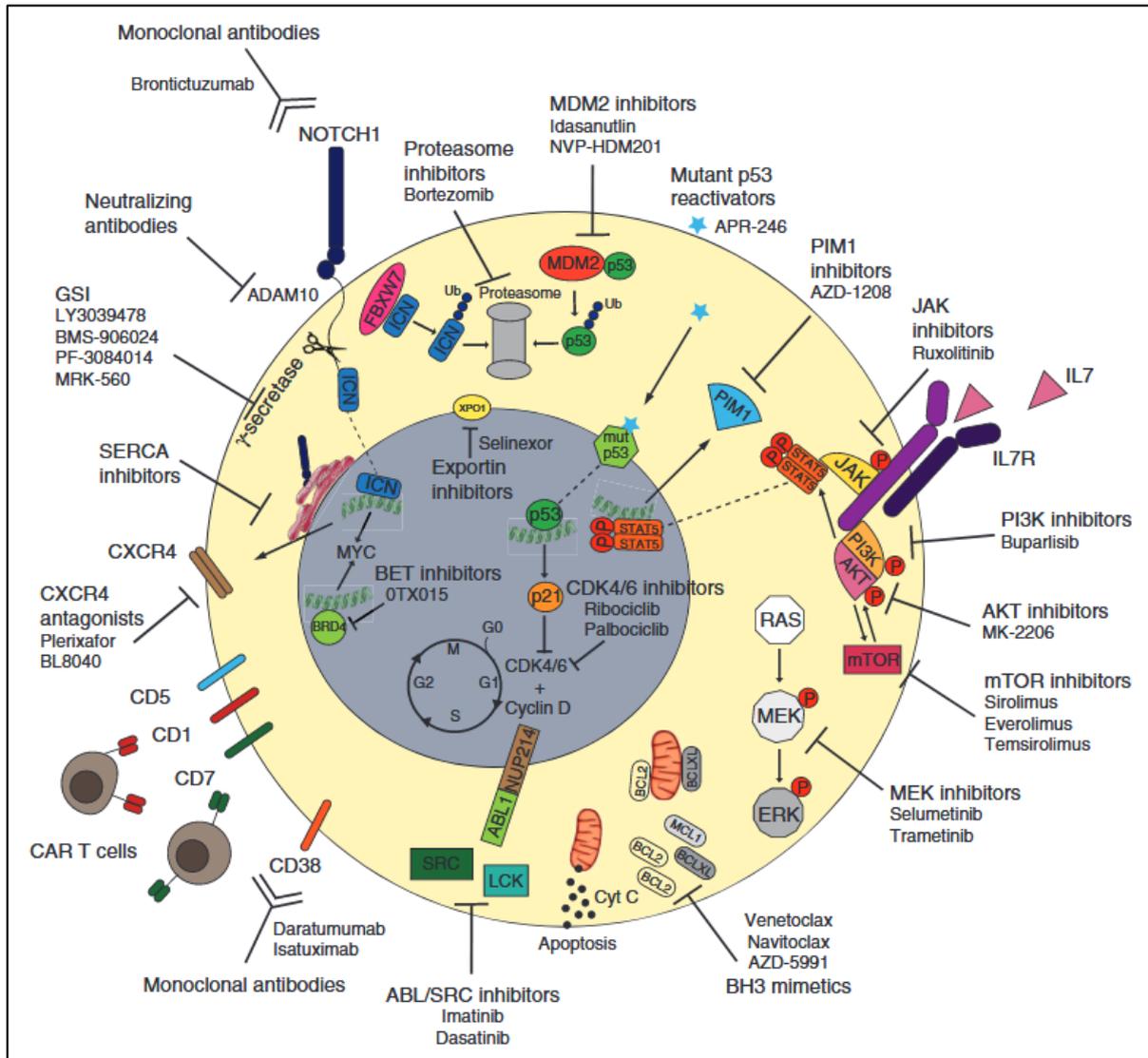
Annexes

Annexe 1. Comparaison des classifications des LAL-B de l’OMS 2016, 2022 et ICC 2022, réalisée par Pagliaro et al (155).....	167
Annexe 2. Perspectives de thérapies ciblées pour les LAL-T.....	168
Annexe 3. Principaux contrôles qualités de la technique OGM, adapté de Levy et al (212).	169
Annexe 4. Valeurs obtenues pour les contrôles qualités les plus importants.	170
Annexe 5. Utilisation du pipeline De Novo pour l’identification d’une para-tétraploïdie...	171
Annexe 6. Résultats obtenus pour les échantillons de LAL-B.	172
Annexe 7. Résultats obtenus pour les échantillons de LAL-T.....	175

Annexe 1. Comparaison des classifications des LAL-B de l'OMS 2016, 2022 et ICC 2022, réalisée par Pagliaro et al (155).

