

## Faculté de Pharmacie

Année 2024

Thèse N°

### Thèse pour le diplôme d'État de docteur en Pharmacie

Présentée et soutenue publiquement

Le 24 octobre 2024

Par Fifamè AMADJIKPE

Née le 27 mai 1994

### **Mise au point de la quantification du transcrite de fusion *NUP98::NSD1* par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)**

Thèse dirigée par : Pr Emmanuelle CLAPPIER et Dr Nathalie GACHARD

Examineurs :

Mme. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Laboratoire de virologie, CHU de Limoges

Mme. Jasmine CHAUZEIX, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Mme. Emmanuelle CLAPPIER, PU-PH, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Louis

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Mme. Nathalie GACHARD, PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

M. David RIZZO, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie, 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 24 octobre 2024

Par Fifamè AMADJIKPE

Née le 27 mai 1994

**Mise au point de la quantification du transcrite de fusion *NUP98::NSD1*  
par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)**

Thèse dirigée par Pr Emmanuelle CLAPPIER et Dr Nathalie GACHARD

Examineurs :

Mme. Sylvie ROGEZ, PU-PH, Laboratoire de virologie, CHU de Limoges

Mme. Jasmine CHAUZEIX, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Mme. Emmanuelle CLAPPIER, PU-PH, Laboratoire d'hématologie, Hôpital Saint-Louis

M. Jean FEUILLARD, PU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

Mme. Nathalie GACHARD, PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges

M. David RIZZO, MCU-PH, Laboratoire d'hématologie, CHU de Limoges



# Personnel enseignant de la Faculté de Pharmacie de Limoges

---

Le 1<sup>er</sup> 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 Jérémie** 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

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

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

**Professeur associé en service temporaire**

<b>M. FOUGÈRE Édouard</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
---------------------------	---

**Assistant Hospitalo-Universitaire des disciplines pharmaceutiques**

<b>Mme MARCELLAUD Élodie</b>	Chimie organique, thérapeutique et pharmacie clinique
------------------------------	---

**Attachés Temporaires d'Enseignement et de Recherche**

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

**Enseignants d'anglais**

<b>M. HEGARTY Andrew</b>	Chargé de cours
<b>Mme VERCELLIN Karen</b>	Professeur certifié



*« Ne t'ai-je pas donné cet ordre : Fortifie-toi et prends courage ? Ne t'effraie point et ne t'épouvante point. »*

Josué 1v9

*« La seule limite à la réussite, c'est l'ampleur de ses rêves et la volonté de faire en sorte qu'ils se réalisent »*

Michelle Robinson-Obama

## Remerciements

---

Je tiens tout d'abord à remercier chaleureusement les membres de mon jury pour l'honneur qu'ils me font en acceptant de juger ce travail. Leur expertise, leurs conseils avisés, et leur bienveillance ont été des moteurs essentiels tout au long de la rédaction de cette thèse. Merci de me faire l'honneur de votre présence et de votre temps précieux.

*Madame le Professeur Sylvie ROGEZ, vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Merci pour vos précieux conseils toutes les fois où je suis venue toquer à votre porte au sujet de mon parcours professionnel. Soyez assurée de ma profonde reconnaissance.*

*Madame le Docteur Jasmine CHAUZEIX, Monsieur le Docteur David RIZZO, Monsieur le Professeur Jean Feuillard, Je tiens à vous exprimer ma sincère gratitude pour l'accompagnement et les enseignements que vous m'avez dispensés durant ces dernières années.*

Je suis également profondément reconnaissante envers mes directrices de thèse, qui m'ont guidée avec patience et bienveillance. Leur accompagnement, tant sur le plan scientifique que professionnel, a été pour moi une source d'inspiration continue. Leur rigueur et leur passion pour la recherche ont grandement contribué à mon apprentissage et à l'aboutissement de ce projet. Merci pour votre écoute et votre confiance durant ce parcours.

*Madame le Professeur Emmanuelle CLAPPIER, merci de m'avoir accepté au sein de l'unité de biologie moléculaire du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis et pour m'avoir permis de découvrir l'institut Jean Bernard. Merci également de m'avoir confié ce travail.*

*Madame le Docteur Nathalie GACHARD, votre disponibilité, vos encouragements et vos précieux conseils ont joué un rôle déterminant dans la réussite de mon parcours professionnel.*

Je tiens à exprimer toute ma gratitude aux membres du service où j'ai eu la chance d'effectuer mon semestre d'interchu. Travailler dans un environnement aussi dynamique et enrichissant a été une expérience inestimable. Un merci tout particulier au Professeur Jean Soulier pour m'avoir accueillie au sein de son service. Merci pour votre bienveillance et pour avoir créé ce cadre de travail stimulant et bienveillant.

*A Carole MAUTE, Aux Docteurs Stéphanie MATHIS, Pierre LEMAIRE, Elise FOURNIER et Nicolas DUPLOYEZ, merci pour l'intérêt et l'implication portés à ce travail. Merci pour votre disponibilité et vos recommandations qui m'ont beaucoup aidé dans son élaboration.*

*Aux Docteurs Laureen CHAT, Rathana KIM, Mathieu DUCHMANN, Marie PASSET, Clémentine CHAUVEL, Lou SORET, Jean-Michel CAYUELA, merci pour tout ce que vous m'avez appris.*

*A toute l'équipe du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis, Merci pour votre bonne humeur et votre bienveillance. Aux techniciens de cytologie et de biologie moléculaire, merci pour votre disponibilité et votre gentillesse.*

*A William PLAS, merci pour ta disponibilité et ta contribution à cette thèse*

*A toute l'équipe de l'institut Jean Bernard. Un merci particulier à Hugo qui a partagé avec moi une partie de son projet de recherche.*

A l'équipe du service d'hématologie du CHU de Limoges, *merci pour votre bonne humeur et votre bienveillance.*

Aux services de biochimie, de bactériologie-virologie-hygiène, d'immunologie, de génétique médicale et cytogénétique de l'hôpital de la mère et de l'enfant (HME) du CHU de Limoges

*Merci à l'ensemble des personnes, secrétaires, techniciens, biologistes, généticiens que j'ai pu rencontrer au cours de mes semestres d'internat dans vos laboratoires.*

A l'équipe de la plateforme de biologie moléculaire des cancers solides (PGMC)

*Un merci particulier au Professeur Karine DURAND, merci pour m'avoir initiée à la biologie moléculaire des tumeurs solides. Merci également pour ta disponibilité, tes conseils, ton expertise et ta rigueur scientifique.*

A l'équipe du centre de prélèvement du CHU de Limoges, *merci pour votre bonne humeur et votre gentillesse.*

Mes remerciements vont également à mes co-internes, véritables compagnons de route au quotidien. Vous avez partagé avec moi les défis, les fous rires, et les moments de doute, et je ne saurais imaginer ce parcours sans votre amitié et votre soutien. Merci pour les moments de complicité, pour votre solidarité infaillible, et pour tout ce que nous avons traversé ensemble.

*A vous mes co-internes du CHU de Limoges : Maxime (merci pour la relecture de cette thèse), Alice, Mathieu, Léa V, Emilien, Ophélie, Nisrine, Martin, Dorine, Chiêu-ân, Julie, Jean-Baptiste et Sami*

*Les anciens co-internes qui sont devenus chefs maintenant : Sarirah, Sarah M, Caroline, Cassandra, Guillaume, François, Nicolas, MMA (Bisous à Bibou), Nolween, Alexandre*

*A mes co-internes de l'hôpital Saint-Louis : Rahma, Mathilde, Marie-Adeline et Zélie, merci les filles, j'ai passé un excellent semestre d'interchu*

À mes amis les plus proches, je souhaite exprimer ma gratitude pour leur présence constante et leur capacité à me remonter le moral quand il le fallait. Merci d'avoir été là pour me rappeler

qu'il y a une vie en dehors des études, et de m'avoir permis de me ressourcer quand j'en avais le plus besoin. Votre amitié est pour moi une richesse immense.

*Ismahan, mon binôme. Ta présence au cours de la préparation du concours d'internat a été d'une grande aide.*

*Mes copines Nouria, Aude, Liz-Audrez, Roseline, Roxane, Mathy, Imane, Rebecca, Kafia Yedidya, Lisa, Vera, Caroline, merci pour votre présence dans ma vie.*

*Dimitry, Moudjib, Candide, Arnaud, Brice, Marving, Boniface, merci pour votre amitié et votre solidarité infaillibles.*

*Guillaume Z, tu as été à la fois un ami, un collègue et un conseiller. Merci pour ta gentillesse et ta disponibilité.*

*Professeur Roland Lawson, merci pour ton empathie et ta gentillesse. Tu es une inspiration.*

Enfin, je dédie cette thèse à ma famille. À mes parents, qui ont été les premiers à croire en moi et qui m'ont offert l'amour, le soutien et les valeurs qui m'ont permis d'avancer. À mes frères et sœurs, pour leur écoute, leurs encouragements, et pour toutes ces fois où ils ont su être là pour moi. À mes neveux et nièces, sources de joie et d'énergie, qui me rappellent la beauté de chaque moment. Et à mon fiancé, qui a été mon partenaire de cœur et de vie durant cette aventure, je tiens à dire un merci particulier pour ta patience, ta compréhension et ton amour, qui m'ont permis d'atteindre cet objectif.

*Merci papa pour ton investissement moral et financier qui m'ont permis de réaliser les études dont je rêvais. Je t'aime.*

*Merci maman pour l'éducation que tu m'as donnée. Tu as été aimante et douce avec nous. Tu ne m'as jamais bridée et c'est ce qui me permet aujourd'hui de ne reculer devant rien et d'avancer malgré les difficultés. Je t'aime.*

*Mes sœurs Katherina, Claudia, Georgia et Regina, mes frères Arnaud, Carlos, Fréjus et Romuald, merci pour votre soutien et votre présence dans ma vie.*

*Oncle Gilles, mon second papa, merci pour toutes les nuits où tu m'as écouté quand j'en avais besoin.*

*Frédéric alias Mayor merci pour ta relecture attentive de cette thèse. Merci également de m'avoir écouté pendant des heures en parler. Tu as été un grand soutien pour moi durant ces six mois de stage à Paris. A notre vie sans repos remplie de projets.*

À toutes et à tous, merci infiniment pour votre soutien, vos encouragements, et pour avoir partagé ce chemin avec moi. Ce travail est le fruit de votre présence et de vos précieux apports à mes côtés.

## 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

---

ABL1 : Abelson 1

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : Acide désoxyribonucléique complémentaire

ARA-C : Cytarabine ou cytosine arabinoside

ARN : Acide ribonucléique

BAL : Leucémie biphénotypique

BCR : Breakpoint cluster region protein

CD : Cluster of differentiation (groupe de différenciation)

CBFB : Core binding factor, beta subunit

CEBPA : CCAAT/enhancer binding protein alpha

CIVD : Coagulation intravasculaire disséminée

CMF : Cytométrie en flux multiparamétrique

CSH : Cellule souche hématopoïétique

CSH- CT : Cellules souches hématopoïétiques à court terme

CSH-LT : Cellules souches hématopoïétiques à long terme

CSL : Cellule souche leucémique

ddPCR : Droplet digital polymerase chain reaction

DNase : Désoxyribonucléase

dPCR : Digital polymerase chain reaction

EDTA : Ethylènediaminetétraacétique ou acide éthylènediaminetétraacétique

ELN : European leukemia net

FAB : French-American-British

FAM : 6-Carboxy- fluorocein

FDA : Food and Drug Administration

FISH : Fluorescence In Situ Hybridization

FLT3 : Fms-related tyrosine kinase 3

FLT3-ITD : FLT3 internal tandem duplication

FLT3-TKD : FLT3 tyrosine kinase domain mutation

GCSH : Greffe de cellules souches hématopoïétiques

HDAC : Cytarabine à forte dose

HEX : Hexachlorofluorescein

KMT2A (ou MLL) : Lysine N-méthyltransférase 2A

ICC : International consensus classification

IV : Intraveineuse

LA : Leucémie aigue

LAIP : Leukemia associated immunophénotype (Immunophénotype aberrant associé à la leucémie)

LAL : Leucémie aiguë lymphoblastique

LAM : Leucémie aiguë myéloïde

LAM-CN : Leucémie aiguë myéloïde à caryotype normal

LAP : Leucémie aiguë promyélocytaire

LIC : Cellules initiateuses de la leucémie

LOD : Limit of detection (limite de détection)

PLC : Progéniteurs lymphoïdes commun

LMC : Leucémie myéloïde chronique

LSC : Leukemic Stem Cells (Cellules souches leucémiques)

MECOM : MDS1 And EVI1 Complex Locus

MGG : May Grunwald giemsa

MYH11 : Myosin Heavy Chain 11

MLL : Mixed-lineage leukemia

MPAL : Mixed phenotype acute leukemia (Leucémie aiguë à phénotype mixte)

PMC : Progéniteurs myéloïde commun

PPM : Progéniteurs primitifs multipotents

MPO : Myélopéroxydase

MRD : Minimal/mesurable residual disease (maladie résiduelle)

NFS : Numération formule sanguine

NGS : Next generation sequencing (Séquençage nouvelle génération)

NPM1 : Nucleophosmin 1

NSD1 : Nuclear receptor binding SET domain protein 1

NUP98 : Nucleoporin 98 (Nucleoporine 98)

OGM : Optical genome mapping (cartographie optique du génome à haut débit)

OMS : Organisation mondiale de la santé

Pb : Paires de bases

PCR : Polymerase chain reaction

PML : Promyelocytic leukemia protein

PPM : Progéniteurs primitifs multipotents

PNN : Polynucléaires neutrophiles  
RARA : Retinoic acid receptor, alpha  
RC : Rémission complète  
RNA-Seq : RNA Sequencing  
RNase : Ribonucléase  
RT-MLPA : Reverse transcription multiplex ligation-dependant probe amplification  
RT-qPCR : PCR quantitative après transcription inverse  
RUNX1 : Runt-related transcription factor 1  
RUNX1T1 : RUNX1 translocated to, 1  
SMD : Syndrome myélodysplasique  
SMP : Syndrome myéloprolifératif  
TSM : Taux d'incidence standardisé monde  
UMI : Unique Molecular Identification (Identification moléculaire unique)  
VAF : Variant Allelic Fraction (fréquence allélique du variant)  
WT1 : Wilms tumor 1

# Table des matières

Introduction .....	21
I. Rappels bibliographiques .....	23
I.1. Hématopoïèse .....	23
I.1.1. L'auto-renouvellement .....	24
I.1.2. La différenciation .....	24
I.2. Généralités sur les leucémies aiguës .....	25
I.3. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) .....	26
I.3.1. Epidémiologie .....	26
I.3.2. Etiologies .....	27
I.3.3. La leucémogénèse .....	27
I.3.4. Diagnostic biologique .....	30
I.3.4.1. Numération formule sanguine (NFS) .....	30
I.3.4.2. Réalisation du myélogramme .....	30
I.3.4.3. Immunophénotypage .....	33
I.3.4.4. Cytogénétique .....	34
I.3.4.4.1. Caryotype (cytogénétique conventionnelle) .....	34
I.3.4.4.2. FISH (Hybridation in situ fluorescente) : la cytogénétique moléculaire .....	35
I.3.4.4.3. OGM (Optical genome mapping) .....	35
I.3.4.5. Biologie moléculaire .....	36
I.3.4.5.1. Détection des transcrits .....	37
I.3.4.5.2. Détection des mutations .....	37
I.3.4.6. Classification OMS et ICC 2022 .....	39
I.3.5. Facteurs pronostiques .....	41
I.3.6. Prise en charge thérapeutique des LAM .....	42
I.3.6.1. Chimiothérapie .....	43
I.3.6.2. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques .....	44
I.3.7. Evaluation de la réponse au traitement : Maladie résiduelle (MRD) .....	45
I.3.7.1. Les techniques d'évaluation de la maladie résiduelle .....	47
I.3.7.1.1. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux .....	48
I.3.7.1.2. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire .....	49
I.4. LAM avec réarrangement de <i>NUP98</i> .....	51
I.4.1. Rôle physiologique de <i>NUP98</i> .....	51
I.4.2. Partenaires de fusion de <i>NUP98</i> .....	53
I.5. LAM avec fusion <i>NUP98::NSD1</i> .....	56
II. Objectifs .....	61
III. Matériels et méthodes .....	62
III.1. Patients .....	62
III.2. Méthodes .....	62
III.2.1. Isollements cellulaires .....	62
III.2.2. Extraction d'ARN .....	62
III.2.2.1. Extraction manuelle par le TRIzol .....	62
III.2.2.2. Extraction automatisée par le maxwell .....	62
III.2.3. Dosage et normalisation des ARN extraits .....	63
III.2.4. Reverse transcription ou rétro-transcription (RT) .....	63
III.2.5. La PCR digitale (droplet digital PCR ou ddPCR) .....	63

III.2.5.1. Amorces et sondes .....	63
III.2.5.2. Mode opératoire .....	64
III.2.5.3. Analyse des données .....	65
IV. Résultats .....	67
IV.1. Caractéristiques initiales des patients LAM avec réarrangement de <i>NUP98</i> .....	67
IV.2. Validation de la méthode de ddPCR .....	69
IV.2.1. Validation technique .....	69
IV.2.2. La limite de détection et linéarité .....	69
IV.2.3. Répétabilité .....	70
IV.2.4. Reproductibilité .....	70
IV.3. Quantification de <i>NUP98::NSD1</i> par ddPCR sur les échantillons de patients .....	71
IV.3.1. Patient 4.....	71
IV.3.2. Patient 5.....	72
IV.4. MRD en CMF versus MRD en PCR digitale.....	74
V. Discussion .....	76
Conclusion .....	78
Références bibliographiques .....	79
Annexes .....	86
Serment De Galien.....	105

## Table des illustrations

Figure 1 : Site de déroulement de l'hématopoïèse, <i>thèse de Hammoud</i> (11).....	23
Figure 2 : Divisions asymétrique et symétrique des cellules souches hématopoïétiques, <i>d'après Pina et Enver</i> (15).....	24
Figure 3 : Différenciation des cellules souches hématopoïétiques au cours de l'hématopoïèse, <i>d'après Comazzetto</i> (17).....	25
Figure 4 : Taux d'incidence des LAM selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018, <i>d'après les données du réseau Francim</i> (21).....	27
Figure 5 : Catégories fonctionnelles d'anomalies impliquées dans les LAM, <i>d'après Döhner et al.</i> (23).....	28
Figure 6 : Ponction en iliaque postérieur de la moelle osseuse, <i>d'après Winslow</i> (31).....	31
Figure 7 : Impact des anomalies cytogénétiques récurrentes sur la survie globale dans la LAM, <i>d'après Grimwade et al.</i> (33).....	35
Figure 8 : Les différentes classes d'anomalies moléculaires retrouvées dans la LAM de l'adulte et les mutations génétiques pouvant être associées, <i>d'après Dohner et al. (ELN 2017)</i> (36).....	36
Figure 9 : Systèmes de PCR digitale, <i>d'après Joudinaud et al.</i> (38).....	38
Figure 10 : Les seuils de sensibilité des techniques de maladie résiduelle dans les LAM,....	46
Figure 11 : Principe de la PCR digitale (69).....	50
Figure 12 : Estimation du nombre de copies d'ADNc dans un échantillon selon la loi poisson. ....	51
Figure 13 : Structure du complexe formant le pore nucléaire avec localisation nucléocytoplasmique de la protéine NUP98. <i>Adapté de Ibarra et Hetzer</i> (72).....	52
Figure 14 : Rôle des domaines constituant le gène <i>NUP98</i> créée sur <i>BioRender.com</i> par <i>Mohanty Sagarajit</i> (71).....	53
Figure 15 : Diagramme à barres illustrant la prévalence des jonctions d'exons <i>NUP98</i> dans la LAM avec réarrangement de <i>NUP98</i> , <i>d'après Bertrums et al.</i> (74).....	56
Figure 16 : Isoforme long (L) et court (S) de <i>NSD1</i> avec les domaines fonctionnels <i>d'après Topchu et al.</i> (80).....	57
Figure 17 : Localisation de <i>NUP98</i> et de <i>NSD1</i> sur les chromosomes 11 et 5 respectivement avec les sondes utilisées en FISH. <i>Metasystems probes</i> (81).....	57
Figure 18 : Structure protéique des deux variants <i>NUP98::NSD1</i> , <i>adapté de Kivioja</i> (83) ....	58
Figure 19 : Taux de rémission complète chez les patients <i>NUP98::NSD1</i> et <i>non-NUP98::NSD1</i> dans la LAM, <i>d'après Tian et al.</i> (84).....	59
Figure 20 : Courbe de survie globale des patients <i>NUP98::NSD1</i> allogreffés et non <i>NUP98::NSD1</i> allogreffés, <i>d'après Tian et al.</i> (84).....	59
Figure 21 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) dans la cohorte adulte des patients <i>NUP98::NSD1</i> , <i>d'après Hollink et al</i> (10).....	60

Figure 22 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) dans la cohorte adulte des patients <i>NUP98::NSD1</i> associé ou non à la mutation <i>FLT3-ITD</i> , d'après <i>Hollink et al.</i> (10).....	60
Figure 23 : Génération des gouttelettes (A), répartition aléatoire des copies d'ADNc dans les gouttelettes (B), lecture de la fluorescence des gouttelettes (C) .....	65
Figure 24: Résultats de la ddPCR <i>NUP98-NSD1</i> en représentation 2D d'un puit pour un échantillon.....	66
Figure 25 : Résultats du nombre de gouttelettes dénombrées par puits d'une série de ddPCR .....	69
Figure 26 : Résultat de la mesure de la gamme de dilution sur une échelle logarithmique ...	69
Figure 27 : Evolution du transcrit de fusion <i>NUP98::NSD1</i> sur sang et moelle chez le patient 5.....	74
Figure 28 : Représentation graphique de la maladie résiduelle (CMF et ddPCR) du patient 5 .....	75

## Table des tableaux

---

Tableau 1: Classification FAB des LAM.....	32
Tableau 2 : Expression des marqueurs de surfaces cellulaires et cytoplasmiques pour le diagnostic de la LAM et de la leucémie aiguë ambiguë (MPAL) (8) .....	34
Tableau 3 : Classification OMS 2022 des types et sous-types de LAM en fonction des anomalies génétiques (6) .....	40
Tableau 4 : Stratification du risque selon les recommandations ELN 2022 (8) .....	42
Tableau 5 : Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle selon les recommandations ELN 2022 (8).....	47
Tableau 6 : Différents partenaires de fusion de <i>NUP98</i> dans la LAM, les sous-types de LAM associés selon la classification FAB .....	53
Tableau 7 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour le système <i>NUP98::NSD1</i> ....	63
Tableau 8 : Protocole ddPCR <i>NUP98::NSD1</i> .....	64
Tableau 9 : Caractéristiques initiales des 9 patients avec LAM <i>NUP98</i> .....	67
Tableau 10: Caractéristiques moléculaires, traitement, survie globale des patients LAM <i>NUP98::NSD1</i> .....	68
Tableau 11: Répétabilité du transcrit <i>NUP98::NSD1</i> .....	70
Tableau 12 : Reproductibilité du transcrit <i>NUP98::NSD1</i> .....	70
Tableau 13 : Ratio <i>NUP98::NSD1</i> des 6 patients de la cohorte .....	71
Tableau 14 : Cinétique sur sang et moelle du transcrit <i>NUP98::NSD1</i> chez le patient 4.....	72
Tableau 15 : Cinétique sur sang du transcrit <i>NUP98::NSD1</i> chez le patient 5 .....	73
Tableau 16 : Cinétique sur moelle du transcrit <i>NUP98::NSD1</i> chez le patient 5 .....	73

## Introduction

---

Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) sont des hémopathies caractérisées par une expansion clonale de progéniteurs/précurseurs hématopoïétiques myéloïdes bloqués à un stade plus ou moins avancé de leur différenciation, appelés blastes. Ces blastes prolifèrent de façon anarchique et incontrôlée dans la moelle osseuse et dans le sang bloquant ainsi l'hématopoïèse normale, ce qui entraîne par la suite une insuffisance médullaire et des cytopénies responsables des signes cliniques et biologiques caractéristiques de la maladie. Cette prolifération maligne est due à diverses anomalies génétiques comprenant des réarrangements chromosomiques ainsi que des mutations (1,2).

Les LAM sont un groupe de pathologies hétérogènes et rares touchant majoritairement les sujets âgés et un peu plus les hommes (sex-ratio homme/femme = 1,3). Le traitement repose principalement sur la chimiothérapie mais il peut être complété par une allogreffe de cellules souches hématopoïétiques (CSH) en fonction du pronostic de la maladie et du patient c'est-à-dire sa capacité à supporter la toxicité de l'allogreffe. On distingue la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP) qui bénéficie d'un traitement spécifique très efficace et est donc d'excellent pronostic (3).

Hors LAP, la survie globale à 5 ans des LAM est de 24% (4). Ce taux faible s'explique par le fait que la majorité des patients répondant au traitement initial finissent par rechuter de leur leucémie qui devient réfractaire.

En 1976, la classification FAB (French–American–British) a établi 8 sous-types de LAM selon des critères morphologiques et cytochimiques (5). Le développement des techniques de cytogénétique et de biologie moléculaire a permis d'identifier la plupart des anomalies génétiques responsables des LAM (anomalies « *drivers* ») et les classifications actuelles, celle de l'OMS 2022 (Organisation Mondiale de la Santé) (6) et l'ICC 2022 (International Consensus Classification) (7) sont basées sur la mise en évidence de ces anomalies qui définissent des entités de leucémies distinctes. Les anomalies génétiques occupent également une place centrale dans l'établissement du pronostic et la définition de la stratégie thérapeutique des LAM. La classification de l'ELN (European Leukemia Net) distingue ainsi des groupes de risques distincts (favorable, intermédiaire et défavorable) en fonction de certaines anomalies génétiques (8).

Dans la nouvelle classification OMS de 2022 est apparue une nouvelle entité de LAM caractérisée par un réarrangement du gène *NUP98*. Il s'agit d'une entité associée à un pronostic défavorable. Les réarrangements de *NUP98* impliquent différents partenaires et certains sont cryptiques au caryotype conventionnel (9). Le réarrangement le plus fréquemment retrouvé est la translocation t(5;11)(q35;p15.5) qui entraîne la formation du transcrit de fusion *NUP98::NSD1* codant pour une protéine chimérique comprenant l'extrémité N-terminale de la nucléoporine 98 (NUP98) et l'extrémité C-terminale de la protéine NSD1. Cette translocation est cryptique au caryotype mais d'autres techniques de cytogénétique (comme la Fluorescence In Situ Hybridation, FISH ou l'Optical Genome Mapping, OGM) et de biologie moléculaire (PCR quantitative après reverse transcriptase, RT-qPCR ; RNA Sequencing ; Reverse transcription multiplex ligation-dependant probe amplification, RT-MLPA) permettent de détecter cette altération moléculaire. La prévalence des LAM *NUP98::NSD1* est plus élevée dans la population pédiatrique que chez les adultes (10).

Dans les LAM avec un transcrit de fusion, la quantification du transcrit de fusion constitue une méthode fiable et robuste pour évaluer la persistance de cellules leucémiques résiduelles au cours du suivi du traitement (i.e. minimal residual disease, MRD). Le suivi de la MRD peut permettre d'évaluer la qualité de la réponse au traitement ou de détecter précocement une rechute afin d'adapter rapidement la stratégie thérapeutique. Actuellement aucun suivi de la MRD en biologie moléculaire n'a été officiellement mis en place pour le transcrit *NUP98::NSD1*.

La méthode recommandée par l'ELN pour la quantification des transcrits de fusion dans les LAM et la plus utilisée par la majorité des laboratoires de biologie moléculaire est la RT-PCR quantitative en temps réel qui fournit une quantification relative du transcrit de fusion. Cependant, pour s'affranchir de la nécessité des gammes d'étalonnage avec des dilutions de témoins positifs tels que des plasmides, la PCR digitale s'est imposée ces dernières années comme une méthode pertinente, permettant une quantification absolue, ce qui est particulièrement utile pour les altérations rares comme le transcrit *NUP98::NSD1*.

L'objectif de cette étude était donc de mettre au point et d'évaluer la quantification du transcrit *NUP98::NSD1* par PCR digitale, afin de valider cette technique en pratique courante pour le diagnostic et le suivi de la maladie résiduelle chez les patients atteints de LAM à l'hôpital Saint-Louis de Paris.

# I. Rappels bibliographiques

## I.1. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus physiologique au cours duquel des cellules souches hématopoïétiques (CSH) produisent tous les éléments figurés du sang. Ce processus se déroule principalement dans la moelle osseuse chez les adultes et dans le foie et la rate chez le fœtus (Figure 1).

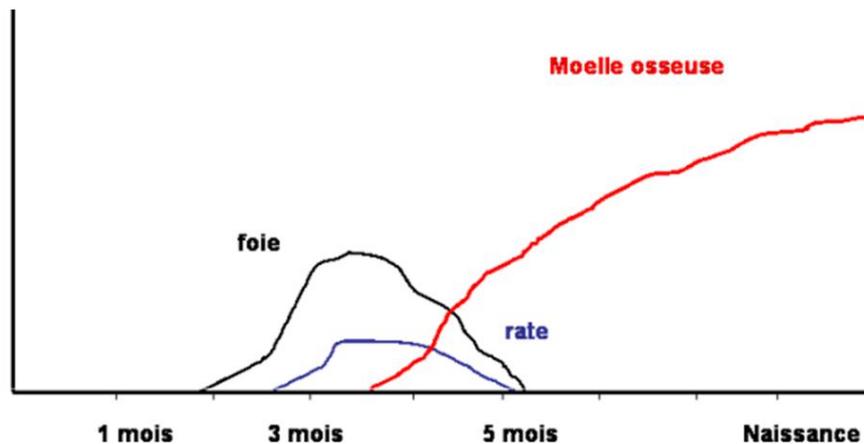


Figure 1 : Site de déroulement de l'hématopoïèse, thèse de Hammoud (11)

*L'hématopoïèse débute dans le sac vitellin au cours des premières semaines du développement de l'embryon. Vers le 4ème mois de la vie intra-utérine, la moelle osseuse commence à être colonisée et finira par devenir le site majeur de l'hématopoïèse chez l'adulte.*

Les CSH sont rares (~0,01%) (12) et se trouvent principalement dans le microenvironnement de la moelle osseuse, appelé niche hématopoïétique (13).

Elles possèdent des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation et de quiescence (en phase G0 pour se protéger des agressions extérieures comme la chimiothérapie ou la radiothérapie) leur permettant de maintenir l'homéostasie hématopoïétique. Ces CSH permettent la reconstitution de l'hématopoïèse chez les patients allogreffés car elles ont également la capacité d'aller se nicher dans la moelle osseuse du receveur après injection pour reconstruire l'hématopoïèse. C'est ce qui a été démontré par *Till et McCulloch* en 1961 après transplantation d'une faible quantité de cellules médullaires à des souris receveuses (14). Les CSH multipotentes peuvent se diviser dans la niche hématopoïétique par division cellulaire symétrique pour assurer le renouvellement du stock de CSH (production de deux CSH filles identiques) et par division cellulaire asymétrique pour produire tous les éléments figurés du sang (Figure 2).

Lorsque l'homéostasie hématopoïétique est rompue, cela conduit à la production de cellules immatures bloquées dans leurs stades de différenciation ou de cellules matures ayant perdu leur fonction apoptotique.

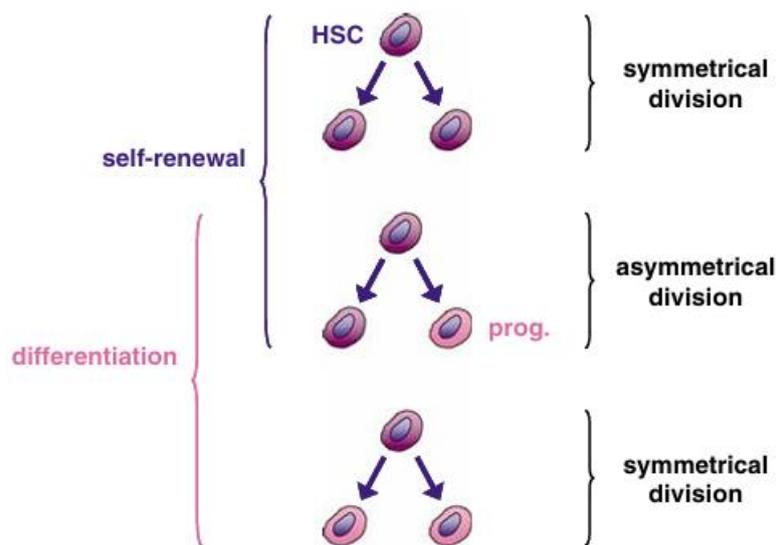


Figure 2 : Divisions asymétrique et symétrique des cellules souches hématopoïétiques, d'après Pina et Enver (15)

### I.1.1. L'auto-renouvellement

L'auto-renouvellement est la capacité des cellules à donner des CSH filles identiques constituant une réserve pour la production de cellules matures du sang. Ce processus est régulé par des facteurs intrinsèques tels que les facteurs de transcription, l'état du cycle cellulaire et les voies métaboliques, ainsi que de manière extrinsèque par la niche hématopoïétique (16).

Dans la niche hématopoïétique, nous retrouvons deux types de CSH avec une capacité d'auto-renouvellement différente : les CSH-LT (les cellules souches hématopoïétiques à long terme) et les CSH-CT (les cellules souches hématopoïétiques à court terme). Les CSH-LT sont capables d'assurer leur propre auto-renouvellement tout au long de la vie d'un individu. Celles-ci seront pour la plupart dans une phase de repos quiescente où elles ne se divisent pas ou ne se préparent pas à la division cellulaire (phase G0). Toutefois, elles peuvent sortir de cette quiescence et se préparer à entrer dans le cycle cellulaire en vue de se multiplier (phase G1) et retourner par la suite en quiescence indéfiniment (15). Après différenciation, les CSH-LT deviennent des CSH-CT qui ont toujours leur capacité d'auto-renouvellement mais à court terme avant de ne plus pouvoir s'auto-renouveler et se différencier en progéniteurs primitifs multipotents (PPM).

### I.1.2. La différenciation

La différenciation est la capacité des CSH à produire toutes les cellules matures du sang. Les PPM se différencient en progéniteurs lymphoïdes communs (PLC) et en progéniteurs myéloïdes communs (PMC). Par la suite, on a une différenciation supplémentaire des PLC qui génèrent des lymphocytes T, des lymphocytes B et des lymphocytes NK tandis que les MPC produisent les basophiles, les éosinophiles, les érythrocytes, les mégacaryocytes, les monocytes et les neutrophiles. Les monocytes peuvent par la suite se différencier en cellules dendritiques, en macrophages ou en pro-ostéoblastes (Figure 3).

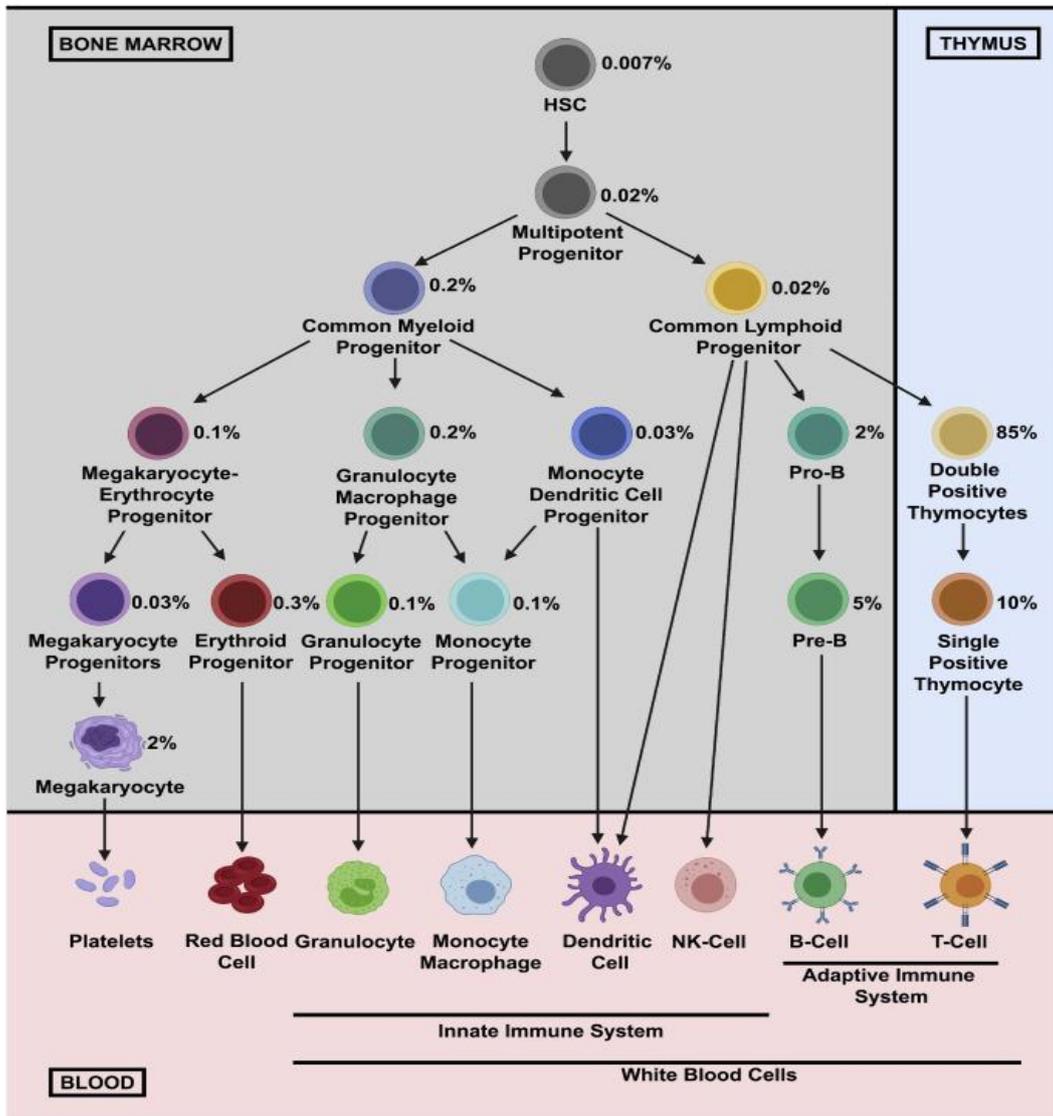


Figure 3 : Différenciation des cellules souches hématopoïétiques au cours de l'hématopoïèse, d'après Comazzetto (17)

## I.2. Généralités sur les leucémies aiguës

Les leucémies aiguës (LA) sont un groupe d'hémopathies agressives résultant de la prolifération clonale incontrôlée de cellules immatures de la moelle osseuse bloquées dans leur différenciation, les blastes (2). La prolifération rapide des blastes entraîne un envahissement médullaire par des cellules immatures perturbant ainsi l'hématopoïèse normale.

Les LA se distinguent en 2 catégories :

- Les leucémies aiguës lymphoblastiques (LAL) : plus fréquentes chez l'enfant (80%) que chez l'adulte (20%)
- Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM) : plus fréquentes chez l'adulte (80%) que chez l'enfant (20%)

### **I.3. Les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)**

La leucémie aiguë myéloïde (LAM) est une maladie clonale des cellules souches hématopoïétiques caractérisée par l'inhibition de la différenciation et l'accumulation de cellules immatures suivie d'une insuffisance médullaire responsable de cytopénies (18). Ces cytopénies provoquent des manifestations cliniques telles que : un syndrome anémique responsable de fatigue et de dyspnée, un syndrome infectieux (fièvre, infections) en rapport avec la neutropénie, un syndrome hémorragique cutané et/ou muqueux en rapport avec la thrombopénie et/ou avec une coagulation intravasculaire disséminée (CIVD) associée. La CIVD est plus fréquemment associée à la leucémie aiguë promyélocytaire (LAP). On peut noter également un syndrome tumoral marqué par une splénomégalie, une hépatomégalie, des adénopathies, des douleurs osseuses et des atteintes cutanéomuqueuses (hypertrophie gingivale et « leukemia cutis »).

Le taux de survie à 5 ans estimé dans la LAM de l'adulte ne dépasse pas 40 % (19). Ce taux est plus élevé chez l'adulte jeune (patients < 60 ans) que chez les patients âgés.

Le traitement des LAM repose sur la chimiothérapie standard dans les LAM de bon pronostic, mais le recours à la greffe de cellules souches hématopoïétiques (GCSH) reste le seul traitement curatif, dans la plupart des LAM. L'obtention d'une rémission complète définie par la disparition des blastes détectables en cytologie est le premier objectif du traitement, mais la recherche de cellules leucémiques résiduelle (minimal residual disease, MRD) avec des outils moléculaires à haute sensibilité est importante pour évaluer la qualité de la réponse initiale et détecter précocement une éventuelle rechute (20).

#### **I.3.1. Epidémiologie**

D'après les données du réseau Francim, on notait 3428 nouveaux cas de LAM en France en 2018. Le taux d'incidence standardisé monde (TSM) est de 3,1/100 000 personnes-années chez l'homme et 2,3/100 000 personnes-années chez la femme avec un sexe ratio homme/femme égal à 1,35.

La LAM peut survenir à tout âge, mais elle est plus fréquente chez les patients âgés (> 65 ans). L'incidence est faible avant 50 ans puis augmente significativement avec l'âge avec un âge médian au diagnostic de 69 ans chez l'homme et de 72 ans chez la femme (21).

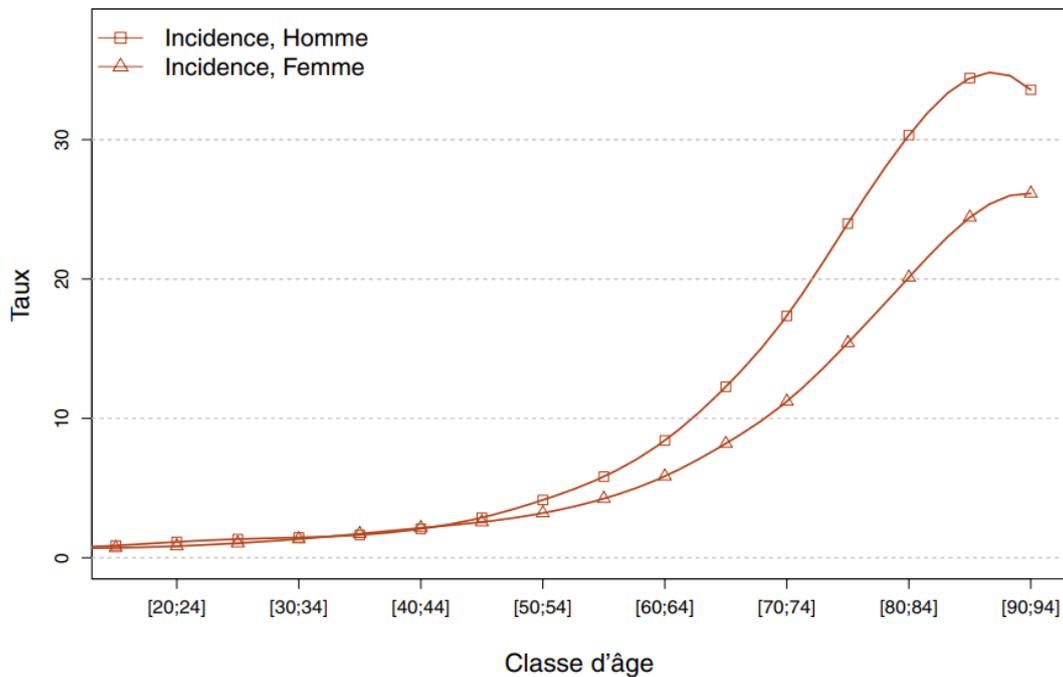


Figure 4 : Taux d'incidence des LAM selon la classe d'âge et le sexe en France en 2018, d'après les données du réseau Francim (21)

### I.3.2. Etiologies

L'étiologie de la LAM est hétérogène. Elle survient généralement de novo, mais peut également être secondaire à une exposition à des facteurs environnementaux : expositions au benzène et à ses dérivés, aux hydrocarbures aromatiques, au tabac et aux rayonnements ionisants, à des médicaments qui endommagent l'ADN (chimiothérapie : agents alkylants, inhibiteurs de topoisomérase de type II, anthracyclines, taxanes) ou à l'évolution clonale d'un syndrome myéloblastique (SMD) ou d'un syndrome myéloprolifératif (SMP). Certains syndromes génétiques peuvent également prédisposer à cette hémopathie (syndrome de Down, syndrome de Klinefelter, ataxie télangiectasies, syndrome de Shwachman, neurofibromatose, anémie de Fanconi) ainsi que certains variants constitutionnels dans des gènes tels que *RUNX1*, *GATA2*, *CEBPA*, *DDX41*, etc... (8).

### I.3.3. La leucémogénèse

La leucémogénèse résulte de la coopération entre des mutations activatrices dans les gènes qui stimulent les voies de transduction du signal et induisent la prolifération ou la survie cellulaire (comme *FLT3*, *NRAS*, *KRAS*, *KIT*, *PTPN11* et *CBL*) et les mutations dans les gènes qui affectent les facteurs de transcription et entraînent un blocage de maturation des précurseurs hématopoïétiques (comme *RUNX1*, *CEBPA*, ...) (22). De plus, on sait maintenant qu'au-delà de ces mutations « *drivers* », il existe également d'autres altérations génétiques touchant l'expression ou l'épigénétique (*TET2*, *DNMT3A*). Il est décrit également le rôle du microenvironnement dans la résistance au traitement. Le tout est responsable de la grande diversité des phénotypes et des évolutions

Les mutations sur les gènes *DNMT3A*, *TET2* et *ASXL1*, sont plus fréquentes dans l'hématopoïèse clonale et semblent être des événements relativement précoces dans la leucémogénèse, tandis que les mutations de *FLT3*, *NRAS* et *RUNX1* ont tendance à être acquises plus tard au cours du développement de la leucémie. Les combinaisons de mutations

qui conduisent finalement à la leucémogénèse sont influencées par la coopérativité biologique et l'exclusivité mutuelle entre les gènes mutés (8).

L'ensemble des altérations moléculaires pouvant coopérer dans la LAM ont été décrites et regroupées en 8 catégories (Figure 5).

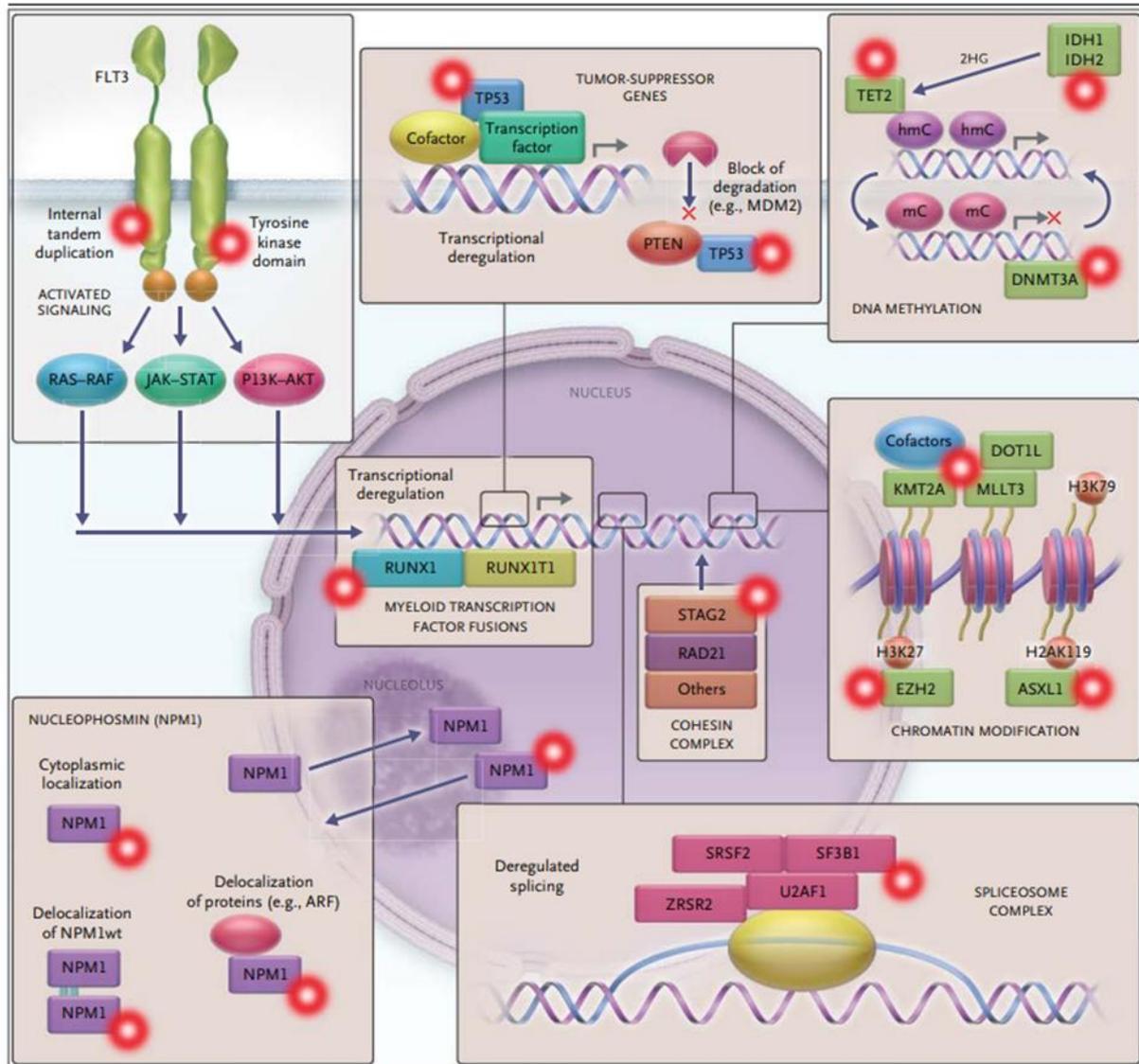


Figure 5 : Catégories fonctionnelles d'anomalies impliquées dans les LAM, d'après Döhner et al. (23)

- **Mutations de *NPM1*** : les mutations du gène de la nucléophosmine (*NPM1*) codant pour une protéine nucléocytoplasmique entraînent une localisation cytoplasmique aberrante de *NPM1* et des protéines interagissant avec *NPM1*. Ce sont les mutations les plus fréquentes (représentent environ 1/3 des patients au diagnostic) dans la LAM de l'adulte (24,25). L'altération de ce gène a des implications cliniques, biologiques et pronostiques dans la LAM.
- **Mutations activatrices de la signalisation** :
  - ***FLT3*** : les mutations de ce gène sont de deux types et font parties des mutations les plus fréquentes observées : les duplications en tandem interne (ITD) dans le

domaine juxtamembranaire et les mutations survenant dans le domaine tyrosine kinase (TKD) (26). Les mutations *FLT3-ITD* ont été identifiées chez 20 % des patients atteints de LAM et chez 28 à 34 % de ceux atteints d'une LAM avec un caryotype normal (LAM-CN) et sont de mauvais pronostic (26,27). Les mutations *FLT3-TKD* représentent 10% des cas de LAM et sont également de pronostic défavorable (28). Ce sont des mutations ponctuelles affectant notamment les codons 835 et 836 du domaine tyrosine kinase de la protéine. Ces mutations entraînent une activation constitutive de la protéine et confèrent un avantage prolifératif via les voies de signalisation JAK-STAT, PI3K – AKT, RAS, RAF.

- **NRAS et KRAS** : ce sont des mutations décrites dans plusieurs tumeurs solides et hémopathies malignes. Les mutations *NRAS* semblent être les mutations de la voie RAS les plus importantes chez les patients atteints de LAM et sont souvent associées aux mutations *NPM1* et *CEBPA* (24).
- **KIT** : les mutations du gène *KIT* sont rares dans la LAM (<5%), mais elles sont présentes dans environ 22 à 29% des LAM du groupe Core Binding Factor (CBF) comprenant les LAM avec *t(8;21)(q22;q22)* ou *inv(16)(p13.1q22)* entraînant les gènes de fusion respectifs *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11*. Il a été démontré que les mutations de *KIT* confèrent un risque de rechute plus élevé et une survie globale plus faible (29).

- **Altérations de facteurs de transcription**

Ces altérations entraînent un blocage de maturation des précurseurs hématopoïétiques.

- **CEBPA** : *CEBPA* est un facteur de transcription impliqué dans le développement des progéniteurs myéloïdes. Les mutations de *CEBPA* (souvent bi-alléliques) sont détectées chez 10 à 18 % des patients atteints de LAM à caryotype normal, et affectent soit l'extrémité N-terminale avec des mutations non-sens conduisant à une protéine tronquée inefficace, soit l'extrémité C-terminale impliquée dans la dimérisation et la liaison à l'ADN (26).
- **RUNX1** : les mutations et fusions impliquant *RUNX1* (*RUNX1::RUNX1T1*), conduisent à une dérégulation transcriptionnelle et à une différenciation hématopoïétique anormale.

- **Altérations de facteurs de régulation épigénétique**

Les mutations de gènes impliqués dans l'homéostasie épigénétique des cellules, telles que les mutations de ***ASXL1*** et ***EZH2*** ou les fusions impliquant ***KMT2A*** conduisent à une dérégulation de la modification de la chromatine (par exemple, méthylation des histones H3 et H2A sur les résidus lysine K79, K27 et K119 respectivement).

Les mutations ***DNMT3A*** et ***TET2***, ainsi que les mutations ***IDH1*** et ***IDH2***, agissant via la production de métabolites oncogènes : le 2-hydroxyglutarate (2HG), peuvent conduire à la dérégulation de la méthylation de l'ADN.

- **Les gènes suppresseurs de tumeurs**

- **TP53** : des mutations de *TP53* sont retrouvées dans 12 à 13 % de tous les cas de LAM, sont associées à un caryotype complexe et sont de mauvais pronostic (30). *TP53* est impliqué dans l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, la sénescence et le métabolisme.

- **Les gènes du complexe de la cohésine**

Les mutations génétiques du complexe de la cohésine, telles que **STAG2** et **RAD21**, pourraient altérer la ségrégation des chromosomes et la régulation transcriptionnelle. Ces gènes sont également impliqués dans les modifications post-traductionnelles des histones (1).

- **Les gènes du splicéosome**

Les mutations des gènes du splicéosome tels que **SRSF2**, **SF3B1**, **U2AF1** et **ZRSR2** sont impliquées dans la dérégulation de l'épissage des ARN pré-messagers, affectant ainsi certains gènes clés de l'hématopoïèse.

#### **I.3.4. Diagnostic biologique**

Plusieurs examens biologiques permettent de réaliser le diagnostic de la LAM. Une numération formule sanguine mettant en évidence une cytopénie fait suspecter une hémopathie. L'analyse morphologique du frottis sanguin permet parfois d'identifier des cellules tumorales circulantes. Le myélogramme est ensuite réalisé afin de préciser le diagnostic de l'hémopathie.

##### **I.3.4.1. Numération formule sanguine (NFS)**

La NFS d'une LAM se caractérise généralement par : 1, 2 ou 3 cytopénies. La LAM est soit leucopénique (GB < 4G/L) soit hyperleucocytaire (GB > 10 G/L). L'hyperleucocytose majeure (GB > 100 G/L) peut s'accompagner d'une leucostase correspondant à une accumulation anormale de globules blancs dans les capillaires pulmonaires et cérébraux. Le syndrome de leucostase est souvent retrouvé dans les leucémies aiguës à composante monocytaire (LAM4 et LAM 5 selon la classification FAB) (Tableau 1).

##### **I.3.4.2. Réalisation du myélogramme**

La ponction de la moelle osseuse consiste à aspirer des cellules médullaires, en insérant une aiguille ou un trocard dans l'os iliaque ou le sternum dans des conditions stériles (Figure 6). Des frottis médullaires sont réalisés et colorés au May Grunwald giemsa (MGG) puis analysés afin d'évaluer la morphologie des blastes et l'envahissement médullaire.

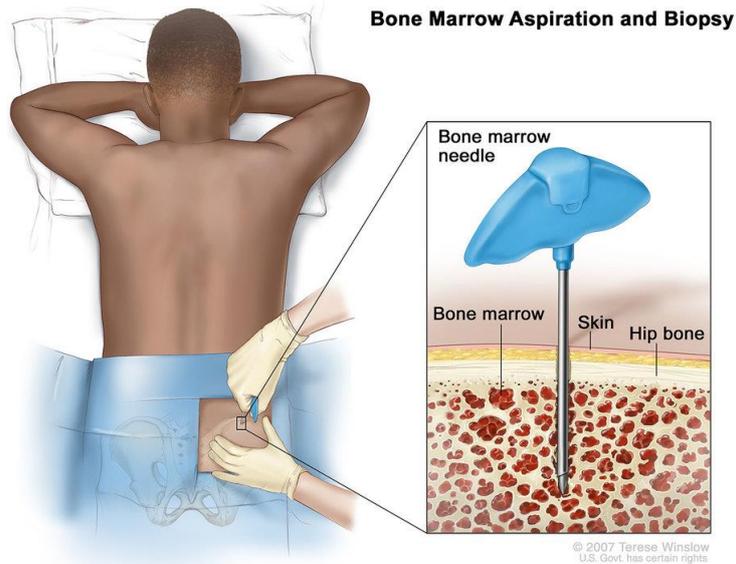


Figure 6 : Ponction en iliaque postérieure de la moelle osseuse, d'après Winslow (31)

Pour confirmer l'origine myéloïde et définir le sous-type de la leucémie aiguë, un immunophénotypage des blastes est réalisé afin de classer le sous-type de LAM et d'identifier les thérapies ciblées potentielles.

- **Classification FAB (French-American-British)**

La classification FAB a été la première classification des LAM élaboré en 1976 par le groupe coopératif franco-américain britannique (FAB) (5). Elle repose sur des critères morphologiques et cytochimiques de la LAM. La cytochimie permet de détecter l'activité de la myéloperoxydase, enzyme spécifique des granulations primaires des cellules de la lignée granulo-monocytaire afin de poser le diagnostic différentiel entre une leucémie aiguë myéloïde et lymphoblastique.

On y distingue 8 entités (M0 à M7) selon le stade de différenciation dans lequel les progéniteurs/précurseurs hématopoïétiques sont bloqués.

Tableau 1: Classification FAB des LAM

Sous-type de LAM selon FAB	Dénomination	Cytologies et cytochimies
<b>LAM0</b>	LAM avec différenciation minimale (< 5% des LAM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥90% de blastes médullaires</li> <li>• Aspect indifférencié des blastes (absence de granulations ou corps d'auer)</li> <li>• MPO négative</li> </ul>
<b>LAM1</b>	LAM sans différenciation (20% des LAM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 90% de blastes médullaires</li> <li>• Possibles granulations dans les blastes et parfois rares corps d'auer</li> <li>• MPO positive</li> <li>• Présence d'une maturation granuleuse estimée à moins de 10 % des éléments médullaires</li> </ul>
<b>LAM2</b>	LAM avec différenciation (30% des LAM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 20 à 90% de blastes médullaires</li> <li>• Granulations et corps d'Auer fréquents dans les blastes</li> <li>• MPO positive</li> <li>• Persistance d'une maturation granuleuse estimée à plus de 10% des éléments médullaires</li> </ul>
<b>LAM3</b> <b>LAM3v</b>	LA promyélocytaire (10% des LAM)	<p>% de blastes variables, diagnostic posé si présence de la fusion <i>PML::RARA</i></p> <p><b>LAM3 « classique »</b> (leucopénique) : aspect de promyélocytes anormaux : noyaux repliés, bilobés, blastes hypergranulaires (nombreuses granulations cytoplasmiques dystrophiques), corps d'auer en fagots</p> <p><b>LAM3 variante</b> (souvent hyperleucocytaire) : blastes agranulaires voire hypogranulaires, noyau bilobé en « aile de papillon »</p> <p>MPO fortement positive</p>
<b>LAM4</b> <b>LAM4Eo</b>	LA myélomonocytaire (15% des LAM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 20% de blastes médullaires</li> <li>• Morphologie des blastes proche de celle de la LAM2</li> <li>• Monocytose sanguine ≥ 5.10<sup>9</sup>/L et/ou médullaire ≥ 20%</li> </ul> <p><b>LAM4 à éosinophiles</b> : fusion <i>CBFB::MYH11</i> quel que soit le % de blastes : présence d'éosinophiles anormaux (grosses granulations dystrophiques basophiles)</p>
<b>LAM5a</b> <b>LAM5b</b>	LA monoblastique (15% des LAM)	<p>Lignée monocytaire ≥ 80% des cellules leucémiques</p> <p>LAM5a : principalement des monoblastes</p> <p>LAM5b : principalement des promonocytes et monocytes</p> <p>MPO négative ou positive faible</p> <p>Estérasas non spécifiques inhibées par le NaF</p>
<b>LAM6</b>	LA érythroblastique (<5% des LAM)	<p><b>LAM6a</b> : Leucémie érythroïde pure ≥ 80% de précurseurs érythroblastiques, MPO négative</p> <p><b>LAM6b</b> : Leucémie érythroïde (ou érythro-leucémie) : Erythroblastes ≥ 50% des cellules médullaires, dysérythropoïèse fréquente, MPO positive</p>
<b>LAM7</b>	LA mégacaryoblastique (<5% des LAM)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• ≥ 20% des cellules médullaires dont au moins la moitié sont des mégacaryoblastes</li> <li>• Myélofibrose</li> <li>• MPO négative</li> </ul>

### I.3.4.3. Immunophénotypage

La cytométrie en flux multiparamétrique (CMF) est une technique rapide utilisée pour identifier et caractériser les blastes leucémiques suivant leur taille, leur structure et leurs antigènes (CD ou clusters of différenciation) présents en intra-cytoplasmique et à la surface de la membrane cytoplasmique. A l'aide d'une diffraction du faisceau laser, cette technique permet l'analyse de la taille de la cellule (diffraction lumineuse dans l'axe) et l'analyse de la structure de la cellule (diffraction lumineuse à 90°). Le fluorochrome couplé aux anticorps dirigé contre un antigène de la cellule sera simultanément excité par le faisceau laser. Un signal de fluorescence est ainsi recueilli et analysé.