WHO 4th edition (2016)	WHO 5th edition (2022)	ICC 2022
B-lineage		
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma, NOS	Same entity	B-ALL, NOS
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(9;22)(q34.1;q11.2); <i>BCR::ABL1</i>	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>BCR::ABL1</i> fusion	B-ALL with t(9;22)(q34.1;q11.2)/ <i>BCR::ABL1</i> - with lymphoid only involvement - with multilineage involvement
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(v;11q23.3); <i>KMT2A</i> -rearranged	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>KMT2A</i> rearrangement	B-ALL with t(v;11q23.3)/ <i>KMT2A</i> -rearranged
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(12;21)(p13.2;q22.1); <i>ETV6::RUNX1</i>	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>ETV6::RUNX1</i> fusion	B-ALL with t(12;21)(p13.2;q22.1)/ <i>ETV6::RUNX1</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hyperdiploidy	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with high hyperdiploidy	B-ALL, hyperdiploid
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with hypodiploidy	Same entity	B-ALL, low hypodiploid
		B-ALL, near haploid
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(5;14)(q31.1;q32.1); <i>IGH::IL3</i>	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>IGH::IL3</i> fusion	B-ALL with t(5;14)(q31.1;q32.3)/ <i>IL3::IGH</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with t(1;19)(q23;p13.3); <i>TCF3::PBX1</i>	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>TCF3::PBX1</i> fusion	B-ALL with t(1;19)(q23.3;p13.3)/ <i>TCF3::PBX1</i>
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma, <i>BCR::ABL1</i> -like	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>BCR::ABL1</i> -like features	B-ALL, <i>BCR::ABL1</i> -like, ABL- class rearranged B-ALL, <i>BCR::ABL1</i> -like, JAK-STAT activated B-ALL, <i>BCR::ABL1</i> -like, NOS
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>iAMP21</i>	Same entity	B-ALL with <i>iAMP21</i>
Not included	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>ETV6::RUNX1</i> -like features	Provisional entity: B-ALL, <i>ETV6::RUNX1</i> -like *
Not included	B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with <i>TCF3::HLF</i> fusion	Not included
B-lymphoblastic leukaemia/lymphoma with other defined genetic abnormalities	Same entity	Not included
		B-ALL with <i>MYC</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>DUX4</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>MEF2D</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>ZNF384(362)</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>NUTM1</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>HLF</i> rearrangement †
		B-ALL with <i>UBTF::ATXN7L3/PAN3,CDX2</i> (" <i>CDX2/UBTF</i> ") †
		B-ALL with mutated <i>IKZF1</i> N159Y †
		B-ALL with mutated <i>PAX5</i> P80R †
		B-ALL, with <i>PAX5</i> alteration (<i>PAX5alt</i>) *
		B-ALL, with mutated <i>ZEB2</i> (p.H1038R)/ <i>IGH::CEBPE</i> *
		B-ALL, <i>ZNF384</i> rearranged-like *
		B-ALL, <i>KMT2A</i> rearranged-like *

Annexe 2. Perspectives de thérapies ciblées pour les LAL-T.



Annexe 3. Principaux contrôles qualités de la technique OGM, adapté de Levy et al (212).

Paramètre	Cible	Explications potentielles si hors cible
Phase pré-analytique		
Compage cellulaire (Input)	1,5M de cellules viables	Stockage inapproprié Volume faible Prélèvement pauvre
Concentration ADN	39-150 ng/μl	Input trop faible Substances inhibitrices ADN fragmenté
CV de la concentration en ADN	≤0,30	Homogénéisation insuffisante Concentration trop forte
Concentration ADN marqué	4-16 ng/μl	Mauvaise quantification de l'input en ADN Perte excessive d'ADN après marquage
Phase analytique		
Profondeur	≥340X	Concentration ADN faible Couverture faible
N50 (≥150kb)	≥230kb	Fragmentation de l'ADN (stockage inapproprié)
Couverture	≥70%	Mauvais marquage Molécules d'ADN trop petites ADN bloqué dans les canaux
Phase post-analytique		
Sexe	Correspondant au patient	Anomalie sur chromosome XY Antécédent de greffe de CSH Erreur de prélèvement/identification
Profondeur après pipeline	≥300X	Concentration ADN faible Mauvais CQ analytiques
CNV : bruit de fond	≤20%	Mauvais CQ analytiques Mauvais marquage
CNV : corrélation avec la densité de marquage	≤0,25	

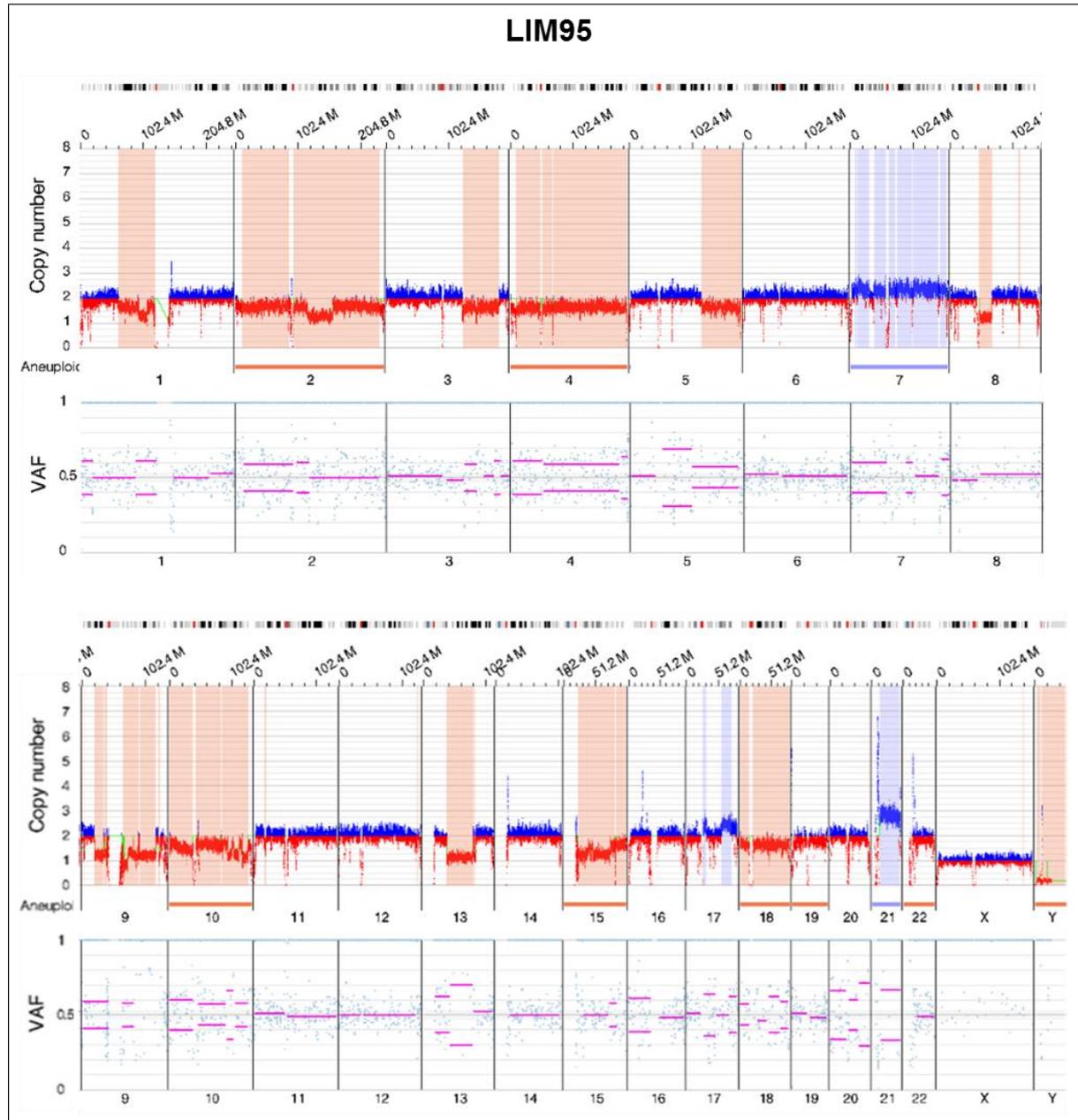
Annexe 4. Valeurs obtenues pour les contrôles qualités les plus importants.