La CMF présente plusieurs intérêts dans le bilan diagnostique de la leucémie aiguë :

- Elle est indispensable pour affirmer la lignée cellulaire à laquelle appartiennent les blastes leucémiques (cette stratégie repose sur l'identification de marqueurs forts de lignée) (Tableau 2 « diagnostic MPAL » ci-dessous)
- Elle permet de préciser le stade de différenciation qui permet de classer la leucémie aiguë selon la classification FAB
- Elle permet de déterminer la présence de marqueurs de surface pouvant avoir un intérêt thérapeutique (pour l'administration de thérapies ciblées)
- Elle permet la mise en évidence des marqueurs aberrants (infidélité de lignée ou LAIP) ou asynchronisme de maturation, indispensable pour un suivi phénotypique de la maladie résiduelle
- La quantification du contingent de cellules souches leucémiques (LSC) au diagnostic apprécie le pronostic de la pathologie. Une quantification des LSC supérieure à 5% du bulk leucémique oriente vers une LAM réfractaire à la chimiothérapie d'induction. Une quantification supérieure à 1% oriente elle, vers une LAM à haut risque de rechute. L'étude du compartiment LSC est également utilisée pour l'évaluation de la maladie résiduelle phénotypique (32).

Le tableau 2 reprend la liste des anticorps à utiliser selon les recommandations de l'ELN au diagnostic d'une LAM.

Tableau 2 : Expression des marqueurs de surfaces cellulaires et cytoplasmiques pour le diagnostic de la LAM et de la leucémie aiguë ambiguë (MPAL) (8)

<b>Diagnostic de LAM</b>	
Marqueurs des précurseurs myéloïdes	CD34, CD117, HLA-DR
Marqueurs myéloïdes	MPO cytoplasmique, CD33, CD13
Marqueurs de maturation myéloïdes	CD11b, CD15, CD64, CD65
Marqueurs monocytaires	CD14, CD36, CD64, CD4, CD11c
Marqueurs mégacaryocytaires	CD41 (glycoprotéine IIb/IIIa), CD61 (glycoprotéine IIIa), CD36, CD42
Marqueurs érythroïdes	CD235a (glycophorine A), CD71, CD36, CD105
<b>Diagnostic de MPAL</b>	
<b>Etude des marqueurs forts de lignée</b>	
Lignée myéloïde	MPO (par cytométrie en flux, immunohistochimie ou cytochimie) ou différenciation monocyttaire (au moins 2 parmi les marqueurs suivants : cytochimie estérase non spécifique, CD11c, CD14, CD64, lysozyme) ou au moins deux marqueurs myéloïdes c'est-à-dire CD177, CD33, CD13
Lignée T	CD3 cytoplasmique fort (avec anti-chaîne $\epsilon$ CD3) ou CD3 de surface
Lignée B	CD19 fort avec au moins un des marqueurs suivants fortement exprimés : CD79a cytoplasmique, cCD22 ou CD10, ou CD19 faible avec au moins deux des marqueurs suivants fortement exprimés : CD79a, cCD22 ou CD10
<b>Marqueurs MRD de base</b>	
	CD34, CD117, CD45, CD33, CD13, CD56, CD7, HLA-DR  Si monocyttaire : CD64, CD11b, CD4 (en plus)

#### I.3.4.4. Cytogénétique

##### I.3.4.4.1. Caryotype (cytogénétique conventionnelle)

Le caryotype est une analyse indispensable lors du diagnostic initial des LAM. Il permet de classer les chromosomes en fonction de leur taille, de leur indice centromérique et de la coloration des bandes afin de mettre en évidence des anomalies de nombre, des translocations, des inversions, des délétions et des gains chromosomiques avec une résolution d'environ 10 mégabases. Il met en évidence des anomalies cytogénétiques récurrentes ayant un intérêt diagnostique, thérapeutique et pronostique (Figure 7).

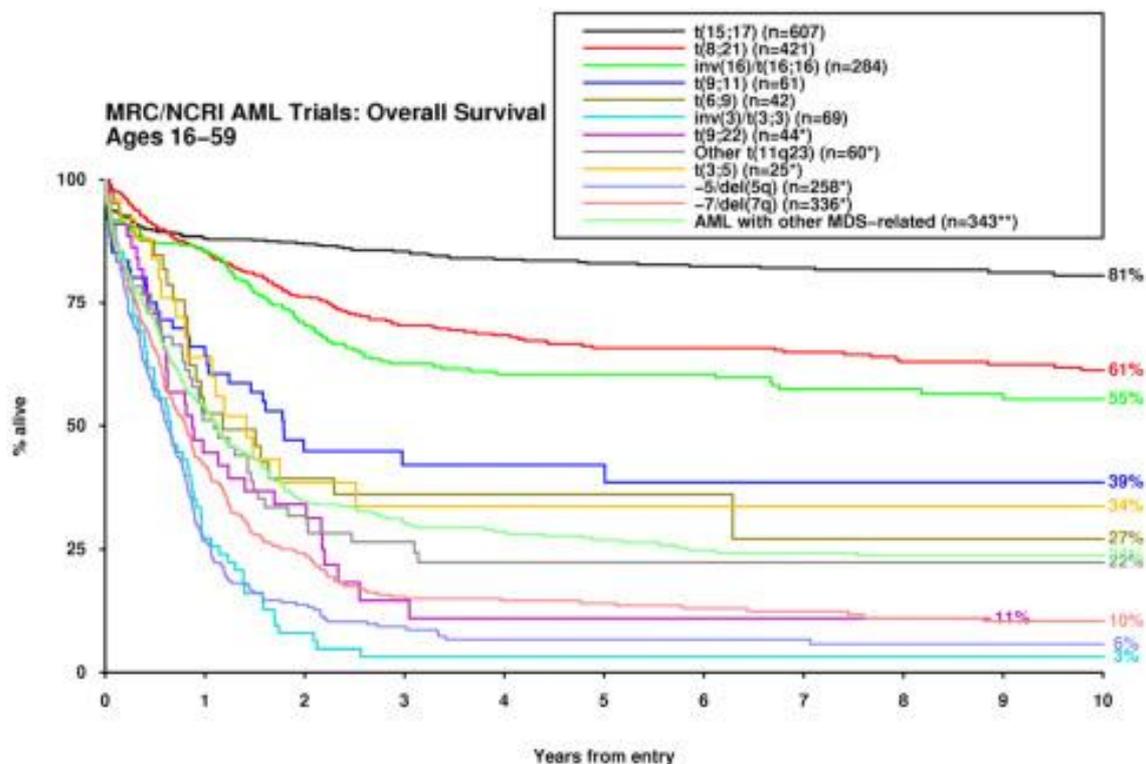


Figure 7 : Impact des anomalies cytogénétiques récurrentes sur la survie globale dans la LAM, d'après Grimwade et al. (33)

En cas d'échec de la cytogénétique conventionnelle ou de caryotype normal, l'hybridation in situ en fluorescence (FISH) ou la cartographie optique du génome (OGM) sont des alternatives pour détecter des anomalies spécifiques telles que les fusions de gènes ou d'autres anomalies chromosomiques.

#### I.3.4.4.2. FISH (Hybridation in situ fluorescente) : la cytogénétique moléculaire

La FISH est une technique ciblée qui utilise une sonde spécifique marquée par fluorescence complémentaire de l'ADN chromosomique. Elle est utilisée en complément du caryotype conventionnel pour détecter les réarrangements des gènes de fusion tels que : *RUNX1::RUNX1T1* et *CBFB::MYH11* ainsi que des réarrangements cryptiques au caryotype tels que ceux impliquant *NUP98* et *KMT2A* afin d'affiner la classification et de prédire le pronostic du sous-type de LAM. La technique peut être réalisée sur métaphases ou sur noyaux interphasiques.

#### I.3.4.4.3. OGM (Optical genome mapping)

L'OGM ou cartographie optique du génome est une technique récente qui permet de détecter en une seule analyse une multitude d'anomalies chromosomiques équilibrées ou non avec une précision et une grande résolution après extraction d'ADN de haut poids moléculaire (34). Elle ne nécessite pas de culture cellulaire préalable ni d'amplification de l'ADN. Quelques études récentes ont démontré que l'OGM pourrait remplacer les tests cytogénétiques traditionnels (caryotype, FISH et SNP-arrays) dans les pathologies constitutionnelles et les hémopathies malignes (35).

### I.3.4.5. Biologie moléculaire

Les techniques de biologie moléculaire ont permis de mieux cerner l'hétérogénéité de la LAM par la mise en évidence des anomalies moléculaires (Figure 8). Ceci a permis d'améliorer la prise en charge des patients notamment les patients avec une LAM à caryotype normal.

Ces techniques de biologie moléculaire regroupent le séquençage sanger, le séquençage à haut débit (Whole exome, séquençage ciblé avec un panel de gènes) pour la détection des mutations et la RT-qPCR, la RT-MLPA, le séquençage du transcriptome (RNA-seq) pour la détection des transcrits de fusion.

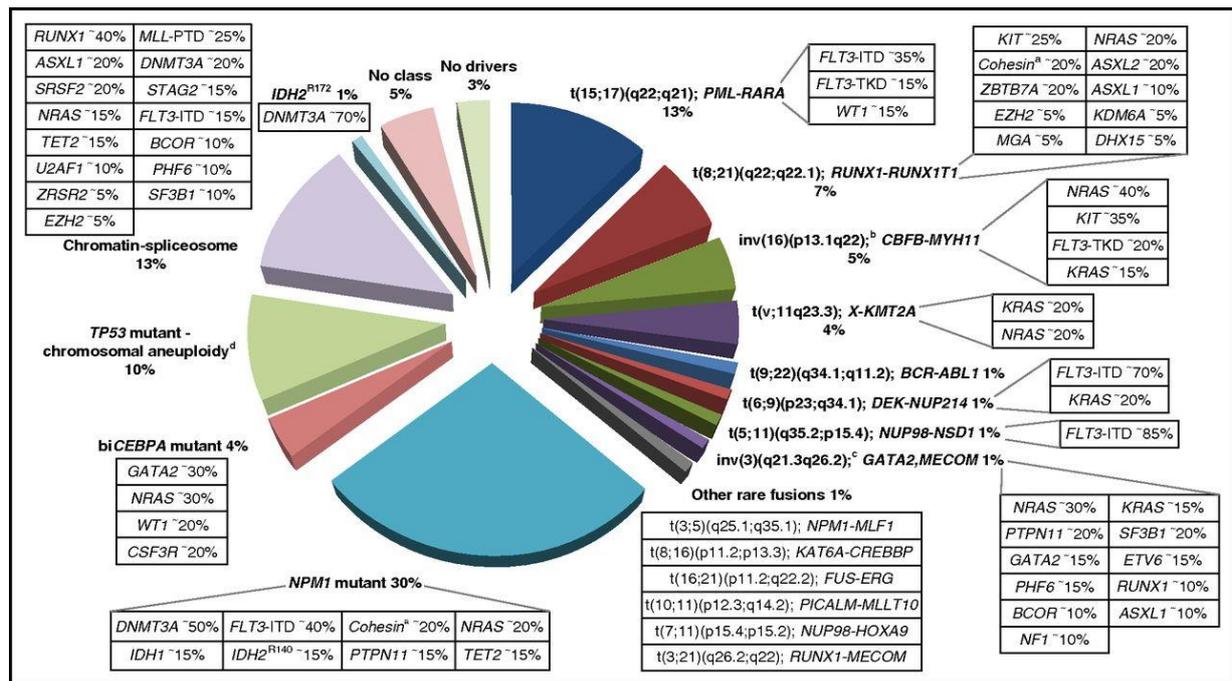


Figure 8 : Les différentes classes d'anomalies moléculaires retrouvées dans la LAM de l'adulte et les mutations génétiques pouvant être associées, d'après Dohner et al. (ELN 2017)(36)

La définition de la classe est basée sur l'étude de Papaemmanuil et al. (24). Pour chaque classe de LAM indiquée dans le graphique, les mutations concomitantes fréquentes sont indiquées dans les cases respectives.

Ces anomalies moléculaires sont des marqueurs diagnostiques et présentent un intérêt pronostique et thérapeutique.

Les dernières recommandations de l'ELN incluent la recherche du statut mutationnel de *NPM1*, *CEBPA* (associé à un pronostic favorable), *FLT3* (ITD : associé à un pronostic intermédiaire ; TKD : pour l'utilisation d'inhibiteur de tyrosine kinase comme la midostaurine), *IDH1*, *IDH2* (pour l'utilisation d'anti-IDH1 : ivosidénib ou d'anti-IDH2 : énasidénib), *TP53*, *ASXL1*, *BCOR*, *EZH2*, *RUNX1*, *SF3B1*, *SRSF2*, *STAG2*, *U2AF1*, *ZRSR2* (associé à un pronostic défavorable) ainsi que la recherche des réarrangements récurrents *PML::RARA*, *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1* (associé à un pronostic favorable) *KMT2A*, *BCR::ABL1* (associé à un pronostic défavorable au diagnostic initial) (8).

#### **I.3.4.5.1. Détection des transcrits**

- **RT-PCR/RT-qPCR**

La réaction de PCR réalisée à partir de cDNA obtenu par une réaction de transcription inverse, ou RT-PCR, permet de détecter spécifiquement les transcrits d'un gène. Avec des systèmes PCR composés d'amorces situées de part et d'autre du point de fusion d'un transcrit chimérique, il est possible de rechercher avec une grande sensibilité différents transcrits de fusion caractéristiques des LAM.

- **RT-MLPA**

La RT-MLPA a été mise au point en 2016 par une équipe du CHU de Rouen et permet d'identifier en une réaction un grand nombre de transcrits de fusion dans les LA (37).

Après une réaction de réverse transcription classique, son principe général repose sur l'hybridation puis la ligation de demi-sondes spécifiques des séquences de transcrits de fusion. Ces demi-sondes sont prolongées par des séquences consensus reconnues par un couple d'amorces de PCR universelles. Dans un premier temps, un mix de très nombreuses demi-sondes est mis en contact avec le cDNA afin de permettre leur hybridation aux séquences cibles. Puis, une ligase est incorporée pour catalyser la formation de liaisons covalentes entre les demi-sondes hybridées de façon adjacente seulement en présence de transcrit de fusion. Seules les sondes complètes ainsi formées peuvent par la suite être amplifiées par PCR à l'aide des amorces universelles se fixant à leurs deux extrémités. L'identification des amplicons correspondant au transcrit de fusion peut ensuite être réalisée par séquençage (38).

- **RNA-seq**

Le RNA-seq est la technique qui permet de faire le séquençage haut débit complet du transcriptome.

Les avantages du RNA-seq dans la détection des transcrits de fusion reposent sur la capacité d'identifier des fusions dont les gènes partenaires ne sont pas nécessairement connus et/ou qui peuvent être le produit de réarrangements cryptiques en cytogénétique conventionnelle (petites délétions, inversions, translocations ou duplications) (39).

Le RNAseq permet également d'analyser l'expression génique de façon globale et d'identifier des signatures d'expression caractéristiques de sous-types de leucémies. Enfin il peut également permettre de rechercher des mutations.

#### **I.3.4.5.2. Détection des mutations**

- **Séquençage Sanger**

Le séquençage Sanger permet de déterminer la séquence de nucléotides d'un ADN. À l'aide d'une amorce spécifique et complémentaire du brin étudié (sens ou antisens), une ADN polymérase effectue alors la synthèse de l'ADNc en ajoutant des désoxyribonucléotides-triphosphates (dNTP) complémentaires, de manière aléatoire et inconstante des didéoxyribonucléotides triphosphates (ddNTP) qui ont un effet terminateur de chaîne. Lorsqu'un ddNTP est incorporé à la place d'un dNTP, l'ADN polymérase ne peut plus continuer sa polymérisation. La réaction d'extension s'arrête (en effet, le didéoxyri nucléotide ne possède pas de groupe 3'-hydroxyle indispensable à la réaction de polymérisation de l'enzyme). Par conséquent, à la fin de la réaction, nous obtiendrons des fragments de taille différente (40). Depuis le développement du NGS qui permet le séquençage à haut débit de nombreuses

cibles, l'utilisation du séquençage Sanger tend à diminuer. Cette technique reste cependant intéressante dans certaines situations, en particulier la recherche de quelques mutations hotspot à fort impact pronostique et/ou thérapeutique dans les LAM, pour lesquelles une réponse rapide est nécessaire pour une prise en charge clinique optimale, telles que les mutations de *NPM1*.

- **PCR digitale**

La PCR digitale est une technologie basée sur la génération de gouttelettes permettant de partitionner la solution d'ADN ou cDNA (ADNc). La réaction de PCR se produit au sein des gouttelettes contenant également le mix de PCR. Comme dans la qPCR, une sonde d'hydrolyse fluorescente (sonde TaqMan) complémentaire de la séquence d'intérêt permet la détection des amplicons (Figure 9). Cependant, ici la détection de la fluorescence se fait « en point final » pour chaque gouttelette et la quantification est basée sur le nombre de gouttelettes positives et négatives (d'où le terme de PCR « digitale », dPCR ou droplet digital PCR, ddPCR).

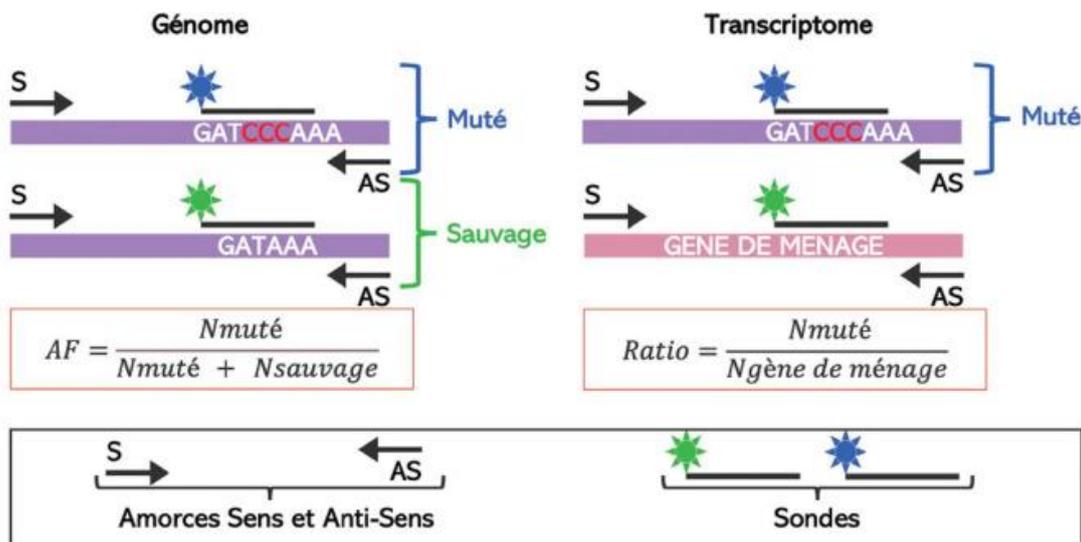


Figure 9 : Systèmes de PCR digitale, d'après Joudinaud et al. (38)

La technique de partitionnement varie selon les fabricants : sur support solide (micropuits) chez ThermoFisher (QS3D) ou support liquide (gouttelettes) chez Biorad (QX200) ou Stilla (Naica). Dans cette étude, nous avons utilisé la technologie de Biorad QX200 (Hercules, CA, USA). La technologie Biorad QX200 est composée de 2 appareils : le QX200 droplet generator qui partitionne l'échantillon en 20000 gouttelettes et le QX200 droplet reader pour la lecture des gouttelettes générées après amplification par PCR. Le logiciel QuantaSoft™ détermine ensuite le nombre de gouttelettes positives et négatives pour chaque fluorophore (par exemple, FAM et HEX ou VIC) dans chaque échantillon.

- **Séquençage haut débit d'un panel de gène ou Exome**

Le séquençage nouvelle génération (NGS) de l'ADN génomique permet de séquencer à haut débit de nombreux petits fragments d'ADN (<250 pb) en même temps et en peu de temps. Le NGS a un intérêt pronostique (dépend des anomalies génétiques retrouvées) et thérapeutique car il peut permettre d'identifier des mutations de gènes pouvant être des cibles thérapeutiques (par exemple les mutations sur les gènes *FLT3* ou *IDH* qui permettent d'utiliser des thérapies

ciblées) mais aussi les anomalies du nombre de copies. Cette technique est souvent utilisée au diagnostic de la LAM. L'une des difficultés de cette technique réside dans les bruits de fond générés lors de la préparation des bibliothèques ou du séquençage entraînant une difficulté d'interprétation des mutations de faibles fréquences alléliques (<1%).

Si la plupart des laboratoires de biologie moléculaire français impliqués dans la prise en charge des hémopathies malignes proposent actuellement un séquençage ciblé confinant l'analyse à quelques régions de gènes ou gènes entiers, des plateformes dites de très haut débit réalisent le séquençage de l'exome entier (whole exome sequencing), explorant toutes les régions codantes, voire le séquençage du génome entier (whole genome sequencing) permettant d'appréhender à la fois les régions codantes et non codantes, ces dernières représentant plus de 98 % du génome (38).

#### **I.3.4.6. Classification OMS et ICC 2022**

- **Classification OMS 2022**

La classification OMS de la LAM a été actualisée afin de faire apparaître les progrès majeurs réalisés au cours de ces dernières années dans l'élucidation des bases moléculaires de cette maladie grâce au développement d'outils diagnostiques moléculaires à haut débit (Tableau 3). Cette 5<sup>ème</sup> édition de la classification OMS distingue 12 sous-types de LAM définis par des anomalies génétiques récurrentes (comme les LAM avec fusion *PML::RARA* ou *RUNX1::RUNX1T1*), auxquelles s'ajoutent les LAM définies par un profil moléculaire apparenté aux syndromes myélodysplasiques tandis que les autres LAM restent classées morphologiquement par le stade de différenciation cellulaire (6). Un autre changement clé de cette nouvelle classification est la suppression du seuil de 20% de blastes dans le sang ou la moelle pour poser le diagnostic pour tous les types de LAM avec anomalies génétiques récurrentes (sauf la LAM avec transcrite *BCR::ABL1* et la LAM avec mutation *CEBPA*) (6,41).

Trois nouveaux sous-types de LAM avec des réarrangements caractéristiques impliquant *KMT2A* (anciennement *MLL*), *MECOM* et *NUP98* ont été introduits. Cependant les réarrangements impliquant ces trois gènes, en particulier *NUP98*, peuvent être cryptiques au caryotype conventionnel.

Tableau 3 : Classification OMS 2022 des types et sous-types de LAM en fonction des anomalies génétiques (6)

<b>Leucémie myéloïde aiguë avec anomalies génétiques récurrentes</b>
Leucémie promyélocytaire aiguë avec fusion <i>PML::RARA</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec fusion <i>RUNX1::RUNX1T1</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec fusion <i>CBFB::MYH11</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec fusion <i>DEK::NUP214</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec fusion <i>RBM15::MRTFA</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec fusion <i>BCR::ABL1</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec réarrangement de <i>KMT2A</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec réarrangement de <i>MECOM</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec réarrangement de <i>NUP98</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec mutation <i>NPM1</i>
Leucémie myéloïde aiguë avec mutation <i>CEBPA</i>
Leucémie myéloïde aiguë, liée à la myélodysplasie
Leucémie myéloïde aiguë avec autres altérations génétiques définies
<b>Leucémie myéloïde aiguë, définie par la différenciation cellulaire</b>
Leucémie myéloïde aiguë avec différenciation minimale
Leucémie myéloïde aiguë sans maturation
Leucémie myéloïde aiguë avec maturation
Leucémie basophile aiguë
Leucémie myélomonocytaire aiguë
Leucémie monocytaire aiguë
Leucémie érythroïde aiguë
Leucémie aiguë mégacaryoblastique
<b>Leucémie myéloïde aiguë liée au traitement</b>
<b>Sarcome myéloïde</b>

- **Classification ICC 2022**

A l'inverse de la classification OMS 2022 qui se base essentiellement sur les anomalies génétiques récurrentes pour classer les LAM, la classification consensuelle internationale (ICC) des tumeurs myéloïdes et des leucémies aiguës apparue en 2022 intègre les données morphologiques, cliniques et génomiques pour classer les LAM. L'ICC vise à faciliter le diagnostic et le pronostic des LAM mais aussi à améliorer la stratégie thérapeutique et à permettre la conception d'essais cliniques innovants (7).

Devant l'existence de discordances entre la classification de l'OMS 2022 et l'ICC 2022 pour le diagnostic d'une LAM, un groupe d'experts internationaux propose en 2023 une feuille de route permettant d'harmoniser les deux systèmes de classification (42) (Annexe 1).

### **I.3.5. Facteurs pronostiques**

L'âge, la biologie moléculaire et la cytogénétique au moment du diagnostic sont des facteurs pronostiques les plus importants pour les patients atteints de LAM (43).

L'âge avancé et la présence de comorbidités, souvent résumés par l'indice de performance status (PS), affectent la capacité d'un patient à survivre aux effets secondaires d'une chimiothérapie intensive (36). En effet, le pronostic et les taux de survie à long terme des patients adultes jeunes (<65 ans) se sont progressivement améliorés avec le temps, en grande partie grâce à l'amélioration des soins de soutien et à l'utilisation accrue de l'allogreffe de cellules hématopoïétiques (alloHCT).

La cytogénétique et la biologie moléculaires ont permis de classer les sous-types de LAM en 3 groupes pronostiques d'après les dernières recommandations de l'ELN : favorable, intermédiaire et défavorable (8) (Tableau 4).

Tableau 4 : Stratification du risque selon les recommandations ELN 2022 (8)

Risque	Anomalies cytogénétiques et moléculaires
<b>Favorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(8;21)(q22;q22.1) / <i>RUNX1::RUNX1T1</i></li> <li>inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1;q22)/<i>CBFB::MYH11</i></li> <li>Mutation <i>NPM1</i> sans <i>FLT3-ITD</i></li> <li>Mutation bi-allélique <i>CEBPA</i></li> </ul>
<b>Intermédiaire</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Mutation <i>NPM1</i> avec <i>FLT3-ITD</i></li> <li>Statut sauvage <i>NPM1</i> avec <i>FLT3-ITD</i> (sans anomalie génétique de risque défavorable)</li> <li>t(9;11)(p21.3;q23.3); <i>MLLT3::KMT2A</i></li> <li>Anomalies cytogénétiques ou moléculaire non classifiées comme favorable ou défavorable</li> </ul>
<b>Défavorable</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>t(6;9) (p23;q34.1) / <i>DEK::NUP214</i></li> <li>t(v;11q23.3) / <i>KMT2A</i> réarrangé</li> <li>t(9;22)(q34.1;q11.2) / <i>BCR::ABL1</i></li> <li>t(8;16)(p11.2;p13.3)/<i>KAT6A::CREBBP</i></li> <li>inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2)/<i>GATA2,MECOM(EVI1)</i></li> <li>t(3q26.2;v)/<i>MECOM(EVI1)</i> réarrangé</li> <li>-5 ou del(5q) ; -7; -17/abn(17p)</li> <li>Caryotype complexe ; Caryotype monosomal</li> <li>Mutation <i>ASXL1, BCOR, EZH2, RUNX1, SF3B1, SRSF2, STAG2, U2AF1, et/ou ZRSR2</i></li> <li>Mutation <i>TP53</i></li> </ul>

Les patients avec un risque favorable ont des résultats relativement bons avec des schémas de consolidation basés sur la chimiothérapie, tandis que les patients présentant un profil de risque défavorable (caryotype monosomique, complexes, ...) nécessitent une allogreffe lors de la première rémission cytologique pour améliorer leur pronostic (44,45). Cependant, la majorité des patients atteints de LAM présentent un risque cytogénétique intermédiaire et ont le plus souvent un caryotype normal. Certains de ces patients ont une évolution favorable après la consolidation mais d'autres ont un très mauvais pronostic (24).

### I.3.6. Prise en charge thérapeutique des LAM

Le traitement de la LAM consiste à la mise en place d'une chimiothérapie (induction, consolidation +/- entretien) chez les patients jeunes (< 65 ans) avec ou sans allogreffe de CSH. Chez les patients âgés (> 65 ans) ou médicalement fragiles, des thérapies moins intensives sont utilisées. Certains peuvent recevoir du vénétoclax (inhibiteur de BCL-2) ou du glasdegib (inhibiteur de la protéine transmembranaire Smoothened : SMO) en association à de faibles doses de cytarabine, d'azacitidine ou de décitabine. Les taux de rémission complète chez les patients atteints de LAM de novo traités par vénétoclax en association avec une faible

dose de cytarabine ou un agent hypométylant (azacitidine ou décitabine) ont été de 54% et 73 % respectivement (46,47).

Dans certains cas, une cytoréduction immédiate par hydroxyurée (Hydrea®) est recommandée en présence d'hyperleucocytose. Des soins de support permettant d'optimiser la qualité de vie et de réduire l'incidence des complications liées à la cytopénie comme la transfusion peuvent être utilisés.

### **I.3.6.1. Chimiothérapie**

L'objectif de la chimiothérapie est d'éradiquer la maladie. Elle peut se dérouler en plusieurs étapes : l'induction, la consolidation et l'entretien. Le traitement d'induction permet d'obtenir une rémission complète (RC). La consolidation et l'entretien surviendront par la suite pour maintenir la rémission et maximiser la durée de la réponse aux traitements.

La RC est définie par l'ELN selon les critères suivants :

- Blastose médullaire < 5%
- Absence de blastes circulants et absence de corps d'Auer
- Pas de localisation extramédullaire de la maladie
- Polynucléaires neutrophiles (PNN) > 1 G/L (1 000/μL)
- Numération plaquettaire > 100 G/L

L'obtention de la rémission complète avec la chimiothérapie est un point clé pour la survie sans rechute dans la LAM. Cependant, il est de plus en plus clair que la rémission cytologique n'est pas une méthode sensible pour mesurer la profondeur de la réponse au traitement (19).

#### **• Induction**

Le traitement d'induction classique (connu sous le nom de « 7+3 ») associe les anthracyclines en intraveineuse (IV) (daunorubicine ou idarubicine) pendant 3 jours et la cytarabine en IV continue pendant 7 jours. D'autres classes thérapeutiques (comme le gemtuzumab ozogamicin ou une association liposomale de daunorubicine et de cytarabine) peuvent être utilisées avec ou à la place de la chimiothérapie classique « 7+3 » (8). Les anthracyclines interagissent avec l'ADN en s'intercalant entre deux bases adjacentes, elles interagissent également avec la topo-isomérase II et ont un effet inhibiteur sur la synthèse des acides nucléiques. La cytarabine aussi appelée ARA-C ou cytosine arabinoside) est un analogue de la cytosine qui bloque la réplication de l'ADN. Ce traitement d'induction entraîne généralement une aplasie profonde avec des risques d'infections et d'hémorragies d'où la nécessité des soins de supports.

L'ajout de midostaurine, un inhibiteur de kinase à la chimiothérapie standard a prolongé de manière significative la survie globale chez les patients atteints de LAM mutées *FLT3*, âgés de 18 à 59 ans (48).

#### **• Consolidation**

Après l'obtention de la rémission complète, un traitement de consolidation par cytarabine à fortes ou moyennes doses peut prolonger la durée de la rémission complète. L'allogreffe de CSH peut être également utilisée en traitement de consolidation. Cependant la toxicité de l'allogreffe doit faire discuter de son avantage, surtout chez les patients jeunes avec un risque

intermédiaire et les patients âgés présentant des comorbidités chez qui une chimiothérapie serait plus convenable.