CQ relatifs aux molécules	Cible	Tolérance	LIM6	LIM9	LIM14	LIM17	LIM21	LIM25	LIM26	LIM30	LIM32	LIM34	LIM35	LIM37	LIM42	LIM45	LIM46	LIM54
			NE0 (≥150 kbp)	≥230	200-230	293,5	265,3	255,8	296,6	281,7	341,7	304,5	267,8	280,5	254,6	254,3	268,1	283,9
Effective coverage	≥340	300-340	495,2	461,1	426,3	466,8	430,1	464,4	462,5	456,8	468,7	418	404,7	434,1	479,2	443,7	379,4	445,9
Map rate	≥70	60-70	93,8	91,9	84,2	93,2	84,5	90,4	93,2	89,2	93,8	83,4	82	87	93,5	88,1	74,1	88,1
Label density / 100kpb	14-17	13-14 et 17-18	15,47	15,62	15,46	16,14	15,46	15,52	15,25	15,37	15,13	13,79	14,06	14,63	15,49	14,81	16,07	14,46
CQ après pipeline																		
Effective coverage of reference	≥300		452,8	414,8	349,5	420,2	383,3	422,5	408	408,4	414,8	377,5	365,7	383,9	433,5	387	317,3	411,8
Bruits de fond CNV																		
Percent above expected (2 Mbp)	≤20		-11,81	-0,09	9,37	-11,42	3,91	-1,31	-6,51	0,42	-9,95	1,9	28,01	22,81	-1,69	-1,76	47,89	-2,6
Percent above expected (6 Mbp)	≤20		-1,93	9,13	17,86	-4,28	12,99	17,89	3,06	9,17	-1,66	15,02	52,85	44,62	6,29	6,68	66,13	8,99
Correlation with label density	≤0,25		-0,04	0,12	0,079	-0,01	0,15	-0,07	-0,04	0,048	-0,1	-0,02	-0,14	-0,26	-0,14	0,19	0,12	0,021

CQ relatifs aux molécules	Cible	Tolérance	LIM57	LIM68	LIM69	LIM70	LIM74	LIM87	LIM91	LIM92	LIM95	LIM102	LIM104	LIM107	LIM113	LIM116	LIM139	LIM143
			NE0 (≥150 kbp)	≥230	200-230	354,8	289,9	272,3	342,5	331,5	271,1	292	257,3	286,1	254,6	205,1	301,1	300,8
Effective coverage	≥340	300-340	492,2	468,6	403,9	473,9	483,7	228,8	463,8	406	381,3	451,4	365,5	472,5	450,7	440,5	405,8	465,8
Map rate	≥70	60-70	94,5	88,7	80	91,1	93,7	76,1	92	79,7	75,5	89,5	73,7	93,6	90,5	85,4	85,6	91,2
Label density / 100kpb	14-17	13-14 et 17-18	16,07	15,17	14,56	15,69	15,8	14	16,39	17,53	13,66	17,29	13,44	15,16	17,66	16,99	15,06	16,1
CQ après pipeline																		
Effective coverage of reference	≥300		460,1	438,3	383	430,9	438,3	226,1	411,2	344,7	359,1	380,8	327,4	413,7	414,2	374,5	384,8	456,9
Bruits de fond CNV																		
Percent above expected (2 Mbp)	≤20		-8,19	-1,68	5,81	-6,03	-10,9	-0,55	-7,14	49,04	24,59	-5,5	23,86	-9,37	0,09	3,43	-7,71	-3,83
Percent above expected (6 Mbp)	≤20		4,05	6,86	28,24	14,66	1,37	11,33	1,62	63,23	39,03	1,52	31,53	-0,61	7,87	13,99	2,26	7,18
Correlation with label density	≤0,25		-0,06	0,05	-0,06	-0,03	0,035	0,083	-0,02	-0,01	0,013	0,076	0,23	-0,14	0,058	-0,01	-0,01	-0,12

Annexe 5. Utilisation du pipeline De Novo pour l'identification d'une para-tétraploïdie.

Les profil CNV et moyenne de VAF de LIM95 sont divisés en deux parties (chromosomes 1 à 8 et chromosomes 9 à Y). La comparaison des deux profils permet de mettre en évidence une anomalie de la ploïdie avec une mauvaise normalisation des nombres de copie et de poser l'hypothèse d'un génome para-tétraploïde.



Annexe 6. Résultats obtenus pour les échantillons de LAL-B.