- **Entretien**

L'objectif principal du traitement d'entretien est d'administrer un traitement peu toxique capable de réduire le risque de rechute leucémique. L'administration de l'azacitidine par voie orale comme traitement continu de post-rémission dans un essai randomisé a été associée à une survie globale et à une survie sans rechute significativement plus longues que le placebo chez les patients de plus de 55 ans en première rémission complète et qui n'étaient pas candidats à l'allogreffe de CSH (49). L'étude de Sun et al., en 2023 confirme cette essai randomisé avec l'administration de venetoclax/azacitidine (9).

### **I.3.6.2. Allogreffe de cellules souches hématopoïétiques**

L'allogreffe de CSH est une thérapie complexe qui utilise des CSH sélectionnées chez un donneur sain afin de restaurer chez le patient malade l'hématopoïèse normale. Elle permet également de lutter efficacement et durablement contre un envahissement médullaire de la moelle osseuse du donneur par les cellules cancéreuses du receveur afin de maintenir le plus longtemps possible cette hématopoïèse normale après rémission complète. Ceci est possible grâce aux traitements effectués en amont comme le conditionnement alliant chimiothérapie et immunosuppresseurs et qui consiste à irradier complètement la moelle osseuse envahie par les cellules cancéreuses.

Parmi toutes les hémopathies, la LAM est celle dans laquelle l'allogreffe est la plus fréquemment réalisée (50). En effet, malgré l'obtention d'une rémission complète dans la leucémie aiguë myéloïde non promyélocytaire après traitement de première ligne par chimiothérapie, le taux de rechute reste élevé. Pour ces patients, la décision d'effectuer une allogreffe après la première rémission dépend du rapport bénéfice-risque basé sur les caractéristiques cytogénétiques et moléculaires (risque défavorable +/- intermédiaire) de la maladie, de la présentation et de la réponse au traitement initial, ainsi que des facteurs dépendants du patient (âge), du donneur et du greffon.

L'allogreffe est la seule thérapie curative pour les patients atteints d'une maladie réfractaire primaire et offre les meilleures chances de guérison chez ceux qui rechutent après une chimiothérapie initiale (51). Malgré son rôle crucial dans la prise en charge de la LAM de l'adulte, seule une minorité de patients pour lesquels une transplantation est indiquée subissent l'allogreffe de CSH. La toxicité liée à la greffe doit faire discuter de son avantage selon le profil du patient en particulier chez les adultes jeunes à risque intermédiaire et les adultes de plus de 65 ans ayant des comorbidités.

Les CSH administrées vont s'installer progressivement dans la moelle du receveur et la prise de greffe est définie par la restauration de l'hématopoïèse avec apparition de cellules matures circulantes. Le chimérisme, c'est-à-dire l'étude de la proportion de cellules du donneur par rapport aux cellules du receveur est réalisée dans le bilan de suivi d'une allogreffe.

Dans plusieurs études, le bénéfice de l'allogreffe de cellules souches hématopoïétiques a été démontré chez les patients LAM présentant une cytogénétique à risque intermédiaire et un caryotype normal avec des anomalies récurrentes à risque défavorable, y compris la plupart des LAM mutées *FLT3-ITD* (8,9,52).

### I.3.7. Evaluation de la réponse au traitement : Maladie résiduelle (MRD)

La maladie résiduelle est définie par la persistance d'un petit nombre de cellules leucémiques (clone leucémique) résiduelles indétectables par les techniques morphologiques (numération-formule sanguine ou myélogramme), résistantes à la chimiothérapie, et qui sont le plus souvent responsables de la rechute (53).

Au diagnostic de LA, on considère en général que le nombre de cellules tumorales est de l'ordre de  $10^{12}$  cellules. Après chimiothérapie, ce nombre peut passer en dessous de  $10^{10}$  (seuil de détection des cellules leucémiques par l'examen cytologique du sang et de la moelle osseuse). Le patient est alors considéré en rémission hématologique complète (ou rémission complète, RC). Ceci ne signifie pas pour autant que les cellules tumorales aient totalement disparu de l'organisme mais qu'elles sont présentes à des taux inférieurs aux limites de détection des techniques cytologiques (54). De plus ces techniques ne permettent pas d'apprécier efficacement la richesse de la moelle osseuse et ne permettent pas non plus de savoir si les blastes observés sont des blastes de régénération ou des blastes leucémiques pouvant être responsables d'une rechute (55). Devant cette faible sensibilité des techniques cytologiques, la MRD est un outil de choix permettant l'évaluation précise, sensible et objective de la réponse thérapeutique pouvant être détectée par des techniques de cytométrie en flux ou de biologie moléculaire.

L'évaluation de la MRD dans la LAM est utile pour :

- Evaluer la profondeur de la rémission avec des techniques de sensibilité supérieure à la cytologie (CMF ou biologie moléculaire) (56)
- Mieux évaluer le risque de rechute après la rémission complète et adapter la suite du traitement, notamment proposer ou pas une allogreffe de CSH
- Détecter une rechute précoce (rechute hématologique) avant qu'elle ne se manifeste cliniquement et orienter de manière précoce le patient vers une intensification thérapeutique afin d'adapter rapidement la stratégie thérapeutique (57)
- Enfin, récemment la MRD a été utilisée pour accélérer l'évaluation et l'approbation des médicaments, en tant que marqueur : Si un médicament réduit efficacement la MRD, cela est un bon indicateur d'efficacité, permettant ainsi d'accélérer son approbation pour un usage plus large.

La positivité de la MRD est associée à une rechute de la maladie. Cependant, une évolution clonale, des changements d'immunophénotype (switchs immunophénotypiques) ou l'apparition de leucémies secondaires peuvent survenir au cours du suivi et peuvent échapper à la détection de la MRD (58). Plusieurs techniques avec des seuils de sensibilité (seuils de sensibilité allant de  $10^{-2}$  jusqu'à  $10^{-6}$ ) différents peuvent être utilisées (Figure 10).

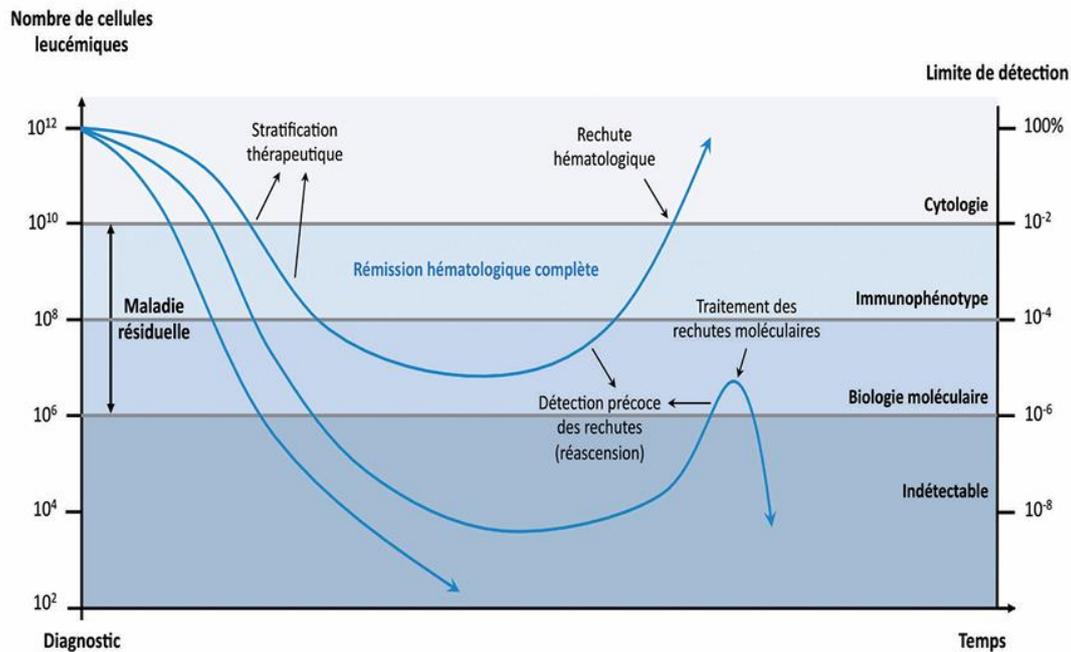


Figure 10 : Les seuils de sensibilité des techniques de maladie résiduelle dans les LAM, d'après N.Duployez et C. Preudhomme (55)

Les critères majeurs pour choisir le(s) marqueur(s) de suivi de la maladie résiduelle sont :

- un marqueur avec la plus grande sensibilité possible ;
- un marqueur spécifique de la maladie ;
- un marqueur stable entre le diagnostic et la rechute ;
- un marqueur applicable à un grand nombre de patients ;
- une technique facilement réalisable en routine hospitalière ;
- une technique ayant un coût acceptable.

En tenant compte de ces critères, les marqueurs disponibles actuellement pour la MRD dans les LAM sont :

- Les transcrits de fusion et les mutations de *NPM1*, qui représentent 40 à 70 % des patients en fonction de l'âge
- Les marqueurs aberrants (LAIP, pour leukemia aberrant immunophenotype) ou de cellules souches leucémiques (CSL) quantifiés par cytométrie en flux,
- La quantification de *WT1* et de certaines mutations (53). L'hyperexpression de *WT1* n'est pas très préconisée comme marqueurs de la MRD car elle présente une faible spécificité (retrouvée à un taux basal dans le sang et la moelle) et sensibilité (10<sup>-3</sup>).

### I.3.7.1. Les techniques d'évaluation de la maladie résiduelle

Actuellement, les deux méthodes les plus largement étudiées pour évaluer la MRD dans la LAM sont :

- La cytométrie en flux multiparamétrique (CMF)
- La biologie moléculaire, comprenant la RT-qPCR mais également de nouvelles technologies apparues ces dernières années comme le NGS et la PCR digitale (dPCR). Les nouvelles recommandations de l'ELN sur la MRD incluent donc les nouvelles techniques permettant de standardiser l'analyse par CMF ou biologie moléculaire (Tableau 5).

L'avantage principal de la CMF est son applicabilité dans près de 90% des LAM. Cependant sa sensibilité est inférieure à celle de la biologie moléculaire.

Tableau 5 : Méthodes d'évaluation de la maladie résiduelle selon les recommandations ELN 2022 (8)

Méthodes	Cibles	Sensibilité	Applicabilité dans la LAM (%)	Délai de réalisation (jours)	Limites
Cytométrie en flux (CMF)	Leukemia associated immunophénotype (LAIP) ou difference from national (DfN)	$10^{-3}$ à $10^{-4}$	85-90	2	Moins sensible
RT-qPCR	Données robustes : <i>NPM1</i> , <i>CBFB::MYH11</i> , <i>RUNX1::RUNX1T1</i> Moins validées : <i>KMT2A::MLLT3</i> , <i>WT1</i> , <i>DEK::NUP214</i> , <i>BCR::ABL1</i>	$10^{-4}$ à $10^{-5}$	40-50	3-5	Applicabilité limitée
NGS	Mutation somatique	$10^{-2}$ à $10^{-4}$	~100	5-10	Moins sensible, couteux et technique complexe
PCR digitale	Mutations ciblées spécifiques	$10^{-3}$ à $10^{-4}$	~70	3-5	Spécifique de la mutation ou du transcrit, sensibilité limitée

Attention, ce n'est pas seulement la technique qui détermine la sensibilité mais plutôt le marqueur et le nombre minimum de cellules ( $10^6$ ).

### I.3.7.1.1. Evaluation de la MRD par cytométrie en flux

L'évaluation de la MRD phénotypique des LAM repose sur deux stratégies :

- La stratégie LAIP/Dfn
- La stratégie LSC

La CMF présente un réel avantage pour le suivi des patients car elle est facile à mettre en place et sa sensibilité peut aller jusqu'à  $10^{-4}$ . L'ELN recommande la combinaison des deux approches pour quantifier la MRD (8,59).

- **Approches LAIP (Leukemia Associated Immunophenotype) ou Dfn (Different from normal)**

La stratégie LAIP repose sur la détection de marqueurs aberrants (par exemple CD7, CD56, CD19, CD200...) à la surface des blastes myéloïdes au diagnostic. Un profil LAIP est associé à toute ou une partie des cellules leucémiques (60,61). Afin de préciser la robustesse du LAIP identifié pour le suivi, il est important d'en évaluer la proportion au sein du bulk blastique leucémique au diagnostic, mais aussi de définir sa LOD (=limit of detection ou sensibilité) dans une « *merge* » de moelles normales. Un très bon LAIP sera absent voire très peu représenté (moins de 0,01 % des leucocytes totaux) dans les moelles d'individus sains.

La stratégie Dfn repose sur la détection d'un asynchronisme de maturation (expression simultanée pathologique de marqueurs physiologiquement présents à différents stades de maturation), d'une intensité d'expression anormale d'un ou plusieurs marqueur(s) (surexpression ou sous-expression) ou enfin d'un « trou » phénotypique (absence d'expression d'un marqueur physiologiquement exprimé) (58,62).

Ces 2 stratégies LAIP et Dfn permettent à la fois le suivi des clones du diagnostic et des clones émergents en utilisant les marqueurs MRD de base (Tableau 2).

- **LSC**

La stratégie LSC repose sur la détection des cellules les plus immatures (cellules souches) au sein du bulk blastique leucémique. Ces cellules peuvent être retrouvées en quantité très variable dans une hématopoïèse leucémique, et elles sont à l'origine de la leucémie. On parle de cellules initiatrices de la leucémie (LIC). Du fait de leur quiescence, elles sont inaccessibles au traitement par chimiothérapie et sont à l'origine de rechute des LAM.

Actuellement, de nombreuses études révèlent l'importance d'estimer la quantification des LSC au diagnostic à des fins pronostiques (63,64).

Le compartiment des cellules souches se définit phénotypiquement par la fraction CD34+CD38- présente au sein du bulk blastique leucémique. Les cellules souches leucémiques (CSL) diffèrent des cellules souches hématopoïétiques normales (CSH) par l'expression d'un marqueur aberrant non présent sur les CSH normales (exemple : CD45RA et/ou CLL-1 [CLEC12A] et/ou CD123 [IL3RA] et/ou TIM3 et/ou CD97 et/ou CD33 et/ou CD7 et/ou CD56 et/ou CD19 et/ou CD200) (65).

### I.3.7.1.2. Evaluation de la MRD par biologie moléculaire

- **qPCR / RT-qPCR**

La PCR quantitative en temps réel (qPCR) associe à la PCR « traditionnelle » en point final une technologie de détection par fluorescence des molécules néo-synthétisées, ou amplicons, à chaque cycle d'amplification de la PCR. La mesure de la fluorescence au cours de la phase exponentielle précoce de la PCR permet d'évaluer le nombre d'amplicons synthétisés au cours de la réaction, qui sont directement proportionnels à la quantité de molécules de matrice initiale. Lorsque la réaction de qPCR est réalisée à partir de cDNA obtenu par une réaction de transcription inverse, on parle de RT-qPCR, qui permet de quantifier les molécules de transcrits d'un gène et donc d'évaluer le taux d'expression génique (66).

Lorsqu'une séquence d'ADN génomique ou de transcrit spécifique des cellules leucémiques, ou cible moléculaire, peut être caractérisée, la qPCR ou la RT-qPCR représente le « gold standard » pour le suivi de la maladie résiduelle, avec une sensibilité allant de  $10^{-4}$  à  $10^{-6}$ . Dans le cas de la RT-qPCR, il s'agit d'une méthode de quantification relative car le taux de transcrit cible doit être rapporté au taux d'un gène de référence dont l'expression est relativement constante et stable dans toutes les cellules (i.e. « gène de ménage »).

Deux systèmes de fluorescence sont couramment utilisés : le SYBR Green qui est un fluorochrome qui se lie de façon non spécifique à l'ADN, et les sondes Taqman qui sont des sondes complémentaires de la séquence de l'amplicon, couplées à un fluorochrome.

Malgré sa sensibilité élevée, l'application de cette méthodologie est limitée par la nécessité de réaliser une courbe d'étalonnage pour avoir une quantification fiable, ce qui nécessite d'avoir des témoins positifs tels que des plasmides.

Les cibles moléculaires couramment utilisées pour le suivi de la MRD par RT-qPCR comprennent les transcrits *NPM1*, les transcrits de fusion *CBFB::MYH11*, *RUNX1::RUNX1T1*, *KMT2A::MLLT3*, *DEK::NUP214* et *BCR::ABL1*, ainsi que le transcrit *WT1* (59).

- **PCR digitale**

#### Principe

Le concept de PCR digitale a été décrit pour la première fois en 1992 par *Sykes et al.*, qui ont reconnu que la combinaison de la dilution limitative, de la PCR en point final et des statistiques de la loi de Poisson pouvait permettre une mesure absolue de la concentration en acides nucléiques (67). Par la suite, *Vogelstein et Kinzler* ont mis au point une méthode selon laquelle un échantillon est dilué et partitionné de sorte que les molécules cibles puissent être amplifiées individuellement, chacune dans une partition distincte, et que les produits soient détectés à l'aide de sondes fluorescentes (68).

La PCR digitale est une technologie avancée qui a été développée pour fournir une quantification absolue de haute sensibilité des séquences cibles d'ADN avec de nombreuses applications pour la recherche et le diagnostic clinique. Elle est particulièrement utile pour les échantillons à faible quantité d'ADN/ADNc, et pour la détection de mutations de faible fréquence allélique qui ne peuvent pas être détectées avec le séquençage Sanger. Le principe de cette technique est basé sur le partitionnement de l'ADN initial en milliers de gouttelettes « eau-huile » d'un volume de l'ordre du nanolitre, chacune contenant zéro ou quelques copies d'ADN/ADNc, qui seront amplifiées individuellement, permettant ainsi d'augmenter la concentration de l'ADN cible (Figure 11). La fraction de gouttelettes positives pour la PCR est ensuite déterminée à l'aide d'un cytomètre de flux et la quantification absolue de l'ADN cible

dans l'échantillon (nombre absolu de copies de départ en unités de copies/ $\mu$ l d'échantillon initial) est estimée par modélisation sous la forme d'une distribution de la loi de Poisson (Figure12).

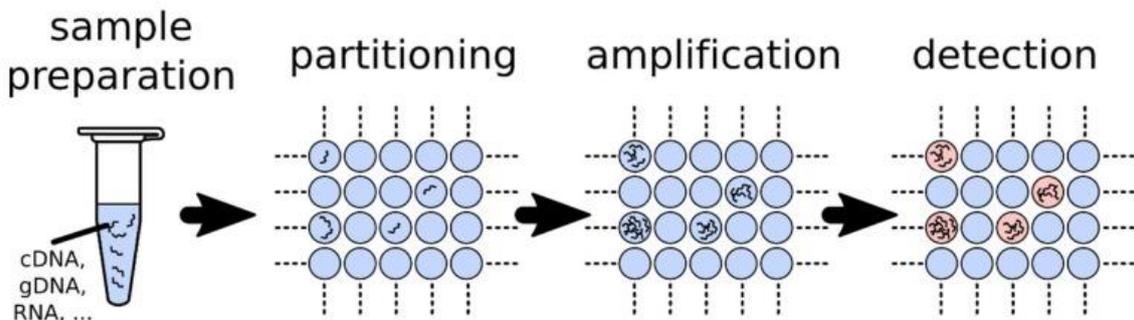


Figure 11 : Principe de la PCR digitale (69)

Cette technique est spécifique et sa sensibilité peut aller jusqu'à  $10^{-6}$ . Compte tenu de la diversité des mutations somatiques et des aberrations chromosomiques dans la pathogénèse des LAM, la ddPCR est un outil intéressant pour cibler les marqueurs de MRD de chaque patient.

### Loi de Poisson

Les gouttelettes générées lors de la ddPCR peuvent contenir 0, 1 ou plusieurs molécules d'ADN. Un simple dénombrement des gouttelettes positives conduirait à une sous-estimation du nombre de copies des transcrits. La loi poisson permet de corriger le fait qu'une gouttelette puisse contenir plusieurs copies d'ADN. Autrement dit, c'est la probabilité qu'une gouttelette contienne au moins une molécule d'ADN. La loi de Poisson dit que la probabilité qu'une gouttelette contienne **k** molécules est donnée par :

$$P(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

Où :

- $P(k)$  : est la probabilité d'observer exactement **k** molécules dans une gouttelette
- $\lambda$  : est le nombre moyen d'événements (moyenne des molécules d'ADN par gouttelettes).
- $k!$  : est la factorielle de **k**

Dans l'annexe 2, cette formule a été utilisé pour calculer le nombre de copies d'*ABL1* et de *NUP98::NSD1* dans un échantillon de notre étude (échantillon sanguin au diagnostic du patient 5).

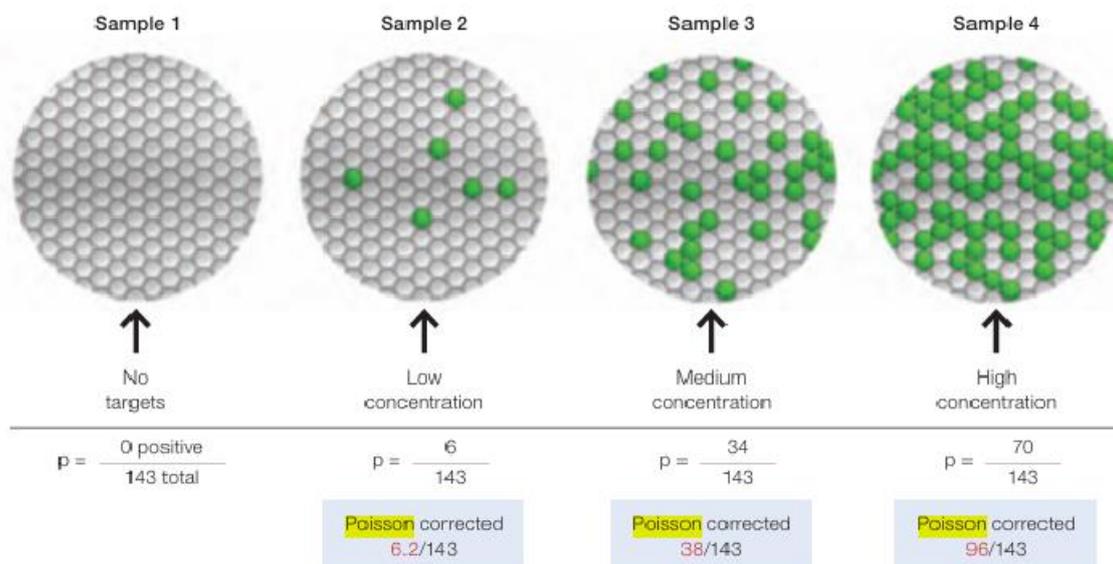


Figure 12 : Estimation du nombre de copies d'ADNc dans un échantillon selon la loi poisson.  
*Extrait du manuel de Biorad*

Pour un fractionnement en 143 gouttelettes, si 70 sont positives, la loi de Poisson estime le nombre de copies présentes à 96.

- **NGS**

Bien que le NGS soit couramment utilisé pour la détection d'anomalies moléculaires au diagnostic, il reste très peu utilisé à ce jour pour le suivi de la maladie résiduelle (MRD) à cause des erreurs de séquençage (générant des artefacts), de la complexité de la préparation des bibliothèques et de l'analyse bio-informatique des résultats.

#### I.4. LAM avec réarrangement de *NUP98*

Des réarrangements chromosomiques impliquant le gène *NUP98* ont été observés dans les LAM ainsi que dans d'autres hémopathies malignes comme la leucémie myéloïde chronique (LMC) en phase blastique, le syndrome myélodysplasique (SMD), la leucémie myélomonocytaire juvénile (JMML), la leucémie aiguë lymphoblastique (LAL) et la leucémie biphénotypique (BAL) (10,70).

Les réarrangements de *NUP98* caractérisent un sous-type distinct de LAM dans la nouvelle classification de l'OMS 2022, associé à un pronostic intermédiaire selon l'ELN 2022 (6,8). Ces anomalies génétiques sont souvent cryptiques au caryotype conventionnel mais elles peuvent être détectées par FISH, OGM, RT-MLPA ou RNA-seq.

##### I.4.1. Rôle physiologique de *NUP98*

*NUP98* est un gène situé sur le bras court du chromosome 11 (11p15.4) et code pour une nucléoporine de poids moléculaire 98kDa. Cette protéine fait partie du complexe du pore nucléaire (NPC) qui facilite le transport nucléocytoplasmique des ions, des ARNm et des protéines (Figure 13) (71). Le NPC est composé d'une trentaine de protéines différentes dont certaines sont présentes en plusieurs exemplaires (72). *NUP98* est localisé à l'interface nucléocytoplasmique au cœur du NPC et est impliqué dans la transcription des gènes, le cycle cellulaire, la progression et la formation du fuseau mitotique (70,73).

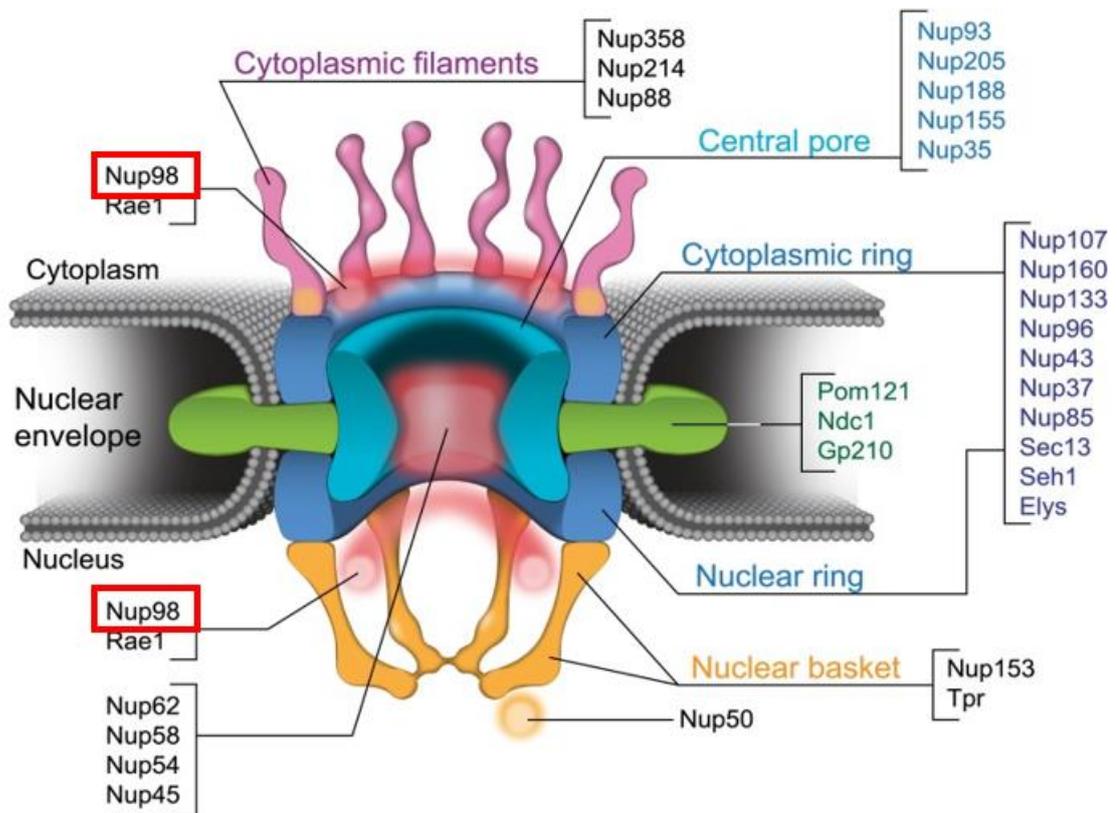


Figure 13 : Structure du complexe formant le pore nucléaire avec localisation nucléocytoplasmique de la protéine NUP98. Adapté de Ibarra et Hetzer (72)

Un tiers des nucléoporines ont des séquences répétées de phénylalanine-glycine [FG], mais *NUP98* a une signature de répétition FG unique Gly-Leu-Phe-Gly (GLFG). Du côté N-terminal de la protéine, se trouvent des groupements de répétitions GLFG (enchaînement d'acides aminés hydrophobes dont la Phénylalanine (F) et la Glycine(G)) séparés par un domaine GBD (GLEBS binding domain) et au niveau C-terminal un domaine de liaison à l'ARN. Les domaines GLFG (ou FG repeat) interagissent avec les histones désacétylases (HDAC) et les co-activateurs transcriptionnels CBP/p300 indiquant l'implication de *NUP98* dans la régulation transcriptionnelle. Il se lie aux membres de la famille IMPORTIN-B pour l'importation nucléaire, et à CRM1/XPO1 pour l'exportation nucléaire de protéines. Le domaine GLEBS se lie au facteur RAE1 pour permettre le transport nucléaire des ARNm (Figure 14) (71).

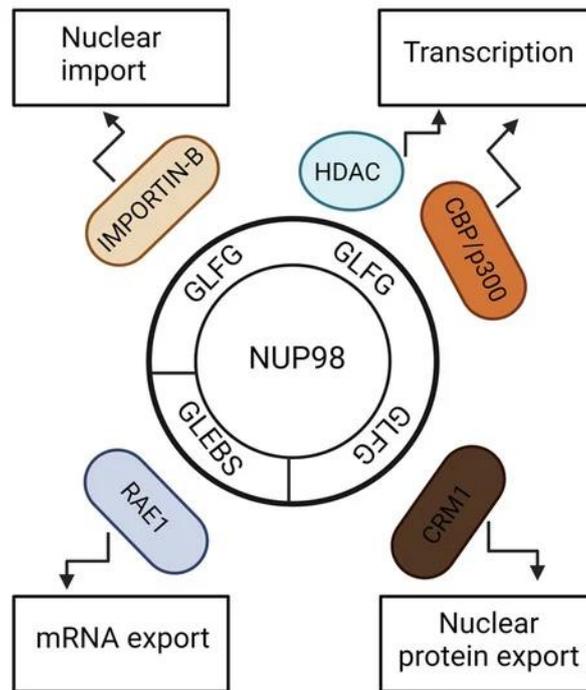


Figure 14 : Rôle des domaines constituant le gène *NUP98* créée sur *BioRender.com* par *Mohanty Sagarajit* (71)

#### I.4.2. Partenaires de fusion de NUP98

A ce jour, plus de 30 partenaires de *NUP98* ont été recensés (10). Environ 50% des gènes partenaires de *NUP98* codent pour des protéines homéobox (exemple : HOXA7, A9, A11, HOXD11, D13). La plupart des autres codent pour des protéines impliquées dans la liaison ou la modification des histones, comme les protéines du domaine SET (Tableau 6).

Tableau 6 : Différents partenaires de fusion de *NUP98* dans la LAM, les sous-types de LAM associés selon la classification FAB

Partenaires de fusion	Fonction	Sous-type de LAM	Réarrangement chromosomique
<i>HOXA9</i>	Facteur de transcription	M2, M4	t(7;11)(p15;p.15)
<i>HOXA11</i>	Facteur de transcription	M2	t(7;11)(p15;p.15)
<i>HOXA13</i>	Facteur de transcription	M2	t(7;11)(p15;p.15)
<i>HOXC11</i>	Facteur de transcription	M1, M2, M5	t(11;12)(p15;q13)
<i>HOXC13</i>	Facteur de transcription	M2, M4	t(11;12)(p15;q13)
<i>HOXD11</i>	Facteur de transcription	M4	t(2;11)(q31;p.15)
<i>HOXD13</i>	Facteur de transcription	t-AML, M4	t(2 ;11)(q31;p.15)
<i>PMX1</i>	Facteur de transcription	M2	t(1;11)(q23;p.15)
<i>PMX2</i>	Facteur de transcription	LAMt*-LAM	t(9;11)(q34;p.15)
<i>HHEX</i>	Facteur de transcription	M1, M2	t(10;11)(q23;p.15)
<i>RARA</i>	Facteur de transcription	M3 ou APL	t(11;17)
<i>RARG</i>	Facteur de transcription	M3 ou APL	t(11;12)(p15;q13)
<i>POU1F1</i>	Facteur de transcription	LAMt-LAM	t(3;11)(p11;p.15)
<i>LEDGF/PSIP1</i>	Coactivateur de transcription	M1, M2	t(9;11)(p22;p.15)
<i>PHF23</i>	Modificateur épigénétique	M0, M1, M4, M5	t(11;17)(p15;p.13)
<i>JADE2/PHF15</i>	Modificateur épigénétique	M3 ou APL	t(5;11)(q31;p.15)
<i>JARID1A/KDM5A</i>	Modificateur épigénétique	M0-M7	t(11;15)(p15;q35)
<b><i>NSD1</i></b>	<b>Modificateur épigénétique</b>	<b>M1, M2, M4, M5, M6</b>	<b>t(5;11)(q35;p.15.5)</b>
<i>NSD3</i>	Modificateur épigénétique	M1	t(8;11)(p11.2;p.15)
<i>MLL/KMT2A</i>	Modificateur épigénétique	M1, M2	inv(11)(p15q23)
<i>C6orf80/CCDC28A</i>	Inconnu	M7	t(6;11)(q24.1;p.15.5)

<i>HMGB3</i>	Protéine du groupe à haute mobilité (HMG)	LAMt	t(X;11)(q28;p.15)
<i>IQCG</i>	Signalisation calcique	Inconnu	t(3;11)(q29q13;p.15)
<i>RAP1GDS1</i>	Activité de la GTPase	Inconnu	Inconnu
<i>ADD3</i>	Protéine du cytosquelette	Inconnu	t(10;11)
<i>DDX10</i>	ARN hélicase	M6	inv(11)(p15q22)
<i>TOP1</i>	ADN topoisomérase	M4, M5	t(11;20)(p15;q11)
<i>TOP2B</i>	ADN topoisomérase	M5	t(3;11)(p24;p.15)
<i>ANKRD28</i>	Protéine de signalisation	Inconnu	t(3;5;11)(p25 ; q35 ; p. 15)
<i>LOC348801</i>	Inconnu	M2	t(3;11)(q12;p.15)

\*Leucémie myéloïde aiguë liée au traitement (LMA-t).

Les partenaires de fusion de *NUP98* peuvent être divisés en trois catégories :

- les facteurs de transcription qui peuvent modifier l'expression des gènes cibles par le biais de domaines de liaison à l'ADN. Cette catégorie comprend essentiellement des gènes homéobox, y compris les gènes *HOX* de « classe I » (*HOXA9*, *HOXA11*, *HOXA13*, *HOXC11*, *HOXC13*, *HOXD11* et *HOXD13*) et les gènes *HOX* de « classe II » (*PMX1*, *PMX2*, *HHEX1* et *POU1F1*) et les gènes non homéobox (*RARA* et *RARG*) (73).
- La deuxième catégorie de partenaires est celle des modificateurs épigénétiques qui modifient la chromatine pour modifier l'expression des gènes cibles.
- La troisième catégorie des partenaires de fusions *NUP98* regroupe des gènes ne modifiant pas l'épigénétique et qui ne se lient ni au domaine de liaison à l'ADN ni au domaine de remodelage de la chromatine. Dans cette catégorie, certains gènes partenaires ont des activités topoisomérases et ARN hélicase ou sont impliqués dans des activités de signalisation.

L'expression des transcrits de fusion conduit à la formation d'oncoprotéines dont la fonctionnalité dépend du partenaire de fusion de *NUP98*. Lors de la formation de la protéine de fusion, la partie N-terminale de *NUP98* qui contient des domaines GLFG et le motif GLEBS, est conservée. L'extrémité C-terminale de la protéine de fusion est apportée par le gène partenaire (70). L'analyse des points de cassure de *NUP98* par RNA-seq dans l'étude de *Bertrums et al.*, a révélé une grande diversité des jonctions d'exons de *NUP98* (Figure 15). Près de 85 % des fusions de *NUP98* avaient une jonction de point de cassure dans l'exon 12 ou 13, tandis que les autres ont des points de cassure très variables allant de l'exon 11 à l'exon 29 (74).

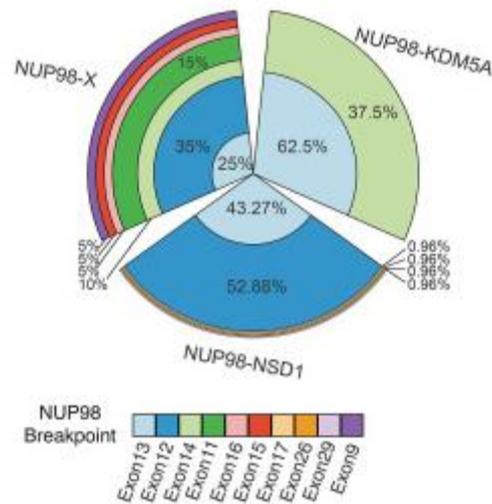


Figure 15 : Diagramme à barres illustrant la prévalence des jonctions d'exons *NUP98* dans la LAM avec réarrangement de *NUP98*, d'après *Bertrums et al.*(74)

Actuellement, il existe peu de données expliquant les mécanismes moléculaires à l'origine des translocations de *NUP98* chez les adultes. Les études existantes permettant de comprendre la signification clinique de ce réarrangement proviennent principalement de la population pédiatrique (74–76).

Bien que cela ne soit pas obligatoire, l'identification du partenaire de fusion est souhaitable car elle pourrait fournir des informations pronostiques et peut avoir un impact sur la surveillance de la maladie (6). Certains partenaires sont plus fréquemment associés à certaines hémopathies. C'est le cas des fusions *NUP98::NSD1* retrouvées principalement dans les LAM4/5.

### I.5. LAM avec fusion *NUP98::NSD1*

Parmi les réarrangements de *NUP98* dans la LAM, la fusion *NUP98::NSD1* est la plus fréquente et retrouvée principalement dans les LAM pédiatriques et de l'adulte jeune (77). Elle est plus fréquente dans les sous-types M4/M5. Elle est également associée à un pronostic défavorable et s'accompagne fréquemment de la mutation *FLT3-ITD* (10,77,78).

*NSD1* (nuclear receptor binding SET domain-containing protein 1) est situé sur le chromosome 5 (5q35) et code pour une lysine méthyltransférase se liant au récepteur nucléaire SET domain protein 1 (79). La protéine *NSD1* (Figure 16) se compose de plusieurs domaines fonctionnels parmi lesquels un domaine SET et quatre domaines PHD dans la partie C-terminale conservés lors de la fusion *NUP98::NSD1*.

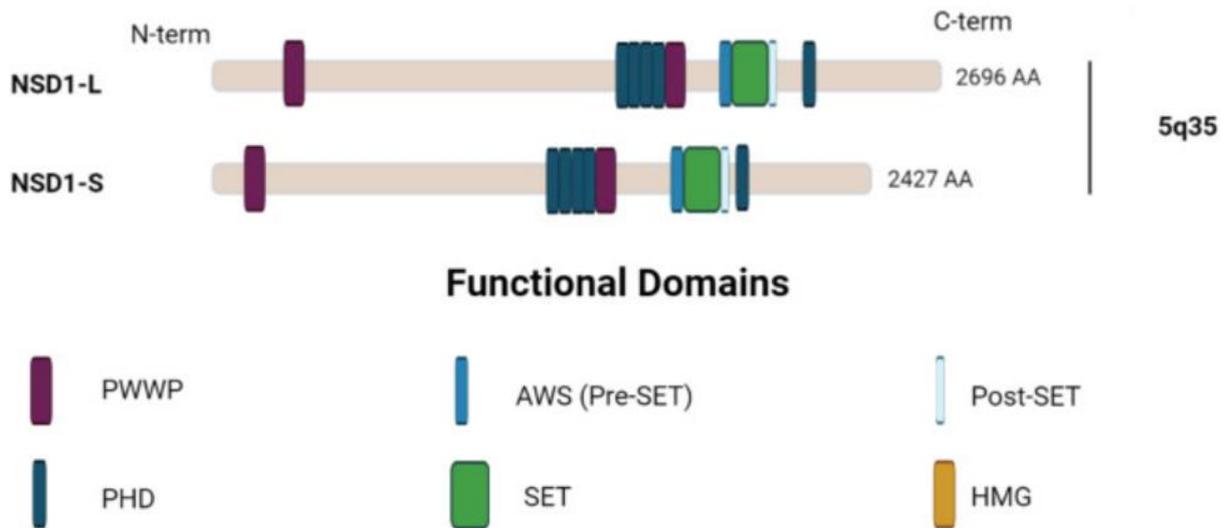


Figure 16 : Isoforme long (L) et court (S) de *NSD1* avec les domaines fonctionnels d'après Topchu et al. (80)

*PWWP* : proline-tryptophan-tryptophan-proline, *PHD* plant homeo domain, *SET* suppressor of variegation, enhancer of zeste, and trithorax, *HMG* high-mobility group

Le transcrit *NUP98::NSD1* résulte d'une translocation chromosomique t(5;11)(q35;p15.5) et code pour une protéine chimérique comprenant l'extrémité N-terminale de *NUP98* et l'extrémité C-terminale de la protéine *NSD1* avec des jonctions de fusions généralement situées dans les introns entre les exons 11-12, 12-13 ou 13-14 du gène *NUP98* (70,76). Ces deux gènes sont situés dans la région sub-télocérique des chromosomes 11 et 5 respectivement, ce qui ne permet pas de détecter cette translocation dite cryptique, au caryotype. Elle peut cependant être recherchée par FISH à l'aide de sondes spécifiques du locus *NUP98* ou *NSD1* (Figure 17).

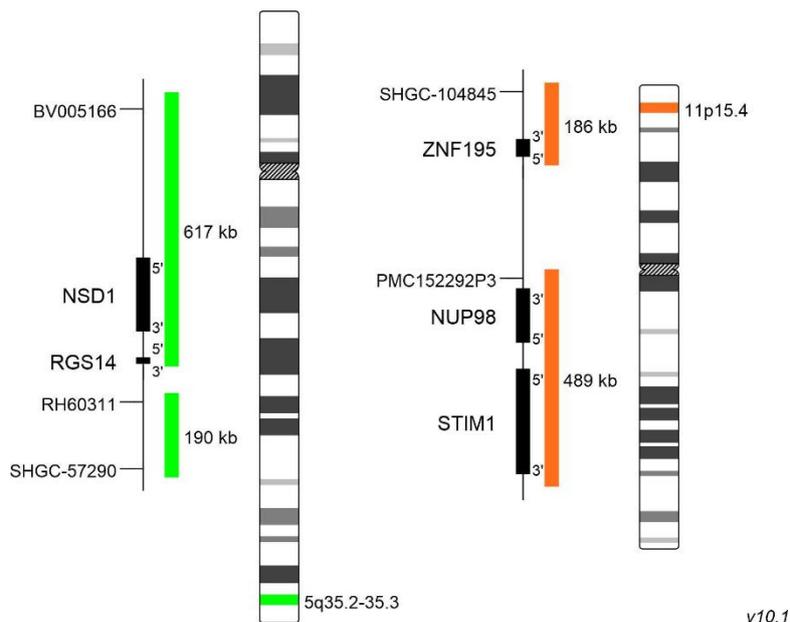


Figure 17 : Localisation de *NUP98* et de *NSD1* sur les chromosomes 11 et 5 respectivement avec les sondes utilisées en FISH. *Metasystems probes* (81)

La fréquence des transcrits *NUP98::NSD1* dans la LAM est faible par rapport aux autres anomalies récurrentes retrouvées dans la LAM. Ce transcrit est plus fréquemment retrouvé dans la population pédiatrique avec une prévalence globale de 16,1 contre 2,3 % dans la LAM chez l'adulte (10). Compte tenu de l'existence de plusieurs régions de jonctions sur le gène *NUP98*, nous pouvons retrouver différents variants du transcrit *NUP98::NSD1*. Deux transcrits de fusion *NUP98::NSD1* différents aboutissant à la formation de protéines de fusion fonctionnelles ont été décrit dans la LAM adulte : le variant 1 joignant l'exon 12 de *NUP98* à l'exon 6 de *NSD1* et le variant 2 joignant l'exon 11 de *NUP98* à l'exon 6 de *NSD1* (Figure 18) (82).

Cependant le variant majoritaire demeure le variant 1. C'est celui que nous analyserons dans cette étude.

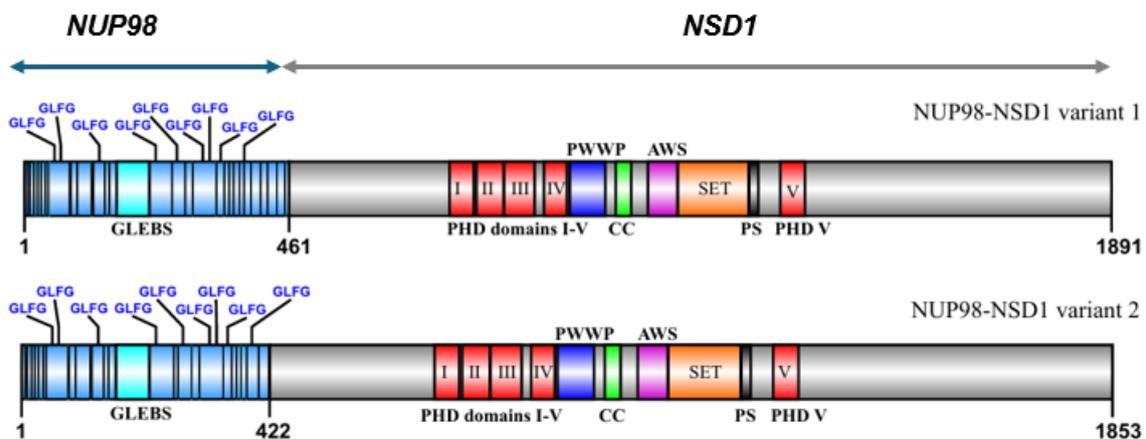


Figure 18 : Structure protéique des deux variants *NUP98::NSD1*, adapté de Kivioja (83)

*NUP98::NSD1* inhiberait la différenciation des précurseurs hématopoïétiques et augmenterait l'auto-renouvellement des cellules souches hématopoïétiques ou progénitrices, fournissant un mécanisme potentiel de transformation maligne (70).

L'étude de *Tian et al.*, décrit une large cohorte de patients adultes atteints de différentes hémopathies issues de l'hôpital Ruijin à Shanghai (Chine) dont 51 étaient des LAM avec réarrangement de *NUP98*. *NUP98::NSD1* était le transcrit le plus répandu et les patients présentaient une leucocytose au diagnostic supérieure à celle des autres patients avec le sous-type FAB M4/M5. Cette étude montre un taux de rémission complète très faible chez les patients *NUP98::NSD1* de 8,0 % contre 70,8% chez les patients *NUP98* avec un partenaire autre que *NSD1* (non *NUP98::NSD1*) (Figure 19) (84).

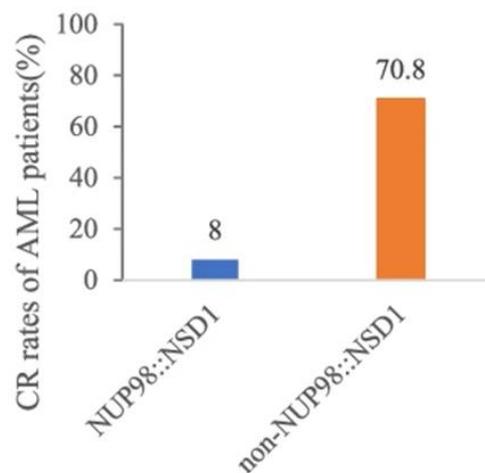


Figure 19 : Taux de rémission complète chez les patients *NUP98::NSD1* et *non-NUP98::NSD1* dans la LAM, d'après Tian et al. (84)

Dans cette même étude, la survie globale à 4 ans des patients ayant reçu une allogreffe de CSH était significativement meilleure que celle des patients n'ayant pas reçu d'allogreffe de CSH, que ce soit chez les patients *NUP98::NSD1* ou les patients *NUP98* avec un partenaire autre que *NSD1* (non *NUP98::NSD1*) (Figure 20).

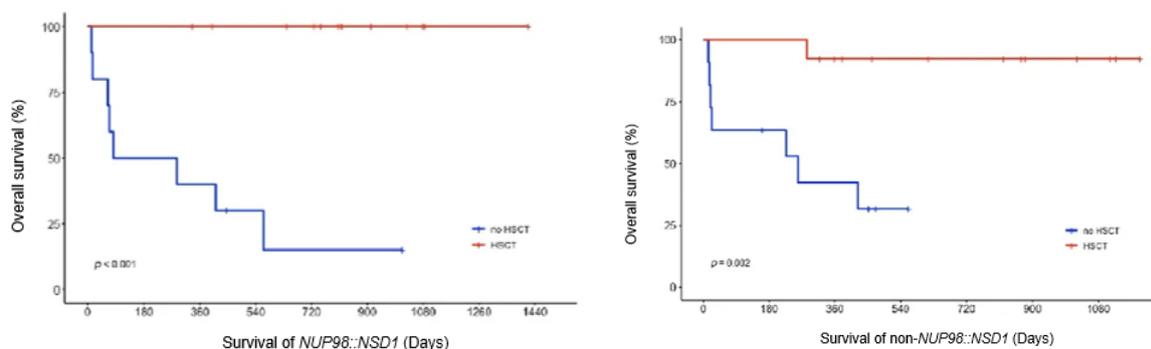


Figure 20 : Courbe de survie globale des patients *NUP98::NSD1* allogreffés et non *NUP98::NSD1* allogreffés, d'après Tian et al. (84)

Une allogreffe de CSH pourrait alors améliorer le pronostic défavorable de sous-type de LAM en améliorant la survie globale des patients.

*Hollink et al.*, mettent en évidence *NUP98::NSD1* comme marqueur indépendant de mauvais pronostic pour le risque de rechute, la survie globale (OS) et la survie sans rechute (EFS) dans la population adulte de 808 patients (de 15 à 77 ans) issue des cohortes belge et allemande (Figure 21).

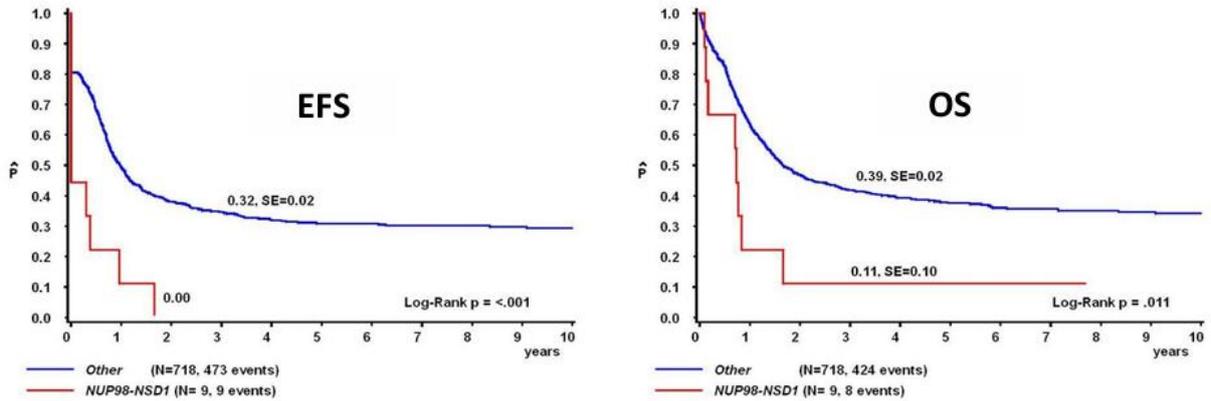


Figure 21 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) dans la cohorte adulte des patients *NUP98::NSD1*, d'après Hollink et al (10)

Dans l'étude de *Shina et al.*, en 2013, la survie globale (SG = OS) à 4 ans et la survie sans évènement (EFS) dans la population pédiatrique avec une LAM *NUP98::NSD1* par rapport à la population de référence n'ayant pas ce transcrit étaient 37,5 % contre 86,0 % et 37,5 % contre 72,0 % respectivement (85).

Les LAM avec *NUP98::NSD1* présentent fréquemment des mutations du gène *FLT3-ITD* et/ou de *WT1* qui sont également associées à un pronostic défavorable (Figure 22) avec un risque de rechute élevé (10,70,77).

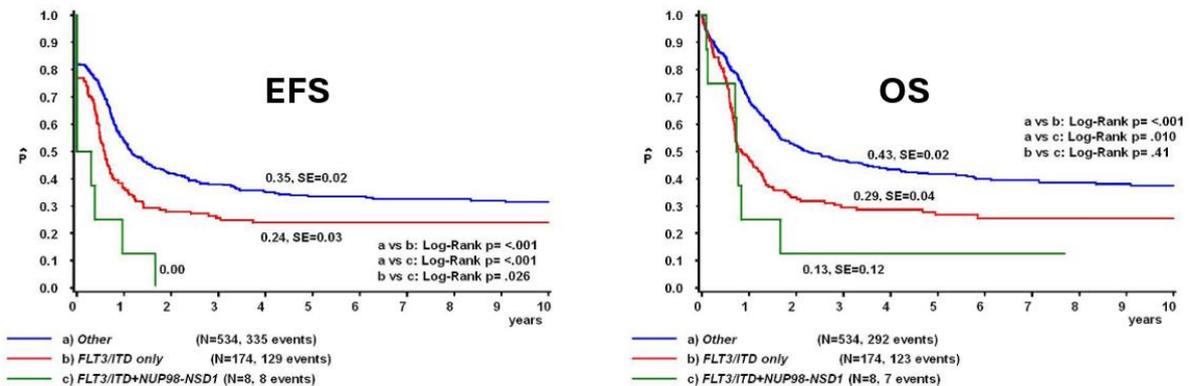


Figure 22 : Courbe de survie sans évènement (EFS) et survie globale (OS) dans la cohorte adulte des patients *NUP98::NSD1* associé ou non à la mutation *FLT3-ITD*, d'après Hollink et al. (10)

## II. Objectifs

---

Les réarrangements de *NUP98* représentent une nouvelle entité rare de LAM, plus fréquente chez l'enfant et l'adulte jeune, reconnue dans la dernière classification OMS 2022. Ils sont associés à un mauvais pronostic car les patients répondant à la chimiothérapie finissent par rechuter rapidement. Ces réarrangements sont souvent cryptiques au caryotype, mais la FISH *NUP98* n'est pas réalisée systématiquement dans les LAM de l'adulte.

Un précédent travail du laboratoire d'hématologie de Saint-Louis utilisant la technologie de cartographie optique du génome a permis de mettre en évidence un réarrangement *NUP98::NSD1* dans une petite série de patients avec LAM. Ceci a suscité l'intérêt de mettre en place une technique de quantification du transcrit *NUP98::NSD1* afin de réaliser le suivi de la maladie résiduelle de ces patients, jusque-là suivie uniquement par cytométrie en flux. La PCR digitale en gouttelette (ddPCR) a été choisie car elle permet de s'affranchir des gammes de calibration, des plasmides commerciaux et aussi parce que le laboratoire dispose du matériel nécessaire pour la réalisation de cette technique.

L'objectif principal de cette étude était donc de mettre au point et valider une méthode de ddPCR permettant la quantification du transcrit de fusion *NUP98::NSD1*. Pour cela, nous avons :

- 1) mis au point et validé un protocole de ddPCR sur ADNc en évaluant les paramètres analytiques de limite de détection, répétabilité et reproductibilité,
- 2) appliqué cette méthode à une série d'échantillons de diagnostic et de suivi de patients avec LAM présentant ce réarrangement, afin d'évaluer l'intérêt de cette méthode pour le suivi de la maladie résiduelle.

## III. Matériels et méthodes

---

### III.1. Patients

Une étude précédemment réalisée à Saint-Louis en 2022 dans le cadre du mémoire de DES du Dr Laureen CHAT (« **Intérêt de la cartographie optique du génome dans des leucémies aiguës myéloïdes non caractérisées** ») a permis de mettre en évidence des réarrangements *NUP98::NSD1* chez plusieurs patients avec une LAM. Dans cette étude, les données moléculaires et cytogénétiques d'une cohorte rétrospective de 1036 patients nouvellement diagnostiqués avec une LAM ou en rechute ont été collectées et utilisées pour classer les patients en fonction de leur anomalie génétique définissant la LAM. Afin de découvrir d'autres anomalies non détectées initialement par les analyses cytogénétiques et moléculaires chez des patients n'ayant aucune anomalie génétique déterminante identifiée, une analyse OGM chez 16 patients avec une LAM inclassable a été réalisée. Ceci a permis de détecter une fusion *NUP98::NSD1* chez 4 patients, soit 25% des LAM inclassables et 0,4% de la cohorte totale.

Pour la présente étude, un total de 9 patients atteints de LAM nouvellement diagnostiqués à l'hôpital Saint-Louis (Paris, France) de juillet 2016 à août 2024 remplissant les critères d'inclusion suivants ont été sélectionnés :

- 1- Présence d'un réarrangement *NUP98*, mis en évidence par cytogénétique (présence d'une translocation t(5;11) et/ou FISH *NUP98*), OGM ou RT-MLPA.
- 2- Disponibilité d'ADNc du diagnostic, afin de valider la détection du transcrite de fusion
- 3- Suivi moléculaire à l'hôpital Saint-Louis

### III.2. Méthodes

#### III.2.1. Isolements cellulaires

Les cellules mononuclées ont été isolées par Ficoll à partir du sang et de la moelle osseuse recueillis sur tube EDTA (Annexe 3).

#### III.2.2. Extraction d'ARN

##### III.2.2.1. Extraction manuelle par le TRIzol

Cette méthode d'extraction utilise le réactif de TRIzol® qui est une solution monophasique de phénol et d'isothiocyanate de guanidine. Ce réactif permet d'extraire les ARN totaux des cellules tout en maintenant leur intégrité pendant les phases d'homogénéisation et de lyse des cellules.

##### III.2.2.2. Extraction automatisée par le maxwell

La méthode d'extraction semi-automatisée par l'extracteur MAXWELL 16 (kit Maxwell 16 LEV simply RNA Cells, Promega, USA), utilise une cartouche de 8 puits dans lesquels sont successivement réalisés :

- Une capture d'ARN contenu dans l'échantillon, par des billes magnétiques recouvertes de silice,
- Un traitement à la DNase

- Des lavages de l'ARN par différents réactifs contenus dans différents puits de la cartouche
- L'élution de l'ARN. L'ARN récupéré dans la solution d'élution DNase/RNase free est de haute qualité et est stocké à -20°C à court terme ou à -80°C à long terme.

### III.2.3. Dosage et normalisation des ARN extraits

La technique utilisée est basée sur la spectrophotométrie (Nanodrop™). Tous les ARN ont été dosés afin de standardiser les concentrations. Les échantillons dont la concentration en ARN est supérieure à 100 ng/μL sont dilués avec de l'H<sub>2</sub>O RNase free afin de normaliser la concentration en ARN à 100 ng/μL pour une prise d'essai reproductible.

### III.2.4. Reverse transcription ou rétro-transcription (RT)

La reverse transcription permet de synthétiser un brin d'ADN complémentaire (ADNc) à la séquence d'ARN grâce à l'ADN polymérase ARN dépendante (aussi appelée rétro-transcriptase). Un mélange d'amorces aléatoires correspondant à des oligonucléotides complémentaires à la séquence d'ARN est utilisé.

L'ADNc obtenu est amplifié par PCR pour une utilisation et une analyse ultérieure en suivant les recommandations du fournisseur (Annexe 4).

### III.2.5. La PCR digitale (droplet digital PCR ou ddPCR)

#### III.2.5.1. Amorces et sondes

Pour la quantification du transcrite de fusion *NUP98::NSD1*, nous avons repris un système PCR déjà développé dans le laboratoire de Lille (données non publiées : Nicolas Duployez, Elise Fournier). C'est un système de PCR duplex dans lequel *NUP98::NSD1* est notre cible recherchée et *ABL1* est notre transcrite de référence (Tableau 7). Les résultats sont normalisés par rapport à la quantification du gène contrôle *ABL1* caractérisé par une expression élevée, ubiquitaire et stable quel que soit le statut de la maladie.

Pour ce système *NUP98::NSD1*, la température d'hybridation optimale est fixée à 58°C en suivant le protocole du CHU de Lille. Les sondes et les amorces ont été commandées auprès du fournisseur Eurogentech (Angers, France).

Tableau 7 : Séquences des amorces et sondes utilisées pour le système *NUP98::NSD1*

Système ddPCR <i>NUP98::NSD1</i>		Séquences
<i>NUP98</i> exon 12	Amorce sens	TTG-GGG-CCC-CTG-GAT-TTA-ATA-C
<i>NSD1</i> exon 6	Amorce anti-sens	GCT-TCC-TAA-GGC-GTT-TCT-TCT-C
Jonction <i>NUP98::NSD1</i>	Sonde FAM	FAM-CCC-CCA-GGC-CCC-AGT-AGC-TGT-GCG-GT-BHQ1
<i>ABL1</i> exon2	Amorce sens	TGG-AGA-TAA-CAC-TCT-AAG-CAT-AAC-TAA-AGG-T
<i>ABL2</i> exon 3	Amorce anti-sens	GAT-GTA-GTT-GCT-TGG-GAC-CCA
<i>ABL3</i> exon 3	Sonde HEX	HEX-CCA-TTT-TTG-GTT-TGG-GCT-TCA-CAC-CAT-T-NFQ

Le fluorochrome FAM est couplé au transcrit de fusion recherché (*NUP98::NSD1*) et le fluorochrome HEX au transcrit de référence *ABL1*.