ID	Analyses conventionnelles		Analyses complémentaires		Optical Genome Mapping		FISH de confirmation				
	Caryotype	FISH	RT-MLPA / RT-qPCR	MLPA	PCR multiplex	RT-MLPA / RNaseq / NGS		Caryotype prédit par OGM [VAF]	Anomalie primaire	Délétions récurrentes	Autres SV/CNV d'intérêt
LIM8	47,XY,t(14;19)(q32;q13),+21[5] /57,sl,+X,+2,+3,+5,+10,+11,der(11)(11;11)(p13;q13),+16,+17,+21,+22[0,15] /47,XY,+2[17]	IGH-r CRLF2 x3, HLF x3, BCR x3, KMT2A x3/x4, RUNX1 x3/x4	RT-MLPA : Négative	Négative	Négative	RNAseq : IGH::CEBPA NGS : mutation PAX5	47,XY,t(14;19)(q32;q13),+21[0,05] 57,sl,+X,+2,+3,+5,+10,+11,der(11)(11;11)(p13;q13),+16,+17,+21,+22[0,15] 57,sl,+17,+del(17)(p13p12)[0,25]	IGH::CEBPA			BCL3 x3 (67%) der(10)(10;19) (BCL3+)
LIM9	46,XY,t(3;11)(p21;q12), t(10;10)(q21;q23),der(12) t(1;12)(q21;q23)[24] /46,XY[1]	ETV6::RUNX1 PXB1 x3	RT-MLPA : Négative	BTG1 x0 RB1 x0, PAX5	NR	NR	ETV6::RUNX1	PAX5, BTG1 x0, RB1 x0 CDKN2A/B (sous-clonal)			
LIM14	40,XY,-3,-4,-7,-13,-15,-16,-17,-18,+mar1,+mar2[18] /46,XY[2]	KMT2A x3	RT-MLPA : Négative	NR	Négative	RT-MLPA : Négative		IKZF1 (-7), RB1 (del13q)	TP53 (-17)		
LIM17	51,XY,+X,+2,+5,t(9;22)(q34;q11), +16,+21[8]/52,sl,-2,+14,+14[11] /46,XY[1]	BCR::ABL1	RT-qPCR : BCR::ABL1	NR	Négative (ERG NR)	NR	BCR::ABL1				
LIM25	46,XX,der(7)(7;7)(p21;q11),t(8;22)(q24;q11),-20,(21)(q10),+mar[3] /46,XX[6]	IGL::MYC RUNX1 x3	RT-MLPA : Négative	NR	Négative	NR	IGL::MYC	ETV6			
LIM30	46,XY,t(9;14)(q22;q32)[5] /46,XY[15]	KMT2A x3	NR	NR	NR	NR		IKZF1 (-7), RB1 (del13q)	TP53 (-17)		
LIM32	46,XX,[20]	Négative	RT-MLPA : Négative	IKZF1, ETV6, CDKN2A/B	NR	RNAseq : ETV6::MGAT4C	ETV6::MGAT4C	IKZF1, ETV6, CDKN2A/B			ETV6 x2 avec perte 3' (48%) DEK x3 (24%)
LIM34	55,XY,+X,+4,+6,+10,+14,+17,+18, +21,+21[2] /46,XY[18]	CRLF2 x3, HLF x3, IGH x3, RUNX1 x3/4	RT-MLPA : Négative	Négative	NR	NR		Hyperdiploïdie			
LIM35	48,XY,add(1)(q21),del(5)(q13q35), del(6)(q21q25),del(6)(q21q25),t(7)(q10),t(8;14)(q11;q32),add(12)(q24), add(13)(q34),-20,-20,+4mars[7] /46,XY[13]	IGH-r	RT-MLPA : Négative	NR	Négative	RT-MLPA : Négative	IGH::CEBPD	IKZF1 (iso 7q), RB1 (del13q)			
LIM37	47,XX,del(6)(q14q24),t(9;22)(q34;q11),del(9)(p13),+17[2] /48,sl,+20[2] /46,XX[16]	BCR::ABL1 TP53 x3	RT-qPCR : BCR::ABL1	NR	NR	NR	BCR::ABL1 /48,sl,+20[0,20]	CDKN2A/B x0 IKZF1, PAX5, CRLF2	KDM6A (del)		CRLF2 x1 (32%)
LIM42	Non réalisé (échec d'aspiration médullaire) → Antécédents : 45,XX,-3,add(7)(q34), t(9;22)(q34;q11),-18,+mar[3] //46,XY[11]	NR	RT-qPCR : BCR::ABL1	NR	IKZF1 Δ2-7 (ERG NR)	NR	BCR::ABL1 (q21.2;q25.3),-20[0,15]	CDKN2A/B x0 IKZF1 (intra), BTG1, PAX5 (de19p), RB1			

Annexe 6 (suite)

ID	Analyses conventionnelles		Analyses complémentaires		Analyses complémentaires		Optical Genome Mapping		Autres SV/CNV d'intérêt	FISH de confirmation
	Caryotype	FISH	RT-MLPA / RT-qPCR	MLPA	PCR multiplex	RT-MLPA / RNaseq / NGS	Caryotype prédit par OGM [VAF]	Anomalie primaire		
LIM45	46,XY,add(16)(p13)[1]/46,sl,t(1;16)(p32;q22)[9]	Négative (KMT2A non réalisé)	NR	NR	NR	NR	46,XY,t(1;19)(q23;p13.3)[0,40]/46,sl,der(16)t(6;16)(p21;q24)[0,30]/47,sl2,+X,t(1;16)_(p33;p13)[0,15]	KMT2A:::MLL1	CDKN2A/B réarrangement de CREBBP	KMT2A:::MLL1 (90%) cen(X)x2 (18%)
LIM46	56,XX,+X,+add(4)(q21),+6,+10,+14,+17,+18,+18,+21,+21[14]/56,sl,dup(17)(q21;q31)[2]/46,XX[9]	CRLF2 x3, HLF x3, PBX1 x3, RUNX1 x34	RT-MLPA : Négative	NR	NR	NR	Hyperdiploïdie	CREBBP (del)		
LIM57	46,XX[18]	Négative	RT-MLPA : Négative	NR	Négative	NR	Non déterminée	RB1, CDKN2A/B	TP53 (de17p)	DLEU1 (64%) BCL2 x4/5 (70%)
LIM68	46,XX,t(1;19)(q12;p13)[6]/46,XX[2]	Négative	RT-MLPA : Négative	NR	Négative	NR	Non déterminée	IKZF1 (intra), RB1, BTG1 x0		
LIM69	67,XXY,+Y,-1,-2,-3,-4,+6,-7,+8,-9,+10,-12,-13,-15,-16,-17,+18,+19,-20,+21,+22[3]/46,XY[18]	CRLF2 x4, PBX1 x4, EZAX4, BCR x4, IGHx3, KMT2A x3, RUNX1 x4	RT-MLPA : Négative	RB1	NR	mutation TP53	Hy pol/ Paratripléidie	RB1 IKZF2 (del) SH2B3 (del) TP53 (-17)		
LIM70	52,XX,+X,+4,+10,+14,+17,+21[16]/46,XX[4]	CRLF2 x3, HLF x3, IGHx3, RUNX1 x3	RT-MLPA : Négative	RB1	NR	NR	Hyperdiploïdie	RB1		
LIM74	58,XX,YY,+4,+6,+7,+8,+10,+14,+20,+21,+21,+mer[6]/46,XY[14]	CRLF2 x3/x4, RUNX1 x3/x4	RT-MLPA : Négative	RB1	NR	NR	Hyperdiploïdie	RB1		
LIM87	53,X,add(X)(q28),+4,+8,-9,t(9;22)(q34;q11)x2,+14,+15,+17,+mer[20]	BCR::ABL1 x2	RT-MLPA et RT-qPCR : BCR::ABL1	NR	NR	NR	BCR::ABL1	IKZF1 x0 (intra), BTG1 CDKN2A/B x0		
LIM81	46,XY,add(8)(p21),t(9;22)(q34;q11)[6]/48,sl,+4,+mer[16]	BCR::ABL1	RT-MLPA et RT-qPCR : BCR::ABL1	NR	IKZF1 Δ4-7 (ERG NR)	NR	BCR::ABL1	IKZF1 (intra)		
LIM82	57,XX,+X,+3,+5,+8,-9,+10,+12,+14,+17,+18,+21,+21,+mer[11]/46,XX[11]	CRLF2 x3, HLF x3, PDGFRB x3, RUNX1 x3/x4, IGHx3/x4, mar(ABL1+)	RT-MLPA : Négative	CDKN2A/B x0 PAX5, JAK2	NR	RNaseq : négatif	Hyperdiploïdie	CDKN2A/B x0 PAX5 (-9)	JAK2 (del)	cen(8)x4 (68%) mar(cen8+)=der(8)t(8;9)
LIM83	46,XX,t(9;22)(q34;q11)[1]/46,XX[19]	BCR::ABL1	RT-qPCR : Echech	NR	NR	NR	Echec			

Annexe 6 (suite)