### III.2.5.2. Mode opératoire

L'échantillon, le mix réactionnel (ddPCR Supermix for Probes (no dUTP)2X, amorces et sondes) et l'huile de génération des gouttelettes sont déposés dans la cartouche DG8 de production de gouttelettes puis placées dans le QX200 Droplet Generator (Figure 23A). La génération de gouttelettes produit des gouttelettes uniformes pour l'échantillon, permettant une quantification précise de l'ADN cible (Figure 23B). Une fois les gouttelettes générées, les échantillons ont été ensuite transférés sur une plaque de PCR 96 puits (ddPCR™ 96-Well PCR Plates, Biorad). La plaque a été scellée par un film aluminium thermosoudable par un système chauffant (PX1™ PCR Plate Sealer Bio-Rad). La PCR est réalisée ensuite sur le thermocycleur MiniAmp™ (Applied Biosystems, Waltham, Massachusetts, États-Unis) selon le protocole suivant :

Tableau 8 : Protocole ddPCR *NUP98::NSD1*

Cycling Step	Number of Cycles	Temperature °C	Time	Ramp Rate
Enzyme activation	1	95°C	10min	2°C/sec
Dénaturation	40	94°C	30 sec	
Annealing/Extension		58°C	1 min	
Enzyme Deactivation	1	98°C	10 min	
Droplet Stabilization	1	4°C	30 min	
Hold	1	4°C	24 h	

Après amplification par PCR, la plaque est chargée sur le lecteur de gouttelettes QX200™ Droplet Reader. Une aiguille perce le film de scellage et aspire chaque échantillon. Les gouttelettes sont alignées les unes à la suite des autres dans un capillaire fin et analysées individuellement en passant devant un détecteur comme en cytométrie en flux (Figure 23C). La lecture des gouttelettes est réalisée immédiatement après la PCR.

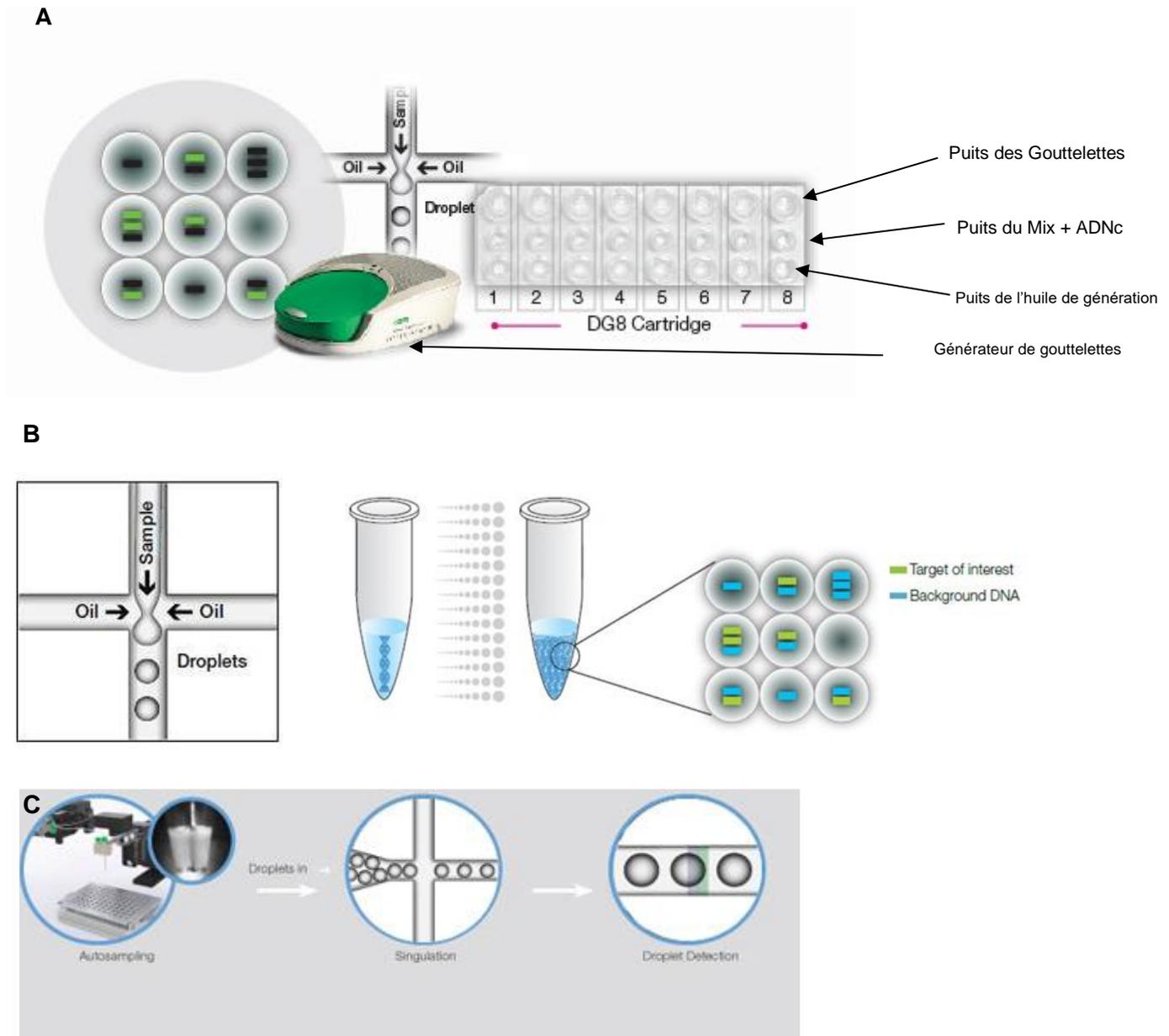


Figure 23 : Génération des gouttelettes (A), répartition aléatoire des copies d'ADNc dans les gouttelettes (B), lecture de la fluorescence des gouttelettes (C)

### III.2.5.3. Analyse des données

Sur chaque série d'expérience, une validation de la technique a été réalisée avant la quantification. Chaque échantillon est passé en « *duplicate* » au sein d'une série qui compte obligatoirement :

- Un témoin positif (patient connu pour ce transcrit : patient#2). La présence d'une amplification détectable sur le témoin positif permet de garantir l'efficacité du système PCR
- Un témoin négatif (lignée cellulaire myéloïde HL-60 → issu d'une lignée cellulaire de LAM négative pour le transcrit *NUP98::NSD1* (86). L'absence d'amplification du témoin négatif affirme la spécificité du système pour la cible.

- Un blanc réactif (H<sub>2</sub>O) qui permet d'apprécier la contamination.

Pour chaque série d'expérience, le nombre de gouttelettes minimum requis est de 10000 gouttelettes pour chaque puits selon les recommandations du fournisseur (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA).

Les gouttelettes sont réparties en 4 catégories de fluorescence selon les transcrits représentés par des nuages de points :

- FAM (channel1) négative, HEX (channel2) négative : gouttelettes double-négatives (aucun transcrite amplifié)
- FAM (channel1) positive, HEX (channel2) négative : gouttelettes positives pour le transcrite *NUP98::NSD1*, négatives pour le transcrite *ABL1*
- FAM (channel1) négative, HEX (channel2) positive : gouttelettes positives pour le transcrite *ABL1*, négatives pour le transcrite *NUP98::NSD1*
- FAM (channel1) positive, HEX (channel2) positive : gouttelettes double-positives (présence des deux types de transcrits)

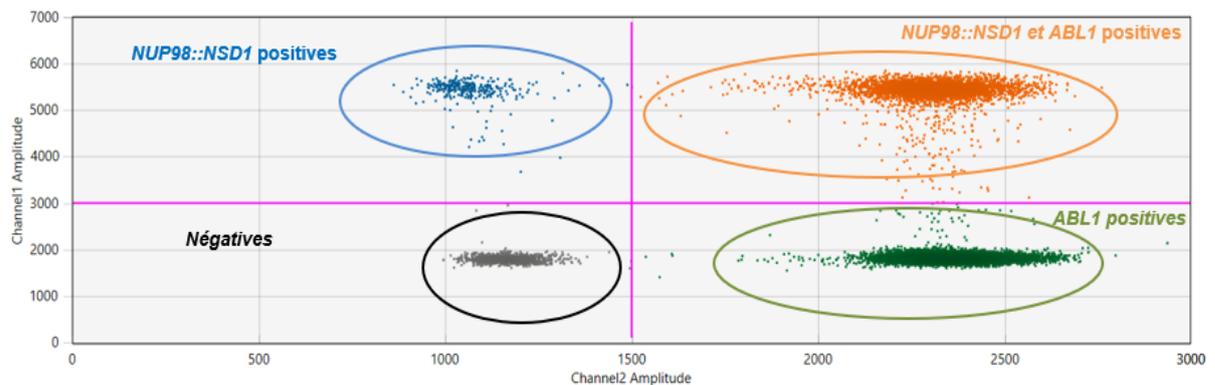


Figure 24: Résultats de la ddPCR NUP98-NSD1 en représentation 2D d'un puit pour un échantillon

Chaque point représente une gouttelette, l'axe des abscisses montre l'intensité du signal fluorescent pour la détection de *ABL1* (HEX), l'axe des ordonnées montre l'intensité du signal fluorescent pour la détection du transcrite de fusion *NUP98::NSD1* (FAM).

Les lignes roses représentent les seuils de distinction entre les différents compartiments et sont positionnées en fonction des témoins positifs et négatifs lors de chaque expérience. Ainsi, le seuil de fluorescence à partir duquel une gouttelette est considérée comme positive définit le seuil de positivité. Pour le système *ABL1* et *NUP98::NSD1*, le seuil de positivité a été fixé à 1500 et 3000 respectivement (Figure 24). Un « *duplicate* » est rendu positif uniquement s'il y a au moins 3 gouttelettes positives.

La quantification du transcrite de fusion est exprimée sous forme de ratio selon la formule suivante

$$\text{Ratio } NUP98::NSD1 = \frac{\text{Nombre de copies de } NUP98::NSD1 * 100}{\text{Nombre de copies d}'ABL1}$$

## IV. Résultats

### IV.1. Caractéristiques initiales des patients LAM avec réarrangement de *NUP98*

Neuf patients ayant un réarrangement de *NUP98* ont été inclus dans cette étude. Grâce à la cartographie optique du génome, la RT-MLPA et la PCR digitale, nous avons détecté chez 6 patients le transcrit *NUP98::NSD1*. Les trois autres patients n'ayant pas ce transcrit avaient probablement un réarrangement faisant intervenir un autre gène partenaire.

Parmi les 6 patients avec *NUP98::NSD1*, 5 étaient atteints d'une LAM de novo et un d'une LAM post-SMD/SMP. Cette cohorte comprenait 3 femmes et 3 hommes avec un âge médian de 31,5 (16 – 58) ans. Le nombre médian de globules blancs était de 65,2 (9 G/L à 386,1 G/L) et le pourcentage médian de blastes dans la moelle osseuse était de 60 % (21 % à 81 %). Selon la classification FAB, les sous-types LAM 4 et 5 étaient majoritaires (4/6 patients) (Annexe 5). Ces données sont cohérentes avec celles de la littérature : les LAM avec fusion *NUP98::NSD1* sont rapportées pour être associées à une leucocytose au diagnostic supérieure à celle des autres patients et ce réarrangement est plus fréquemment observé dans le sous-type FAB M4/M5 chez les patients adultes (10,87,88).

Trois des LAM *NUP98::NSD1* présentaient un caryotype normal (LAM-CN) tandis qu'un patient présentait un caryotype complexe, un autre avec une probable addition du chromosome 8 (+8) et un avec une addition de matériel sur le chromosome 11 (Tableau 9). Aucune t(5;11) n'a été retrouvée chez les 6 patients de notre étude, ce qui serait lié au fait que les gènes *NUP98* et *NSD1* soient situés dans les régions sub-téломériques des chromosomes 11 et 5 et ne sont pas facilement détectés par le caryotype conventionnel (7,77).

Tableau 9 : Caractéristiques initiales des 9 patients avec LAM *NUP98*

ID	Age	Sexe	GB (G/L)	% de blastes (MO)	FAB	Caryotype	<i>NUP98::NSD1</i>
P#1	58	F	24,2	81	LAM5	46, XX [40]	+
P#2	31	F	320,6	74	LAM4/5	46, XX, t(5;6)(q3?4;p?21)[11]	+
P#3	37	M	386,1	ND	LAM5	47,XY,+?8[4]	+
P#4	16	F	9,0	60	LAM2	46, XX [20]	+
P#5	32	M	63,9	49	LAM4	46,XY[20]	+
P#6	47	M	465,1	63	LAM4	46,XY,add(11)(p15)[13]/46,XY[7]	-
P#7	78	F	2,7	15	SMD	46,XX,?add?dup(11)(p15)[7]/46,XX[13]	-
P#8	47	F	3,3	7	SMD	46,XX,inv(11)(p15q22)[21]/6,XX[1]	-
P#9	29	M	66,5	21	LAM post SMP/ SMD	45,XY,del(1)(q2?2),add(1)(q?42), add(2)(q3?3),?add(4)(q?31),- 9,dic(12;?)(p1?1;?),add(13)(q3?2),add(21)(q2 2)[23]/46,XY[1]	+

GB : Globules blancs ; ID : identifiant patient ; MO : moelle osseuse ; P#1 : Patient 1 ; ND : non disponible

Le gène le plus fréquemment muté était *FLT3* (4/6 patients). Les autres mutations détectées touchaient les gènes *KRAS*, *NRAS*, *PTPN11*, *RUNX1*, *WT1* et *BAX*. Là encore les mutations rapportées sont cohérentes avec les données de la littérature : les mutations coopératrices *FLT3-ITD* et *WT1* ont été fréquemment rapportées dans la LAM *NUP98::NSD1* (74,84,89,90). Les mutations de *BAX* peuvent être associées à une résistance au Venetoclax (91) et sont observées chez des patients qui ont été exposés à la chimiothérapie, mais également dans des SMD qui ont transformé en LAM (LAM secondaire), ce qui était le cas du patient 9 qui a été diagnostiqué d'une LAM post SMD/SMP.

Tableau 10: Caractéristiques moléculaires, traitement, survie globale des patients LAM *NUP98::NSD1*

ID	NGS	Chimiothérapie d'induction	Réponse post-induction	Survie globale
P#1	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>WT1</i></li> <li><i>FLT3-ITD</i></li> </ul>	3+7+ Midostaurine	RC	Décès de sepsis 4 mois post allogreffe
P#2	<i>FLT3-ITD</i>	3+7+ Midostaurine	Échec	Décès à J10 post allogreffe
P#3	<i>FLT3-ITD</i>	/	/	Décès de CIVD avant induction
P#4	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>PTPN11</i></li> <li><i>RUNX1</i></li> </ul>	3+7	Échec	En rémission 6 ans post allogreffe
P#5	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>FLT3-TKD</i></li> <li><i>KRAS</i></li> </ul>	3+7+ Midostaurine	RC	Rechute à 6 mois post allogreffe
P#9	<ul style="list-style-type: none"> <li><i>BAX</i></li> <li><i>NRAS</i></li> </ul>	3+7	RC	Allogreffe prévue mi-septembre 2024

7+3 : cytarabine + anthracycline ; RC : rémission complète

Tous les patients de notre étude ont reçu une chimiothérapie d'induction par 3+7 plus ou moins Midostaurine, sauf le patient#3 qui est décédé avant l'induction. Deux patients ont obtenu un RC après l'induction. Les trois autres étaient en échec d'induction, ce qui a nécessité un rattrapage avec HDAC (cytarabine à forte dose) en consolidation. Quatre patients ont été allogreffés et le dernier devait l'être prochainement au moment de cette étude.

Deux patients sont décédés peu de temps après l'allogreffe, un autre a rechuté 6 mois post allogreffe et un est toujours en rémission complète 6 ans après l'allogreffe. Dans la littérature, les LAM avec co-occurrence de *NUP98::NSD1* et de la duplication en tandem dans le gène *FLT3* (*FLT3-ITD*) entraîne un échec d'induction élevé et une survie plus faible (10,77).

## IV.2. Validation de la méthode de ddPCR

### IV.2.1. Validation technique

Pour chaque série de PCR digitale réalisée dans notre étude, le nombre de gouttelettes analysées pour chaque échantillon doit être au moins de 10000 gouttelettes/puits selon les recommandations du fournisseur. Cette condition s'est avérée conforme sur toutes nos séries de PCR digitale. La détection du contrôle positif et l'absence de détection du contrôle négatif étaient observées pour l'ensemble des expériences.

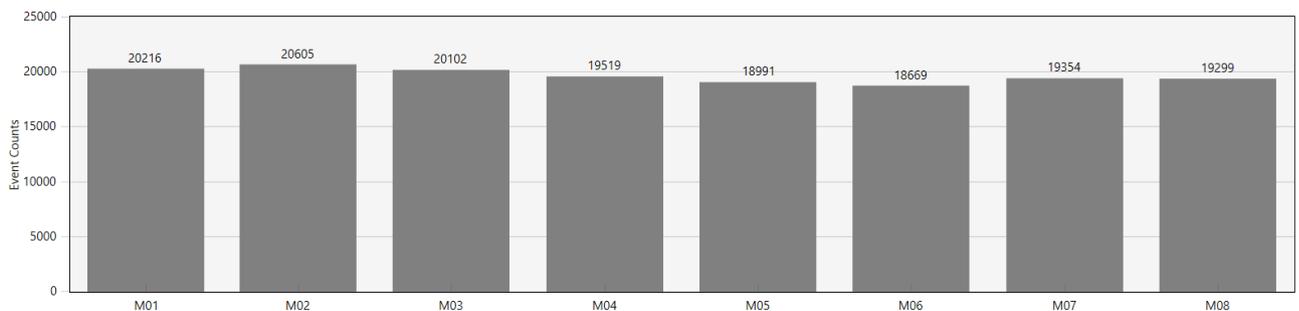


Figure 25 : Résultats du nombre de gouttelettes dénombrées par puits d'une série de ddPCR

Pour garantir la sensibilité de détection de la technique, le nombre de copies d'*ABL1* doit être supérieur ou égal à 10000 copies par puits.

### IV.2.2. La limite de détection et linéarité

Il n'existe pas de gamme commerciale standardisée pour le transcrit *NUP98::NSD1*. Pour valider la limite de linéarité et de détection de la ddPCR, nous avons quantifié le transcrit *NUP98::NSD1* dans le témoin positif (qui est notre patient#2 positif pour ce transcrit = 105% de transcrit *NUP98::NSD1* au diagnostic) dilué dans du HL-60 (témoin négatif) plusieurs fois pour atteindre des dilutions suivantes de 0,001%, 0,01%, 0,1%, 1%, 10% (Annexe 6). La dilution la plus faible à laquelle nous avons pu effectuer une mesure dans notre étude était 0,01%, ce qui correspond à une limite de détection (sensibilité) de  $10^{-4}$  pour le transcrit *NUP98::NSD1* (Figure 26).

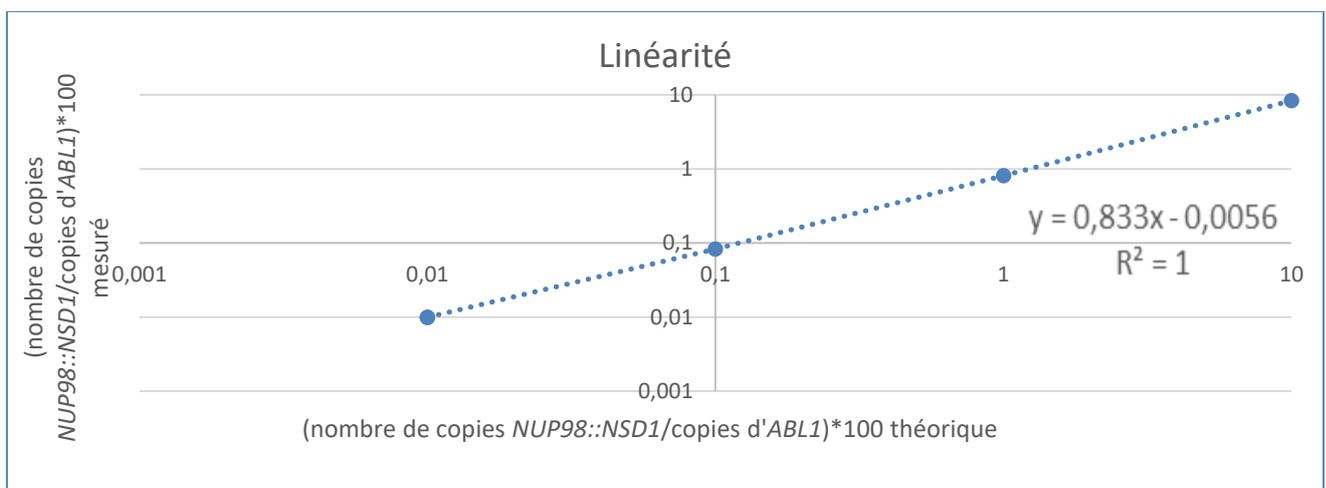


Figure 26 : Résultat de la mesure de la gamme de dilution sur une échelle logarithmique

Le coefficient de corrélation entre le ratio *NUP98::NSD1* théorique et mesuré était de 1.

### IV.2.3. Répétabilité

La répétabilité évalue la précision de la technique au sein d'une série unique. Pour déterminer la répétabilité, nous avons testé 5 fois dans une série unique le témoin positif dilué au 10<sup>ème</sup>.

Tableau 11: Répétabilité du transcrit *NUP98::NSD1*

Date d'analyse	Nombre de copies d'ABL1	Nombre de copies <i>NUP98::NSD1</i>	Nombre de copies de <i>NUP98::NSD1</i> /nombre de copies d'ABL1*100 (%)
31/01/2024	120480	12 965,03	10,76
31/01/2024	117650	12 874,11	10,94
31/01/2024	120067	12 730,12	10,60
31/01/2024	117191	12 854,75	10,97
31/01/2024	117822	12 651,38	10,74
<b>Moyenne</b>	<b>118642</b>	<b>12 815,08</b>	<b>10,80</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>1514,39</b>	<b>124,06</b>	<b>0,15</b>
<b>Coefficient de variation %(CV)</b>	<b>1,28</b>	<b>0,97</b>	<b>1,41</b>

Pour le ratio du transcrit *NUP98::NSD1*, nous obtenons une moyenne à 10,80% avec un écart type à 0,15% pour des valeurs allant de 10,60% à 10,97%. Nous obtenons une bonne répétabilité (CV = 1,41%) car le coefficient de variation est très bas (CV théorique <10%).

### IV.2.4. Reproductibilité

La reproductibilité consiste à analyser un échantillon dans des conditions différentes en faisant varier au moins un des facteurs : l'opérateur, le temps, les lots de réactifs, les étalonnages... Pour déterminer la reproductibilité dans cette étude, nous avons passé le même échantillon présentant le transcrit *NUP98::NSD1* (patient#2) dans 5 séries différentes à des jours différents.

Tableau 12 : Reproductibilité du transcrit *NUP98::NSD1*

Date de l'analyse	Nombre de copies d'ABL1	Nombre de copies <i>NUP98::NSD1</i>	Nombre de copies de <i>NUP98::NSD1</i> /nombre de copies d'ABL1*100 (%)
31/01/2024	120480	12965,03	10,76
22/02/2024	166000	17869,22	10,76
06/03/2024	125899	13719,68	10,90
05/04/2024	126667	13476,30	10,64
06/04/2024	139313	14736,12	10,58
<b>Moyenne</b>	<b>135672</b>	<b>14553,27</b>	<b>10,73</b>
<b>Ecart-type</b>	<b>18306,08</b>	<b>1962,54</b>	<b>0,12</b>
<b>Coefficient de variation %(CV)</b>	<b>13,49</b>	<b>13,49</b>	<b>1,15</b>

Pour le ratio du transcrit *NUP98::NSD1*, nous obtenons une moyenne à 10,73 % avec un écart type à 0,12% pour des valeurs allant de 10,58% à 10,90%. Nous obtenons une bonne reproductibilité (CV = 1,15%) car le coefficient de variation est très bas (CV théorique <10%).

### IV.3. Quantification de *NUP98::NSD1* par ddPCR sur les échantillons de patients

La ddPCR nous a permis de calculer le ratio de *NUP98::NSD1* à l'aide du nombre de copies de *NUP98::NSD1* et du nombre de copies d'*ABL1*.

Tableau 13 : Ratio *NUP98::NSD1* des 6 patients de la cohorte

ID	Nombre de copies de <i>NUP98::NSD1</i> /nombre de copies d' <i>ABL1</i> *100 (%)
P#1	53,9
P#2	105
P#3	88,21
P#4	169,96
P#5	51,91
P#9	ND*

ND : non disponible

#### IV.3.1. Patient 4

Le patient#4 est une jeune femme de 23 ans pour laquelle une LAM2 à caryotype normal a été diagnostiquée en mars 2017. Elle a reçu une induction selon le protocole BIG1. Après un échec de l'induction avec 24% de blastes dans la MO, un rattrapage par cytarabine haute dose (HDAC) a été réalisé. Suite à l'échec du rattrapage, un traitement par VIDAZA (azacitidine) a été instauré le 31 avril 2017. Après deux cures de VIDAZA, une réponse partielle a été obtenue, avec 3 % de blastes associés à une pancytopenie. Dans l'étude de *Sun et al.*, l'azacitidine a amélioré partiellement la réponse au traitement des patients LAM *NUP98::NSD1* (9).

En août 2017, elle a eu une greffe haplo-identique après l'obtention d'une rémission complète et elle a survécu jusqu'à présent sans rechute.

Tableau 14 : Cinétique sur sang et moelle du transcrit *NUP98::NSD1* chez le patient 4

	Copies de <i>NUP98::NSD1</i>	Copies de <i>ABL1</i>	% <i>NUP98::NSD1</i>	LOG	LOG REDUCTION
<b>MOELLE</b>					
<b>Diagnostic (03/2017)</b>	136625	80385	170	2,23	NA
<b>SANG</b>					
<b>MRD post- induction (09/2017)</b>	0	24749	0	/	NA
<b>MRD1 post- allogreffe (10/2017)</b>	0	<b>2837</b>	0	/	NA
<b>MRD2 post- allogreffe (02/2018)</b>	0	<b>1903</b>	0	/	NA
<b>MRD3 post- allogreffe (11/2019)</b>	0	<b>7925</b>	0	/	NA

Au diagnostic, la biologie moléculaire (par ddPCR) retrouve le transcrit *NUP98::NSD1* présent à un taux de 170% dans la moelle. Pour ce patient, toutes les MRD en biologie moléculaire ont été réalisées sur le sang. La première MRD post-greffe était indétectable. Les suivantes l'étaient aussi mais avec un nombre de copies d'*ABL1* insuffisant (< 10000 copies) pour valider l'analyse.

#### IV.3.2. Patient 5

Le patient#5 est un homme de 32 ans avec un diagnostic de LAM de novo en août 2023 avec un caryotype normal et un réarrangement *NUP98* en FISH. Une RT-MLPA a été réalisée et retrouve le transcrit de fusion *NUP98::NSD1*. Au NGS, on retrouve une mutation *FLT3-TKD* et une mutation *KRAS*. Son traitement d'induction a été instauré selon le schéma 3+7 associé à la midostaurine pour la mutation *FLT3*. Après rémission complète, un traitement de consolidation a été instauré avec de la cytarabine à haute dose et la midostaurine a été remplacée par le gilteritinib à cause de sa toxicité. Il a été allogreffé en janvier 2024 avec son frère haplo-identique.

Tableau 15 : Cinétique sur sang du transcrit *NUP98::NSD1* chez le patient 5

	Copies de <i>NUP98::NSD1</i>	Copies de <i>ABL1</i>	% <i>NUP98::NSD1</i>	LOG	LOG REDUCTION
<b>Diagnostic 08/2023</b>	71907	133910	53,7	1,73	/
<b>MRD1 J60 post allo (02/2024)</b>	0	79964	0	/	NA
<b>MRD2 J90 post allo (03/2024)</b>	0	26141	0	/	NA
<b>MRD3 J120 post allo (04/2024)</b>	0	23059	0	/	NA

\*NA : non applicable

Tableau 16 : Cinétique sur moelle du transcrit *NUP98::NSD1* chez le patient 5

	Copies de <i>NUP98::NSD1</i>	Copies de <i>ABL1</i>	% <i>NUP98::NSD1</i>	LOG	LOG REDUCTION
<b>Diagnostic (08/2023)</b>	53633	103261	51,9	1,72	NA
<b>MRD post-induction (10/2023)</b>	1058	66851	1,6	0,20	1,52
<b>MRD post- consolidation (11/2023)</b>	255	56861	0,45	-0,35	2,06
<b>MRD1 post allo (03/2024)</b>	0	63898	0	/	NA
<b>MRD2 post allo (04/2024)</b>	0	11978	0	/	NA
<b>MRD 3 post allo (06/2024)</b>	11233	146715	7,7	0,89	0,83
<b>Rechute (07/2024)</b>	43704	109714	40	1,60	0,11

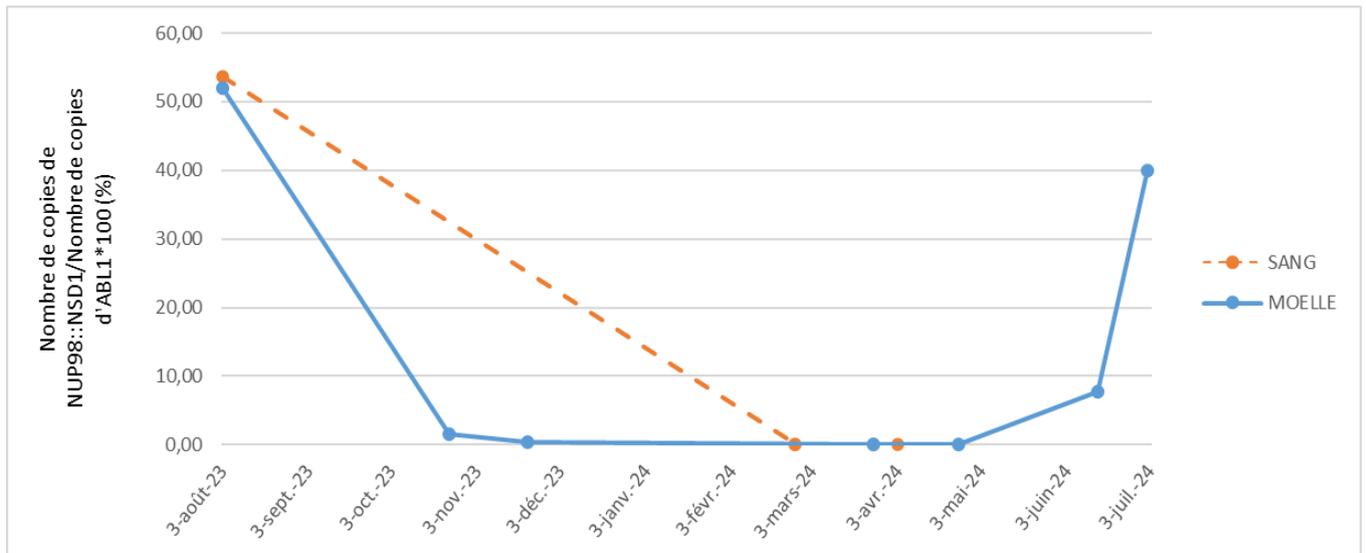


Figure 27 : Evolution du transcrit de fusion *NUP98::NSD1* sur sang et moelle chez le patient 5

Au diagnostic, on retrouve le transcrit *NUP98::NSD1* à 51,9% dans la moelle osseuse. Après la chimiothérapie d'induction et de consolidation, on note une log décroissance de 1,52log pour la MRD post-induction et 2,06log pour la MRD post consolidation. La MRD devient indétectable sur le point de suivi 3 et se repositive sur le point de suivi 5 à 6 mois post allogreffe. Un mois plus tard, une rechute cytologique est avérée avec un myélogramme mettant en évidence 14% de bastes concordant avec l'ascension du transcrit *NUP98::NSD1* à 40% (juillet 2024). Une rechute moléculaire a donc été détectée par PCR digitale environ un mois avant la rechute cytologique.

#### IV.4. MRD en CMF versus MRD en PCR digitale

Chez le patient#5 au diagnostic, le %LSC était > 1% (Annexe 7) ce qui oriente vers un haut risque de rechute de la LAM, selon l'étude de *Plesa et al.*, en 2018 (32).

Le suivi de la maladie résiduelle par biologie moléculaire (par ddPCR) a été comparé à la cytométrie en flux (Annexe 7 et 8) pour évaluer la concordance entre les 2 méthodes (Figure28). L'analyse des différents points de suivi auxquels s'ajoutent les quantifications rétrospectives du transcrit *NUP98::NSD1* par PCR digitale, montre une sensibilité et un taux inférieurs en CMF. Cependant, cette comparaison nous permet de montrer la sensibilité de la biologie moléculaire qui a détecté sur le point de suivi 5 l'ascension du transcrit de fusion alors que la CMF était négative sur le même prélèvement.

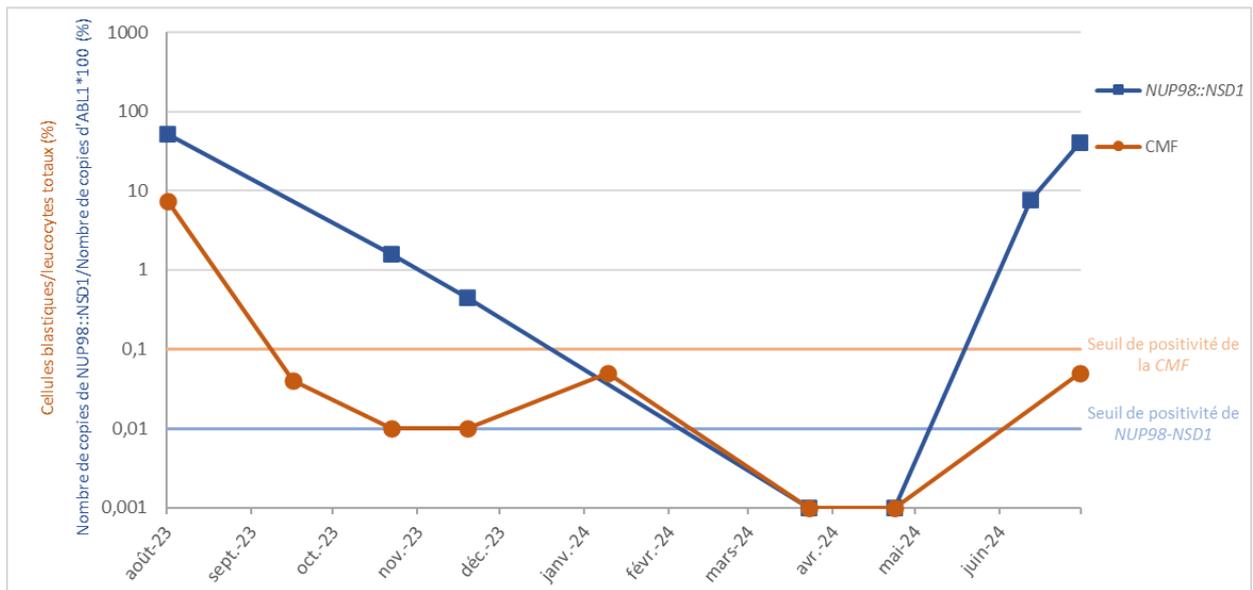


Figure 28 : Représentation graphique de la maladie résiduelle (CMF et ddPCR) du patient 5

## V. Discussion

---

La LAM est une pathologie hétérogène dans laquelle sont fréquemment retrouvés des transcrits de fusion dus à des translocations, des inversions, des délétions et des insertions impliquant différents chromosomes ou régions dans le même chromosome. Ces différentes aberrations peuvent être identifiées en cytogénétique conventionnelle mais certaines sont cryptiques. La réalisation d'autres examens de cytogénétiques (comme la FISH ou l'OGM) ayant une résolution plus élevée que le caryotype et les analyses moléculaires ont permis d'identifier des transcrits de fusion dans les LAM à caryotype normal. Le suivi de ces transcrits de fusion spécifiques de la maladie est un marqueur moléculaire robuste permettant d'évaluer la réponse au traitement et d'anticiper une rechute précoce afin d'adapter la prise en charge des patients. La MRD a un impact pronostique important et participe à la stratification thérapeutique des patients (92).

L'un des transcrits de fusion définissant un sous-type de LAM est *NUP98::NSD1*. Bien que la RT-qPCR soit la technique de quantification utilisée couramment dans les laboratoires d'hématologie pour quantifier et suivre les anomalies génétiques moléculaires dans les LAM, elle présente plusieurs contraintes notamment l'utilisation de gammes d'étalonnage et de plasmides commerciaux. Cependant, de nouvelles technologies de PCR n'utilisant pas de gammes plasmidiques sont apparues au cours des dernières années comme la PCR digitale en gouttelette (ddPCR).

La ddPCR est une technique de quantification absolue qui peut être utilisée pour quantifier des transcrits rares. La détection de transcrit de fusion rare consiste à détecter et quantifier un très faible nombre de copies de transcrit diluées dans une très grande quantité de copies du gène de référence. L'effet de partitionnement permettra aux copies du transcrit de se trouver dans une gouttelette en quantité relativement plus élevée qu'en solution libre. Le signal qu'elle générera sera ainsi facile à détecter.

Le premier objectif de ce travail était de mettre au point et valider un protocole de ddPCR sur ADNc en évaluant les paramètres analytiques de limite de détection, de répétabilité et de reproductibilité. La technique est linéaire sur une gamme étendue allant de  $10^{-5}$  à  $10^{-2}$ . La limite de détection, la reproductibilité et la répétabilité ont été des paramètres robustes et stables dans le temps, ce qui a facilité l'analyse des résultats. La bonne séparation des gouttelettes positives et négatives nous a permis de fixer les seuils décisionnels de fluorescence permettant de discriminer les gouttelettes positives des gouttelettes négatives pour les deux sondes (*NUP98::NSD1* et *ABL1*). L'essai de répétabilité montre des résultats proches l'un de l'autre. Les essais de reproductibilité ont montré que cette méthode est très reproductible d'une série à une autre, ce qui confirme la robustesse de la technique. Toutefois, l'évaluation de l'exactitude par l'intermédiaire des Evaluations Externes de Qualité (EEQ) organisés par le Groupe des biologistes moléculaires des hémopathies malignes (GBMHM) ou une évaluation inter-laboratoire permettrait de confirmer les résultats obtenus dans cette étude.

Le deuxième objectif était d'appliquer la ddPCR à une série d'échantillons au diagnostic et au suivi de patients avec LAM présentant ce réarrangement, afin d'évaluer l'intérêt de cette méthode pour le suivi de la maladie résiduelle. L'évaluation de la maladie résiduelle a permis chez un patient de détecter une rechute moléculaire environ un mois avant la rechute cytologique (Patient#5). Ceci suggère que la systématisation du suivi MRD du transcrit *NUP98::NSD1* par ddPCR chez ces patients permettrait de mettre en œuvre des stratégies de traitement préemptif de la rechute, avant le stade blastique.

En comparant les données de la CMF avec celle de la ddPCR, nous avons noté une sensibilité nettement plus élevée de la ddPCR qui a détecté l'ascension du transcrit de fusion alors que la CMF restait négative sur le même prélèvement.

Les mutations les plus fréquemment associés au transcrit de fusion *NUP98::NSD1* sont les mutations de *FLT3-ITD* et *NRAS* (90). Ce sous-type de LAM présente un caryotype normal et une faible réponse à la chimiothérapie conventionnelle (10,73). Actuellement il n'existe pas de thérapie ciblée pour les LAM *NUP98::NSD1* car les mécanismes oncogéniques induits par cette fusion sont encore peu connus. Dans certaines études, des stratégies thérapeutiques ciblant la machinerie transcriptionnelle et épigénétique, les altérations coopératrices et les voies de signalisation ou du cycle cellulaire ont été envisagées. *Tian et al.*, ont montré une faible réponse initiale à la chimiothérapie standard chez des patients atteints de LAM avec *NUP98::NSD1*, mais l'utilisation de venetoclax et la greffe de cellules souches hématopoïétiques séquentielle pourraient améliorer le mauvais pronostic et donc la survie globale chez les patients (84). Dans leur étude de 2018, *Okamoto et al.*, identifient CD123 comme une nouvelle cible thérapeutique potentielle dans la LAM *NUP98::NSD1* (93). En criblant plus de 300 médicaments anticancéreux, sur des cellules de patients et des modèles murins atteints de LAM *NUP98::NSD1*, *Kivioja* a découvert que le dasatinib (un inhibiteur de tyrosine kinase) et le navitoclax (l'inhibiteur pan-*BCL2*) cibleraient spécifiquement les cellules exprimant le transcrit *NUP98::NSD1* et la duplication interne en tandem de *FLT3 (FLT3-ITD)* (83).

Au total, nous avons dans ce travail mis en place une technique simple et sensible pour le suivi de la MRD des LAM *NUP98::NSD1*. Cette technique est désormais utilisée en routine dans le laboratoire. L'intérêt clinique du suivi MRD chez ces patients est une question qui dépasse ce sous-type de LAM. En post greffe, il est possible que ce suivi aide à prévenir la rechute, en permettant la mise en place rapide dès la détection du transcrit de traitement préemptif. Ceci reste à évaluer dans des études prospectives.

## Conclusion

---

La ddPCR est une technologie récente utilisée dans certains laboratoires pour la détection de mutations et pour la quantification de transcrits de fusion. Moins contraignante et plus précise que la qPCR, la ddPCR est adaptée pour suivre la maladie résiduelle sur de nombreux marqueurs moléculaires.

Jusqu'en novembre 2023, le laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis ne disposait pas d'une technique moléculaire de suivi de la maladie résiduelle des patients avec LAM *NUP98::NSD1*. La mise en place de la PCR digitale pour le suivi moléculaire des patients présentant ce transcrit permettra au clinicien d'évaluer le risque de rechute, d'adapter la stratégie thérapeutique et d'améliorer la prise en charge de ses patients.

Dans cette étude, nous avons réalisé par ddPCR la détection du transcrit rare *NUP98::NSD1* dans les LAM. La mise en place de cette technique dans le laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis a nécessité la mise au point technique basée sur un ensemble de paramètres que nous avons détaillé dans notre étude.

Bien que ce suivi soit désormais systématiquement réalisé au sein du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis dans le cadre du soin, son intérêt clinique reste à évaluer dans une étude prospective à plus large échelle.

## Références bibliographiques

---

1. Timothy J. Ley, Ley TJ, Miller C, Ding L, Raphael BJ, Mungall AJ, et al. Genomic and epigenomic landscapes of adult de novo acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 30 mai 2013;368(22):2059-74.
2. Matsukawa T, Aplan PD. Clinical and molecular consequences of fusion genes in myeloid malignancies. *Stem Cells Dayt Ohio.* nov 2020;38(11):1366-74.
3. Maynadié M, De Angelis R, Marcos-Gragera R, Visser O, Allemani C, Tereanu C, et al. Survival of European patients diagnosed with myeloid malignancies: a HAEMACARE study. *Haematologica.* févr 2013;98(2):230-8.
4. Shallis RM, Wang R, Davidoff A, Ma X, Zeidan AM. Epidemiology of acute myeloid leukemia: Recent progress and enduring challenges. *Blood Rev.* 1 juill 2019;36:70-87.
5. Bennett JM, Catovsky D, Daniel MT, Flandrin G, Galton DA, Gralnick HR, et al. Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol.* août 1976;33(4):451-8.
6. 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.
7. 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.
8. Döhner H, Wei AH, Appelbaum FR, Craddock C, DiNardo CD, Dombret H, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2022 recommendations from an international expert panel on behalf of the ELN. *Blood.* 22 sept 2022;140(12):1345-77.
9. Sun H, Yan H, Yan Z, Zhu Y, Yang G, Zhang S. Acute myeloid leukemia patients with NUP98::NSD1 showing initially poor treatment response can benefit from FLT3 inhibitors and venetoclax as well as HSCT. *Ann Hematol.* 1 févr 2023;102(2):473-5.
10. Hollink IHIM, Van Den Heuvel-Eibrink MM, Arentsen-Peters STCJM, Pratcorona M, Abbas S, Kuipers JE, et al. NUP98/NSD1 characterizes a novel poor prognostic group in acute myeloid leukemia with a distinct HOX gene expression pattern. *Blood.* 29 sept 2011;118(13):3645-56.
11. Hammoud M. Effet de l'association des basses concentrations d'O2 et des cellules stromales mésenchymateuses sur l'expansion ex vivo des cellules souches et progénitrices hématopoïétiques [Internet] [phdthesis]. Université de Franche-Comté; 2012 [cité 29 août 2024]. Disponible sur: <https://theses.hal.science/tel-01501922>
12. Seita J, Weissman IL. Hematopoietic Stem Cell: Self-renewal versus Differentiation. *Wiley Interdiscip Rev Syst Biol Med.* déc 2010;2(6):640.
13. Yu VWC, Scadden DT. Hematopoietic Stem Cell and Its Bone Marrow Niche. *Curr Top Dev Biol.* 2016;118:21-44.
14. Till JE, McCulloch EA. A Direct Measurement of the Radiation Sensitivity of Normal Mouse Bone Marrow Cells. *Radiat Res.* 1961;14(2):213-22.

15. Pina C, Enver T. Differential contributions of haematopoietic stem cells to foetal and adult haematopoiesis: insights from functional analysis of transcriptional regulators. *Oncogene*. 15 oct 2007;26(47):6750-65.
16. Kumar S, Geiger H. Biologie de niche HSC et expansion *HSC ex vivo*. *Trends Mol Med*. 1 sept 2017;23(9):799-819.
17. Comazzetto S, Shen B, Morrison SJ. Niches that regulate stem cells and hematopoiesis in adult bone marrow. *Dev Cell*. 12 juill 2021;56(13):1848-60.
18. Ferrara F, Schiffer CA. Acute myeloid leukaemia in adults. *The Lancet*. 9 févr 2013;381(9865):484-95.
19. Candoni A, De Marchi F, Zannier ME, Lazzarotto D, Filì C, Dubbini MV, et al. High prognostic value of pre-allogeneic stem cell transplantation minimal residual disease detection by WT1 gene expression in AML transplanted in cytologic complete remission. *Leuk Res*. 1 déc 2017;63:22-7.
20. Martignoles JA, Delhommeau F, Hirsch P. Genetic Hierarchy of Acute Myeloid Leukemia: From Clonal Hematopoiesis to Molecular Residual Disease. *Int J Mol Sci*. déc 2018;19(12):3850.
21. Le Guyader-Peyrou et al. 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. 2019; Disponible sur: <https://www.santepubliquefrance.fr>
22. Marcucci G, Haferlach T, Döhner H. Molecular Genetics of Adult Acute Myeloid Leukemia: Prognostic and Therapeutic Implications. *J Clin Oncol* [Internet]. 10 janv 2011 [cité 25 juin 2024]; Disponible sur: <https://ascopubs.org/doi/10.1200/JCO.2010.30.2554>
23. Döhner Hartmut, Weisdorf Daniel J., Bloomfield Clara D. Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 2015;373(12):1136-52.
24. Papaemmanuil E, Gerstung M, Bullinger L, Gaidzik VI, Paschka P, Roberts ND, et al. Genomic Classification and Prognosis in Acute Myeloid Leukemia. *N Engl J Med*. 9 juin 2016;374(23):2209-21.
25. Falini B, Brunetti L, Sportoletti P, Martelli MP. Leucémie myéloïde aiguë avec mutation *NPM1* : du laboratoire au chevet du patient. *Blood*. 8 oct 2020;136(15):1707-21.
26. Meyer SC, Levine RL. Translational implications of somatic genomics in acute myeloid leukaemia. *Lancet Oncol*. 1 août 2014;15(9):e382-94.
27. Medinger M, Lengerke C, Passweg J. Novel Prognostic and Therapeutic Mutations in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Genomics Proteomics*. 1 sept 2016;13(5):317-29.
28. Kayser S, Schlenk RF, Londono MC, Breitenbuecher F, Wittke K, Du J, et al. L'insertion de la duplication interne en tandem de *FLT3* dans le domaine 1 de la tyrosine kinase est associée à une résistance à la chimiothérapie et à un résultat inférieur. *Blood*. 17 sept 2009;114(12):2386-92.
29. Paschka P, Marcucci G, Ruppert AS, Mrózek K, Chen H, Kittles RA, et al. Adverse Prognostic Significance of KIT Mutations in Adult Acute Myeloid Leukemia With inv(16)

- and t(8;21): A Cancer and Leukemia Group B Study. *J Clin Oncol*. 20 août 2006;24(24):3904-11.
30. Rücker FG, Schlenk RF, Bullinger L, Kayser S, Teleanu V, Kett H, et al. Les altérations de *TP53* dans la leucémie myéloïde aiguë avec caryotype complexe sont corrélées avec des altérations spécifiques du nombre de copies, un caryotype monosomique et un pronostic lamentable. *Blood*. 1 mars 2012;119(9):2114-21.
  31. Winslow T. Terese Winslow LLC, Medical and Scientific Illustration. 2007 [cité 8 sept 2024]. Circulatory System. Disponible sur: <https://www.teresewinslow.com/circulatory>
  32. Plesa A, Roumier C, Dumezy F, Manzoni D, Sujobert P, Hayette S, et al. Stemness Signature in AML: GEP with 17 Genes Score Versus Leukemic Stem Cell (LSC) Quantification By Multiparameter Flow Cytometry (MFC). *Blood*. 29 nov 2018;132(Supplement 1):4009.
  33. Grimwade D, Hills RK, Moorman AV, Walker H, Chatters S, Goldstone AH, et al. Refinement of cytogenetic classification in acute myeloid leukemia: determination of prognostic significance of rare recurring chromosomal abnormalities among 5876 younger adult patients treated in the United Kingdom Medical Research Council trials. *Blood*. 22 juill 2010;116(3):354-65.
  34. Levy B, Baughn LB, Akkari Y, Chartrand S, LaBarge B, Claxton D, et al. Optical genome mapping in acute myeloid leukemia: a multicenter evaluation. *Blood Adv*. 11 avr 2023;7(7):1297-307.
  35. Garcia-Heras J. Optical Genome Mapping: A Revolutionary Tool for « Next Generation Cytogenomics Analysis » with a Broad Range of Diagnostic Applications in Human Diseases. *J Assoc Genet Technol*. 2021;47(4):191-200.
  36. Döhner H, Estey E, Grimwade D, Amadori S, Appelbaum FR, Büchner T, et al. Diagnosis and management of AML in adults: 2017 ELN recommendations from an international expert panel. *Blood*. 26 janv 2017;129(4):424-47.
  37. Ruminy P, Marchand V, Buchbinder N, Larson T, Joly B, Penther D, et al. Multiplexed targeted sequencing of recurrent fusion genes in acute leukaemia. *Leukemia*. mars 2016;30(3):757-60.
  38. Joudinaud R, Fournier É, Boudry A. Place des outils moléculaires dans les leucémies aiguës myéloïdes en 2023. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2023;2023(551):52-63.
  39. Padella A, Simonetti G, Paciello G, Giotopoulos G, Baldazzi C, Righi S, et al. Novel and Rare Fusion Transcripts Involving Transcription Factors and Tumor Suppressor Genes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. déc 2019;11(12):1951.
  40. Lamoril J, Ameziane N, Deybach JC, Bouizegarène P, Bogard M. Les techniques de séquençage de l'ADN : une révolution en marche. Première partie. *Immuno-Anal Biol Spéc*. oct 2008;23(5):260.
  41. 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.

42. Shallis RM, Daver N, Altman JK, Komrokji RS, Pollyea DA, Badar T, et al. Standardising acute myeloid leukaemia classification systems: a perspective from a panel of international experts. *Lancet Haematol.* 1 sept 2023;10(9):e767-76.
43. Ferrara F, Palmieri S, Leoni F. Clinically useful prognostic factors in acute myeloid leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1 juin 2008;66(3):181-93.
44. Breems DA, Van Putten WLJ, De Greef GE, Van Zelderen-Bhola SL, Gerssen-Schoorl KBJ, Mellink CHM, et al. Monosomal karyotype in acute myeloid leukemia: a better indicator of poor prognosis than a complex karyotype. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol.* 10 oct 2008;26(29):4791-7.
45. Byrd JC, Mrózek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, et al. Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood.* 15 déc 2002;100(13):4325-36.
46. Wei A, Strickland SA, Roboz GJ, Hou JZ, Fiedler W, Lin TL, et al. Safety and Efficacy of Venetoclax Plus Low-Dose Cytarabine in Treatment-Naive Patients Aged ≥65 Years with Acute Myeloid Leukemia. *Blood.* 2 déc 2016;128(22):102.
47. DiNardo CD, Pratz K, Pullarkat V, Jonas BA, Arellano M, Becker PS, et al. Venetoclax combined with decitabine or azacitidine in treatment-naive, elderly patients with acute myeloid leukemia. *Blood.* 3 janv 2019;133(1):7-17.
48. Stone RM, Mandrekar SJ, Sanford BL, Laumann K, Geyer S, Bloomfield CD, et al. Midostaurin plus Chemotherapy for Acute Myeloid Leukemia with a FLT3 Mutation. *N Engl J Med.* 3 août 2017;377(5):454-64.
49. Wei AH, Döhner H, Pocock C, Montesinos P, Afanasyev B, Dombret H, et al. Oral Azacitidine Maintenance Therapy for Acute Myeloid Leukemia in First Remission. *N Engl J Med.* 24 déc 2020;383(26):2526-37.
50. D'Souza A, Fretham C, Lee SJ, Arora M, Brunner J, Chhabra S, et al. Current Use and Trends in Hematopoietic Cell Transplantation in the United States. *Biol Blood Marrow Transplant J Am Soc Blood Marrow Transplant.* août 2020;26(8):e177-82.
51. Heinicke T, Kahl R, Kahl C, Cross M, Scholl S, Wolf HH, et al. Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation improves long-term outcome for relapsed AML patients across all ages: results from two East German Study Group Hematology and Oncology (OSHO) trials. *Ann Hematol.* 2021;100(9):2387-98.
52. Schlenk RF, Döhner K, Krauter J, Fröhling S, Corbacioglu A, Bullinger L, et al. Mutations and treatment outcome in cytogenetically normal acute myeloid leukemia. *N Engl J Med.* 1 mai 2008;358(18):1909-18.
53. Preudhomme C, Plesa A, Roumier C. Maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes : aspects biologiques. *Hématologie.* 1 avr 2020;26(1):5-18.
54. Grimwade D, Freeman SD. Defining minimal residual disease in acute myeloid leukemia: which platforms are ready for « prime time »? *Hematol Am Soc Hematol Educ Program.* 5 déc 2014;2014(1):222-33.
55. Duployez N, Preudhomme C. Place de la biologie moléculaire pour le diagnostic et le suivi des leucémies aiguës. *Rev Francoph Lab.* 1 avr 2015;2015(471):51-64.

56. Chen X, Xie H, Wood BL, Walter RB, Pagel JM, Becker PS, et al. Relation of Clinical Response and Minimal Residual Disease and Their Prognostic Impact on Outcome in Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 10 avr 2015;33(11):1258-64.
57. Short NJ, Zhou S, Fu C, Berry DA, Walter RB, Freeman SD, et al. Association of Measurable Residual Disease With Survival Outcomes in Patients With Acute Myeloid Leukemia: A Systematic Review and Meta-analysis. *JAMA Oncol*. 1 déc 2020;6(12):1890-9.
58. Badaoui B, Sloma I, Tarfi S. Suivi de la maladie résiduelle dans les leucémies aiguës myéloïdes. *Rev Francoph Lab*. 1 avr 2023;2023(551):64-74.
59. Heuser M, Freeman SD, Ossenkoppele GJ, Buccisano F, Hourigan CS, Ngai LL, et al. 2021 Update on MRD in acute myeloid leukemia: a consensus document from the European LeukemiaNet MRD Working Party. *Blood*. 30 déc 2021;138(26):2753-67.
60. Freeman SD, Virgo P, Couzens S, Grimwade D, Russell N, Hills RK, et al. Prognostic Relevance of Treatment Response Measured by Flow Cytometric Residual Disease Detection in Older Patients With Acute Myeloid Leukemia. *J Clin Oncol*. 10 nov 2013;31(32):4123-31.
61. Terwijn M, van Putten WLJ, Kelder A, van der Velden VHJ, Brooimans RA, Pabst T, et al. High Prognostic Impact of Flow Cytometric Minimal Residual Disease Detection in Acute Myeloid Leukemia: Data From the HOVON/SAKK AML 42A Study. *J Clin Oncol*. nov 2013;31(31):3889-97.
62. Del Principe MI, Buccisano F, Maurillo L, Sconocchia G, Cefalo M, Consalvo MI, et al. Minimal Residual Disease in Acute Myeloid Leukemia of Adults: Determination, Prognostic Impact and Clinical Applications. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 20 oct 2016;8(1):e2016052.
63. Si-Qi Li, Lan-Ping Xu, Yu Wang, Xiao-Hui Zhang, Huan Chen, Yu-Hong Chen. An LSC-based MRD assay to complement the traditional MFC method for prediction of AML relapse: a prospective study. *Blood*. 4 août 2022;140(5):516-20.
64. Maria Teresa Voso, Francesco Buccisano. AML: making residual disease more measurable. *Blood*. 4 août 2022;140(5):415-7.
65. Hanekamp D, Cloos J, Schuurhuis GJ. Leukemic stem cells: identification and clinical application. *Int J Hematol*. 1 mai 2017;105(5):549-57.
66. Smith CJ, Osborn AM. Advantages and limitations of quantitative PCR (Q-PCR)-based approaches in microbial ecology. *FEMS Microbiol Ecol*. 2009;67(1):6-20.
67. Sykes PJ, Neoh SH, Brisco MJ, Hughes E, Condon J, Morley AA. Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution. *BioTechniques*. sept 1992;13(3):444-9.
68. Vogelstein B, Kinzler KW. Digital PCR. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 3 août 1999;96(16):9236-41.
69. Quan PL, Sauzade M, Brouzes E. dPCR: A Technology Review. *Sensors*. 20 avr 2018;18(4):1271.
70. Gough SM, Slape CI, Aplan PD. NUP98 gene fusions and hematopoietic malignancies: common themes and new biologic insights. *Blood*. 8 déc 2011;118(24):6247-57.

71. Mohanty S. NUP98 Rearrangements in AML: Molecular Mechanisms and Clinical Implications. *Onco.* sept 2023;3(3):147-64.
72. Ibarra A, Hetzer MW. Nuclear pore proteins and the control of genome functions. *Genes Dev.* 15 févr 2015;29(4):337-49.
73. Michmerhuizen NL, Klco JM, Mullighan CG. Mechanistic insights and potential therapeutic approaches for NUP98-rearranged hematologic malignancies. *Blood.* 12 nov 2020;136(20):2275-89.
74. Bertrums EJM, Smith JL, Harmon L, Ries RE, Wang YCJ, Alonzo TA, et al. Comprehensive molecular and clinical characterization of NUP98 fusions in pediatric acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 1 août 2023;108(8):2044-58.
75. Cerveira N, Correia C, Dória S, Bizarro S, Rocha P, Gomes P, et al. Frequency of NUP98-NSD1 fusion transcript in childhood acute myeloid leukaemia. *Leukemia.* nov 2003;17(11):2244-7.
76. Behnert A, Lee AG, Young EP, Breese MR, Leung SG, Behroozfard I, et al. NUP98-NSD1 Driven MDS/MPN in Childhood Masquerading as JMML. *J Pediatr Hematol Oncol.* août 2021;43(6):e808.
77. Ostronoff F, Othus M, Gerbing R, Loken M, Raimondi S, Hirsch B, et al. Co-expression of NUP98/NSD1 and FLT3/ITD is more prevalent in younger AML patients and leads to high-risk of induction failure: a COG and SWOG report. *Blood.* 21 août 2014;124.
78. Matsukawa T, Yin M, Nigam N, Negi V, Li L, Small D, et al. NUP98::Nsd1 and FLT3-ITD collaborate to generate acute myeloid leukemia. *Leukemia.* juill 2023;37(7):1545-8.
79. Tauchmann S, Schwaller J. NSD1: A Lysine Methyltransferase between Developmental Disorders and Cancer. *Life.* 25 août 2021;11(9):877.
80. Topchu I, Pangen RP, Bychkov I, Miller SA, Izumchenko E, Yu J, et al. The role of NSD1, NSD2, and NSD3 histone methyltransferases in solid tumors. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 9 mai 2022;79(6):285.
81. GmbH MP. MetaSystems Probes. 2016 [cité 1 juill 2024]. XL t(5;11) NSD1/NUP98 DF - Translocation/Dual Fusion Probe. Disponible sur: <https://metasystems-probes.com/en/probes/xl/d-5141-100-og/>
82. Kivioja JL, Lopez Martí JM, Kumar A, Kontro M, Edgren H, Parsons A, et al. Chimeric NUP98–NSD1 transcripts from the cryptic t(5;11)(q35.2;p15.4) in adult de novo acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma.* 4 mars 2018;59(3):725-32.
83. Kivioja J. THE NUP98-NSD1 FUSION GENE IN ACUTE MYELOID LEUKEMIA. Helsinki: Helsingin yliopisto; 2019.
84. Tian J, Zhu Y, Li J, Yang G, Weng X, Huang T, et al. The landscape of NUP98 rearrangements clinical characteristics and treatment response from 1491 acute leukemia patients. *Blood Cancer J.* 14 mai 2024;14(1):1-4.
85. Shiba N, Ichikawa H, Taki T, Park MJ, Jo A, Mitani S, et al. NUP98-NSD1 gene fusion and its related gene expression signature are strongly associated with a poor prognosis in pediatric acute myeloid leukemia. *Genes Chromosomes Cancer.* juill 2013;52(7):683-93.