ID	Analyses conventionnelles		Analyses complémentaires		Caryotype prédit par OGM [VAF]	Optical Genome Mapping Anomalie primaire	Délétions récurrentes	Autres SV/CNV d'intérêt	FISH de confirmation
	Caryotype	FISH	RT-MLPA / RT-qPCR	MLPA / PCR multiplex					
LIM102	55,XY,+X,+Y,+1,+4,+6,+10,+14,+17,+21[1] /46,XY[15]	CRLF2x4, ABL2x3, PBX1x3, PDGFRAx3, IGHx3, HLFx3, RUNX1x3x4, TP53x3	RT-MLPA : Négative	Négative (ERG NR)	56,XY,+X,+Y,dup(1)(q21.1;q42.12),+4,+6,+10,+14,+17,+18,+21,+21[0,45]	Hyperdiploïdie			
LIM104	46,XX,-9,-9,add(17)(p10),+mar1,+mar2[13]/46,s[del(4)(q31)]2/46,XX[5]	Négative	RT-MLPA : ZNF384:EP300	Négative (ERG NR)	46,XX,t(3;17)(p21.31;q11.2),(9;9)cth,t(12;22)(p13.31;q13.2)[0,45]	ZNF384:EP300	CDKN2A/B x0 PAX5 (del9p)	SETD2 (del)	
LIM107	47,XY,+8,(9;22)(q34;q11),del(9)(p13),del(13)(q13q14)[20]	BCR::ABL1	RT-MLPA et RT-qPCR : BCR::ABL1	Négative (ERG NR)	47,XY,+8,(9;22)(q34.12;q11.23),del(9)(p23p12)[0,47]	BCR::ABL1	<i>IKZF1</i> (intra) CDKN2A/B x0 PAX5 (del9p)		DLEU2
LIM116	46,XX,add(8)(q24),add(11)(p15)[7]/46,XX,der(4)t(1,-4)(q23;p16)[4]/46,XX[8]	PBX1x3, ABL2x3, CMYCcamp	RT-MLPA : Négative	Négative (ERG NR)	46,XX,dup(8)(q24q24),der(11)t(1;15)(q22;q26.3)t(11;15)(p15.5;q26.3)[0,3]/46,XX,der(4)inv(1)(q21.3q32.1)(1;4)(q32.1;p16.3)[0,15]	DUX4-r (supposé)	ERG (del) MYCcamp		
LIM139	56,XX,+X,+X,+4,+6,+10,+15,+17,+20,+21,+21[11]/46,XX[9]	CRLF2x4, HLF x3, RUNX1x4	RT-MLPA : Négative	Négative (ERG NR)	56,XX,+X,+X,+4,+6,+10,+15,+17,+20,+21,+21[11] t(18;16)(q21.1;q23.3),+2,-2[0,4]	Hyperdiploïdie		CTCF (del)	
LIM143	46,XY,del(9)(p13),der(19)t(1;19)(q23;p13)[14]/46,XY[4]	TCF3::PBX1 PAX5x1	NR	NR	46,XY,der(9)(9;18)(p11.1;q21.2),der(19)t(1;19)(q23.3;p13.3)[0,45]	TCF3::PBX1	CDKN2A/B , PAX5 (del9p)		BCL2x3 (87%) der(9)(BCL2+)

Annexe 7. Résultats obtenus pour les échantillons de LAL-T.

ID	Analyses conventionnelles			Analyses complémentaires		Optical Genome Mapping			FISH de confirmation
	Caryotype	FISH	RT-MLPA	MLPA / RT-qPCR / NGS	Caryotype prédit par OGM [VAF]	Anomalie primaire	Délétions secondaires		
LIM21	46,XX,der(1)t(1;10)(p21;q25),add(4)(q11),-5,del(6)(q21),-7,-9,der(10)t(10;14)(q24;q11),-13,der(14)t(10;14)(q24;q11)t(1;10)(p21;q25),add(18)(q21),+4mar,s[9]/46,XX[19]	TLX1::TCRAD ABL 1x3x4	Négative	NGS : mutation NOTCH1	46,XX,(1;10,14)cx,del(1)(p31p11), (5;13,18)cx,del(6)(q14,1q21),i(9)(q10),t(10;14)(q24;31;q11.2)[0,10]	TLX1::TCRAD	CDKN2A/Bx0 FBXW7, NR3C1, NRAS, IDH2, ETV6, CDKN1B, RPL22	cen(7)x2 KMT2E(7q22)x1 (29%) MET(7q31)x2 PDGFRA(4q12)x2	
LIM26	46,XY,t(12;15)(q23;q22)[2]/46,XY[18]	Négative	Négative	<u>Antécédents au diagnostic :</u> NGS : mutation NOTCH1 MLPA : délétion PTEN RT-qPCR : Surexpression HOXA9	46,XY,t(12;15)(q24.31;q22.31)[0,35]	Non déterminée	RPL22, CTCF, DLEU		
LIM54	Echec	TLX3-r	Négative	NGS : Mutations clonales (IL7R, NOTCH1) et sous-clonales (NOTCH1, KRAS, NRAS) MLPA : Délétion CDKN2A/Bx0	46,XX,t(5;14)(q35.1;q32.2)[0,45]	TLX3::BCL11B	CDKN2A/Bx0		
LIM95	Echec : 4 mitoses hyperploïdes inclassables et 5 mitoses normales	TLX3x3, ABL1x4, BCR x4, KMT2Ax4	Négative	NGS : Mutations NOTCH1, KRAS	~90,XX,-Y,-Y,del(1)(p31.3p11.2),-2,del(2)(q14.1q24.1),del(3)(q21.2q27.1),-4,del(5)(q23.1q35.3),+7,del(8)(q11.1q13.2)x2,(9)cth,-(10)cth,del(13)(q13.3q31.1)x2,(15)cth,(17)cx,-18,+21+21[0,40]	Non déterminée	CDKN2A/Bx0, IKZF1, JAK1, RB1		
LIM101	46,XY,t(10;14)(q24;q11)[2]/46,XY[2]	TLX1::TCRAD	Négative	NR	Echec				
LIM113	46,XY[9]	Négative	Négative	NGS : mutation NOTCH1	46,XY,t(X;10)(p11.4;p12.31)[0,45]	MLL10::DDX3X		MLL10-t (66%)	

Serment De Galien

Je jure en présence de mes Maîtres de la Faculté et de mes condisciples :

- d'honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement ;
- d'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement ;
- de ne jamais oublier ma responsabilité, mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine, de respecter le secret professionnel.

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

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

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

Apport de l'Optical Genome Mapping dans l'évaluation du bilan génétique des leucémies aiguës lymphoblastiques

La prise en charge des leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) a été améliorée grâce à des avancées thérapeutiques, biologiques et technologiques. Ayant un impact pronostique majeur, les altérations génétiques sont actuellement au centre des classifications et font partie intégrante de la prise en charge des patients. Les techniques de séquençage hautement résolutive permettent une stratification pronostique de plus en plus précise. Cependant, la majorité des laboratoires ne disposent en pratique que de techniques cytogénétiques et moléculaires conventionnelles. L'évaluation du bilan génétique nécessite alors l'association de multiples techniques et cette approche est complexe, coûteuse et parfois insuffisante. Dans ce contexte, la technique Optical Genome Mapping (OGM), à la fois pan-génomique et résolutive, se présente comme une alternative intéressante à un coût modéré. L'étude de 32 échantillons nous a permis d'évaluer l'apport de l'OGM dans le bilan génétique des LAL mais également sa faisabilité au sein de notre laboratoire. En plus de confirmer les performances de l'OGM en terme de sensibilité et de résolution par rapport aux techniques conventionnelles, les résultats obtenus ont permis de valider le stockage pré-analytique et la méthode d'interprétation. Au final, cette étude a participé à la concrétisation du projet d'internalisation de la technique OGM au laboratoire d'hématologie du CHU de Limoges.

Mots-clés : Leucémie aiguë lymphoblastique, Optical Genome Mapping, bilan génétique

Optical Genome Mapping contribution to the assessment of genetic work-up in acute lymphoblastic leukemia

The management of acute lymphoblastic leukemia (ALL) has been improved thanks to therapeutic, biological and technological progress. Genetic alterations have a major prognostic impact, and are currently crucial for classification and patient management. Highly resolutive sequencing techniques enable increasingly precise prognostic stratification. However, in practice, most laboratories only have access to conventional cytogenetic and molecular techniques. In such cases, the assessment of genetic status requires a broad range of techniques. This is a complex, costly and sometimes inadequate strategy. In this context, the Optical Genome Mapping (OGM) pan-genomic and resolutive technique represents an interesting and cost-effective alternative. By studying 32 samples, we evaluated the contribution of OGM to the genetic work-up of ALL, as well as its feasibility in our laboratory. In addition to validating the performance of OGM sensitivity and resolution compared with conventional techniques, the results also validated the pre-analytical storage and interpretation method. Overall, this study contributed to the realization of the OGM internalization project at the Limoges University Hospital Hematology Laboratory.

Keywords : Acute lymphoblastic leukemia, Optical Genome Mapping, genetic work-up