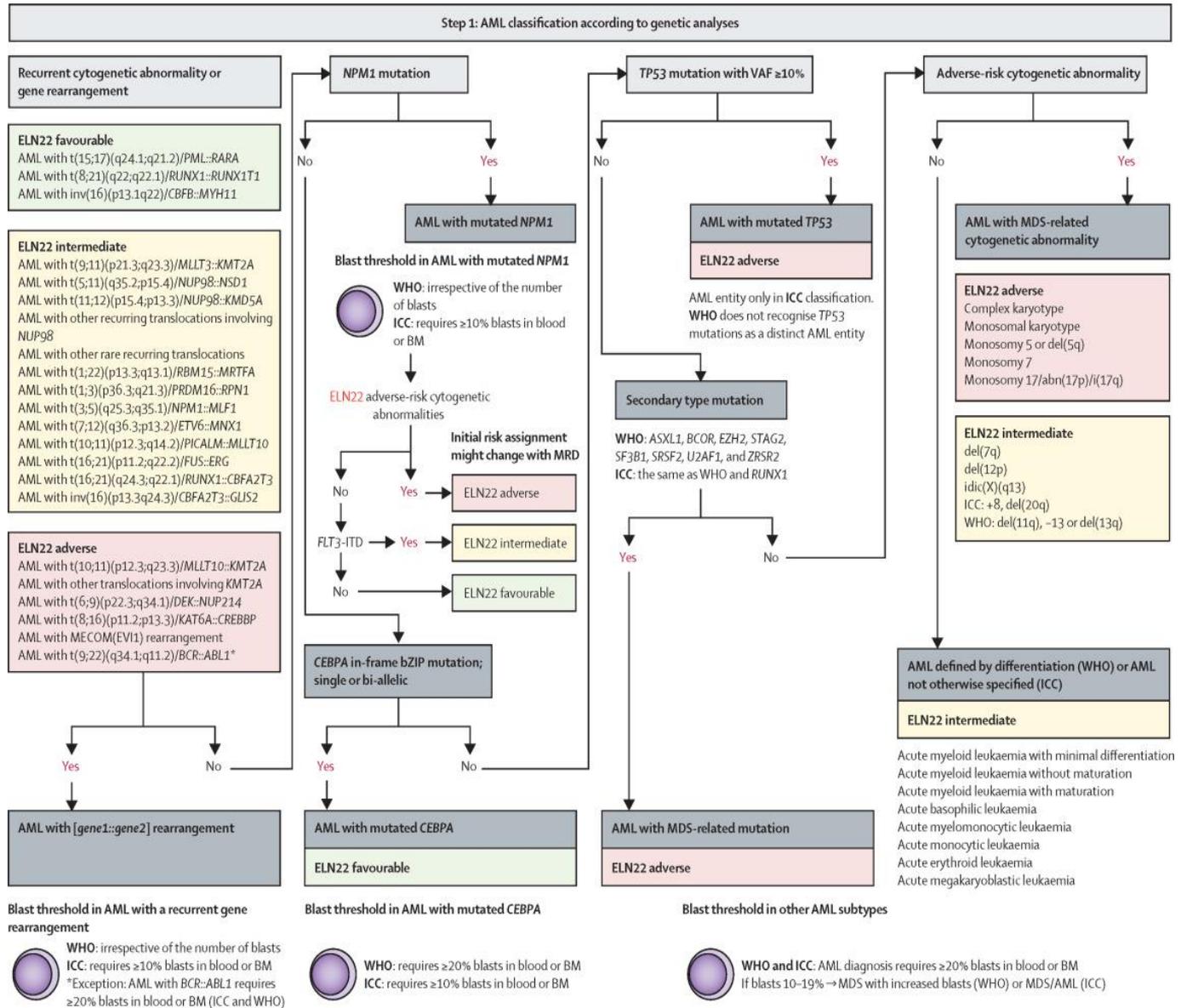
86. HL-60 - CCL-240 | ATCC [Internet]. 1997 [cité 18 sept 2024]. Disponible sur: <https://www.atcc.org/products/ccl-240>
87. Akiki S, Dyer SA, Grimwade D, Ivey A, Abou-Zeid N, Borrow J, et al. NUP98-NSD1 fusion in association with FLT3-ITD mutation identifies a prognostically relevant subgroup of pediatric acute myeloid leukemia patients suitable for monitoring by real time quantitative PCR. *Genes Chromosomes Cancer*. nov 2013;52(11):1053-64.
88. Niktoreh N, Walter C, Zimmermann M, von Neuhoff C, von Neuhoff N, Rasche M, et al. Mutated WT1, FLT3-ITD, and NUP98-NSD1 Fusion in Various Combinations Define a Poor Prognostic Group in Pediatric Acute Myeloid Leukemia. *J Oncol*. 30 juill 2019;2019:1609128.
89. Mohanty S, Jyotsana N, Sharma A, Kloos A, Gabdoulline R, Othman B, et al. Targeted Inhibition of the NUP98-NSD1 Fusion Oncogene in Acute Myeloid Leukemia. *Cancers*. 26 sept 2020;12(10):2766.
90. Thanasopoulou A, Tzankov A, Schwaller J. Potent co-operation between the NUP98-NSD1 fusion and the FLT3-ITD mutation in acute myeloid leukemia induction. *Haematologica*. 1 sept 2014;99(9):1465-71.
91. Moujalled DM, Brown FC, Chua CC, Dengler MA, Pomilio G, Anstee NS, et al. Acquired mutations in BAX confer resistance to BH3-mimetic therapy in acute myeloid leukemia. *Blood*. 9 févr 2023;141(6):634-44.
92. Ganzel C, Sun Z, Baslan T, Zhang Y, Gönen M, Abdel-Wahab OI, et al. Measurable residual disease by flow cytometry in acute myeloid leukemia is prognostic, independent of genomic profiling. *Leuk Res*. déc 2022;123:106971.
93. Okamoto K, Imamura T, Tanaka S, Urata T, Yoshida H, Shiba N, et al. The Nup98::Nsd1 fusion gene induces CD123 expression in 32D cells. *Int J Hematol*. 1 août 2023;118(2):277-87.

## Annexes

---

Annexe 1. Classification des sous-types de LAM en fonction des anomalies génétiques selon l'OMS 2022 et l'ICC 2022 (42).....	87
Annexe 2. Application de la loi de Poisson pour le calcul du nombre de copies des transcrits ( <i>ABL1</i> et <i>NUP98::NSD1</i> ) .....	88
Annexe 3. Méthode d'isolement des cellules mononuclées (Ficoll).....	90
Annexe 4. Protocole de la RT-PCR.....	93
Annexe 5. Cytologie médullaire et sanguine au diagnostic des 5 premiers patients de notre cohorte LAM avec transcrit <i>NUP98::NSD1</i> .....	94
Annexe 6. Ratio théorique et mesuré de <i>NUP98::NSD1</i> pour la détection de la limite de détection .....	98
Annexe 7. Immunophénotypage médullaire du patient 5 au diagnostic.....	99
Annexe 8. Immunophénotypage médullaire du patient 5 en situation de suivi (MRD1= MRD post-induction) .....	103

# Annexe 1. Classification des sous-types de LAM en fonction des anomalies génétiques selon l'OMS 2022 et l'ICC 2022 (42)



## Annexe 2. Application de la loi de Poisson pour le calcul du nombre de copies des transcrits (*ABL1* et *NUP98::NSD1*)

La loi de Poisson est utilisée pour décrire des événements rares qui se produisent de manière aléatoire. Ici, "l'événement rare" est qu'une molécule d'ADN soit dans une gouttelette. Pour déterminer le nombre de copies de *NUP98::NSD1* et d'*ABL1*, on utilisera la formule de la loi de poisson :

$$P(k) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$

### Calcul du ratio de *NUP98::NSD1* dans le sang au diagnostic du patient 5.

Grace au logiciel quantasoft de biorad, nous avons obtenu un ratio égal à 53,70%. Appliquons maintenant la loi de poisson pour retrouver ce ratio

- **Calcul du nombre de copies de *ABL1* pour l'échantillon de sang au diagnostic du patient 5**

Le nombre de gouttelette total de l'échantillon = 17874

Le nombre de gouttelette positive = 16836

Le nombre de gouttelette négative = 1038

- **La proportion de gouttelettes négatives  $P_0 = 1038 / 17874 = 0,058$**

$\lambda$  est le nombre moyen d'ADN par gouttelette. Selon la loi poisson, la probabilité qu'une gouttelette soit négative est donnée par :  $P(0) = e^{-\lambda} \rightarrow \lambda = -\ln(P_0) = -\ln(0,058) = 2,85$

Donc en moyenne chaque gouttelette contient 2,85 copies d'*ABL1*. Etant donnée que chaque gouttelette contient 2.85 copies d'*ABL1*, et que le volume approximatif d'une gouttelette BioRad dans le cadre d'une PCR digitale est de 0.00085  $\mu$ l, nous pouvons estimer la concentration en ADN d'une gouttelette à  $C = \lambda / 0,00085$ .

Dans notre cas, cela revient à :  $C = 2,85 / 0.00085 = 3353$  copies/ $\mu$ l pour un échantillon total de 20 $\mu$ l cela correspond à  $3353 \times 20 \mu$ l = **67059~copies d'*ABL1***

- **Calcul du nombre de copies de *NUP98::NSD1* pour l'échantillon de sang au diagnostic du patient 5**

Le nombre de gouttelette total de l'échantillon = 17874

Le nombre de gouttelette positive = 13996

Le nombre de gouttelette négative = 3878

- **La proportion de gouttelettes négatives  $P_0 = 3878 / 17974 = 0,22$**

$\lambda$  est le nombre moyen d'ADN par gouttelette. Selon la loi poisson, la probabilité qu'une gouttelette soit négative est donnée par :

$$P(0) = e^{-\lambda} \rightarrow \lambda = -\ln(P_0) = -\ln(0,22) = 1,52$$

Donc en moyenne chaque gouttelette contient 1,52 copies de *NUP98::NSD1*. La concentration en ADN d'une gouttelette à  $C = \lambda / 0,00085$ .

Dans notre cas, cela revient à :  $C = 1,52 / 0.00085 = 1797$  copies/ul pour un volume initial d'échantillon de 20µl cela correspond à  $1797 \times 20 \mu\text{l} = 35954$ ~copies d'*ABL1*

Donc le

$$\text{Ratio } NUP98::NSD1 = \frac{\text{Nombre de copies de } NUP98::NSD1}{\text{Nombre de copies d}'ABL1} * 100$$

$$\text{Ratio } NUP98::NSD1 = \frac{35954}{67059} * 100 = 53,62 \%$$

### Annexe 3. Méthode d'isolement des cellules mononuclées (Ficoll)

Tous les échantillons doivent être manipulés stérilement, avec des gants sous la hotte à flux laminaire, avec du matériel à usage unique.

- **Préparation des tubes** : Sur un portoir pour tubes de 15 mL et 50 mL, sortir les tubes nécessaires en suivant le tableau suivant :

	Moelle	Sang					
Date de prélèvement	Du jour ou <48j	Uniquement du jour			>24 h et < 48h		
Volume du prélèvement	< 9mL	2-4 mL	10-17,5 mL	18,5-25 mL	2-4 mL	10-17,5 mL	18,5 – 25 mL
Tubes à étiqueter	2 tubes 15 mL 1 tube 50 mL	1 tube 15 mL 1 uni-Sep* 1 tube 50 mL	2 tubes 50 mL 1 uni-Sep* Maxi	2 tubes 50 mL 1 uni-Sep* Maxi	2 tubes 15 mL 1 tube 50 mL	3 tubes 50mL	3 tubes 50mL

- **Dilution des prélèvements** : Pour la moelle, il est nécessaire de bien rincer le tube du prélèvement avec du NaCl 0,9% pour récupérer le maximum de lymphocytes.

Nature prélèvement	Moelle	Sang		
Volume du prélèvement	< 9 mL	2 – 4 mL	10 – 17,5 mL	18,5 – 25 mL
Tube utilisé pour la dilution	15 mL		50 mL	
	Verser la totalité du prélèvement dans le bon tube			
Volume de NaCl 0,9%	qsp 10 mL	qsp 8 mL	qsp 20 - 35 mL	Pas de dilution

- **Préparation du Ficoll manuel**

Nature prélèvement	Moelle	Sang		
Volume du prélèvement	< 9 mL	2 – 4 mL	10 – 17,5 mL	18,5 – 25 mL
Tube utilisé pour le Ficoll	15 mL		50 mL	
Volume de Milieu de séparation des lymphocytes (Ficoll)	4mL	10L		15L

Transférer délicatement la moelle diluée ou le sang dilué avec une pipette stérile de 10 ml contre la paroi du tube contenant le Ficoll. Ce dernier doit être incliné au départ et le relever au fur et à mesure du transfert. Faire en sorte de ne pas « faire de vague » dans le Ficoll. La « frontière » entre le Ficoll et le prélèvement dilué doit être nette.

### - Préparation du Ficoll-Pan

Transvaser, par retournement, le tube contenant le sang dilué ou non, dans le tube Uni Sep adéquat.

### - Centrifugation des Ficoll

Positionner les tubes dans la centrifugeuse en faisant attention à bien l'équilibrer. Voici les paramètres des centrifugations :

Ficoll manuel	Ficoll-Pan
Température ambiante	Température ambiante
400 G	1 000 G
SANS frein	SANS frein
25 min	20 min

Il est possible d'utiliser les paramètres de centrifugation de Ficoll manuel pour les Ficoll-Pan. Mais attention, l'inverse n'est pas possible.

### - Récupération des anneaux

Méthode pipette stérile	Méthode pastette stérile
<ul style="list-style-type: none"><li>- Prélever le maximum du surnageant situé au- dessus de l'anneau, avec la pipette stérile et jeter le liquide dans la poubelle des liquides.</li><li>- Avec la même pipette, prélever l'anneau de cellules en essayant de ne pas prendre trop de Ficoll et le transférer dans le tube de 50 mL préparé précédemment.</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>- Prélever directement l'anneau avec la pastette et le transférer dans le tube de 50 mL préparé précédemment</li><li>- Répéter l'action autant de fois que nécessaire.</li></ul>

### - Lavages

#### 1<sup>er</sup> lavage

Si l'anneau récupéré présente beaucoup de globules rouges (aspect rouge), procéder à une lyse cellulaire des globules rouges : ajouter le tampon EL, qsp 50 mL et incuber dans la glace entre 1 et 10 min en fonction de l'intensité du rouge (proportionnel à la quantité de GR).

Si l'anneau récupéré est blanc, ajouter du NaCl 0,9%, qsp 50 mL, sur les cellules récupérées. Agiter par retournement.

Centrifuger à température ambiante, 400 G, avec frein, 10 min.

#### 2<sup>nd</sup> lavage :

Vérifier la présence de culots dans les tubes. Vider par retournement le tube dans la poubelle des liquides.

Ajouter du NaCl 0,9% :

	Très Petit culot	Moelle	Petit culot	Moyen à gros culot
Volume NaCl 0,9%	Pas de 2nd Lavage	qsp 30 -35 mL		qsp 50 mL

- Si le 1er lavage a été effectué avec le tampon EL, il est nécessaire de faire un 2nd lavage avec du NaCl 0.9%.
- Agiter par retournement. Remettre en suspension le culot de cellules en agitant doucement (Vortex déconseillé).
- Centrifuger à température ambiante, 400 G, avec frein, 10 min.
- Vérifier la présence de culots dans les tubes. Vider par retournement le tube dans la poubelle des liquides.
- Reprendre le culot obtenu dans un volume de SVF décomplémenté, qsp 1 mL. Si le culot est de taille importante, ajouter 5 mL voire 10 mL.

Procéder à la numération avec un compteur cellulaire (automate Horiba™) et à la répartition des cellules (5 millions de cellules/aliquots).

## Annexe 4. Protocole de la RT-PCR

Préparer le mix RT dans la glace selon le tableau suivant :

DESIGNATION	FOURNISSEUR	MIX 1N (Vol Final 20µl)
5x First Strand Buffer	Invitrogen	8
DTT 0,1M	Invitrogen	4
DNTP 10Mm	Thermo Scientific	4
EXO-RESISTANT RANDOM PRIMER 500µM	Fermentas	2
M-MLV 200 units/µl	Invitrogen	1
Protector Rnase Inhibitor 40 units/µl	Roche Applied Science	1

- Distribuer 20µl de chaque ARN patient dans une plaque 96
- Déposer un puit H2O pour chaque transcrit testé et un contrôle négatif (le contrôle positif sera mis ultérieurement car c'est un plasmide)
- Filmer la plaque
- Lancer le programme RT DENAT

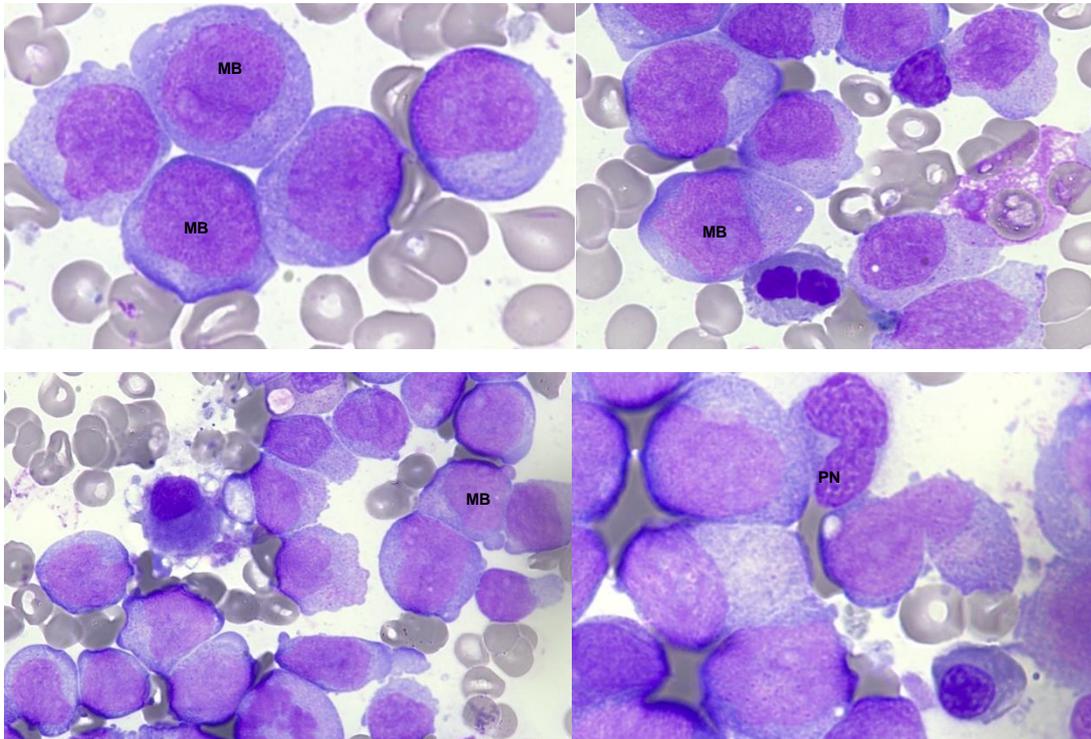
Programme RT DENAT				
Cycling Step	Number of cycles	Temperature °C	Time	Ramp Rate
Denaturation	1	70°C	10 min	100%
Hold	1	8°C		

- Centrifuger la plaque 96 puits
- Ajouter 20µl de mix RT dans chaque puit
- Lancer le programme RT ELONGATION

Programme RT ELONGATION				
Cycling Step	Number of cycles	Temperature °C	Time	Ramp Rate
Elongation	1	37°C	60 min	100%
Denaturation	1	95°C	3 min	
Hold	1	8°C		

**Annexe 5. Cytologie médullaire et sanguine au diagnostic des 5 premiers patients de notre cohorte LAM avec transcrit *NUP98::NSD1***

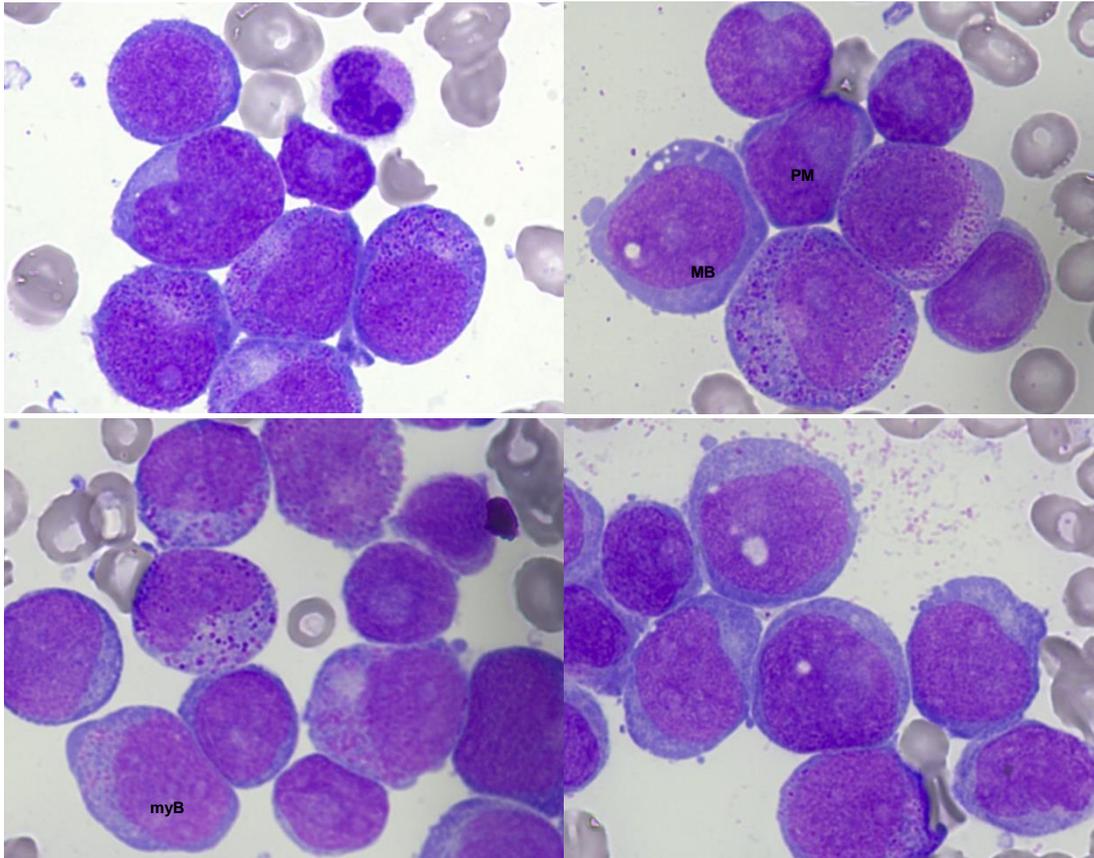
Patient#1 (Moelle osseuse)



**Conclusion cytologique :** Moelle riche infiltrée par environ 81% de blastes myéloïdes majoritairement d'allure monoblastique (**MB**). Les blastes ont une grande taille avec un cytoplasme modérément basophile. Présence de signes de dysgranulopoïèse (dégranulation cellulaire, persistance d'un liseré cytoplasmique basophile, défaut de segmentation des polynucléaires neutrophiles (PN) avec condensation anormale de la chromatine).

Aspect cytologique d'une LAM5.

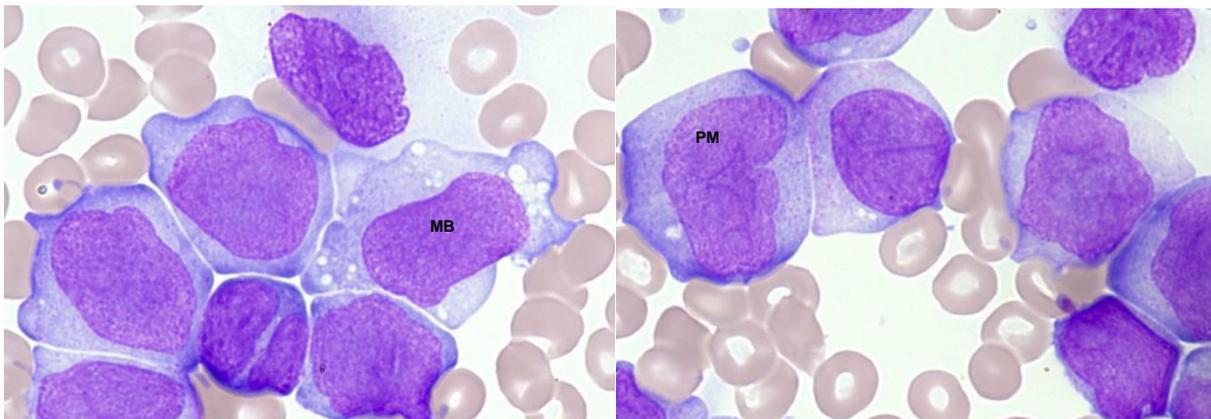
Patient#2 (Moelle osseuse)



**Conclusion cytologique :** Moelle riche envahie par des blastes myéloïdes (myélobastes (myB) + promonocytes (PM) + monoblastes (MB)).

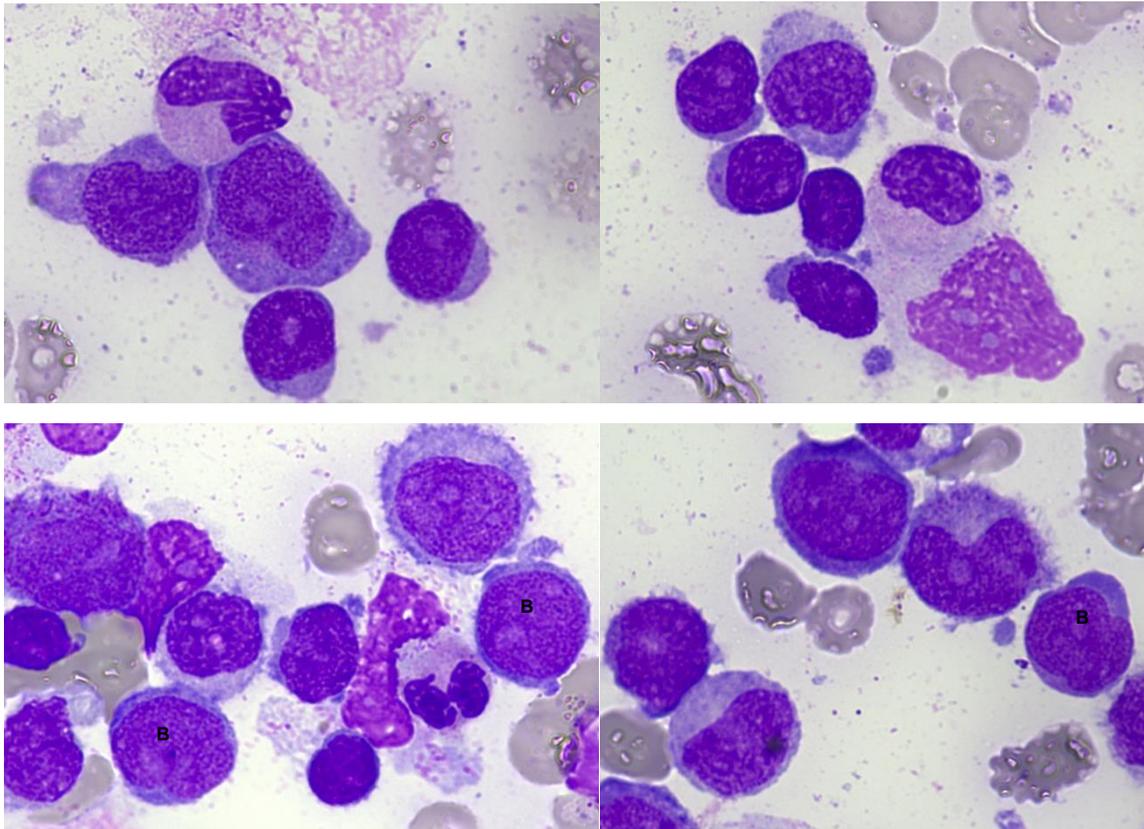
Aspect cytologique d'une LAM4/5

Patient#3 (sang)



**Conclusion cytologique :** Présence d'environ 94% de blastes myéloïdes, certains d'allure monoblastique (MB) et d'autres d'allure promonocytaire (PM). Aspect cytologique de LA monoblastique (LAM5).

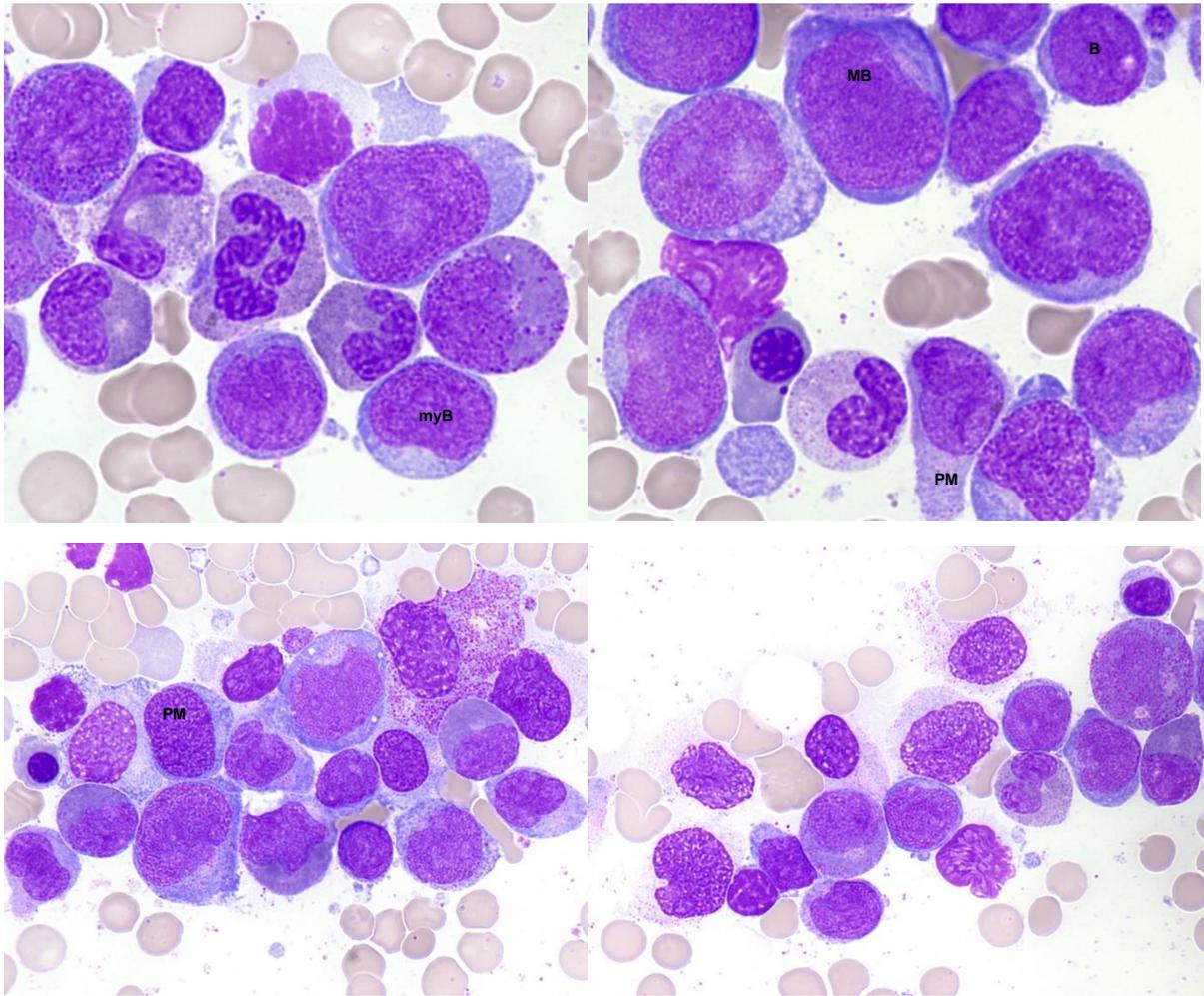
Patient#4 (Moelle osseuse)



**Conclusion cytologique :** Moelle riche, envahie par environ 60% de blastes indifférenciés (B) d'allure myéloïde, de taille hétérogène, avec un noyau parfois irrégulier, un cytoplasme modérément basophile contenant souvent des granulations cytoplasmiques. On observe des signes de dysgranulopoïèse (cytoplasme saumoné, dégranulation cellulaire).

Cytologie en faveur d'une LAM2.

Patient#5 (Moelle osseuse)



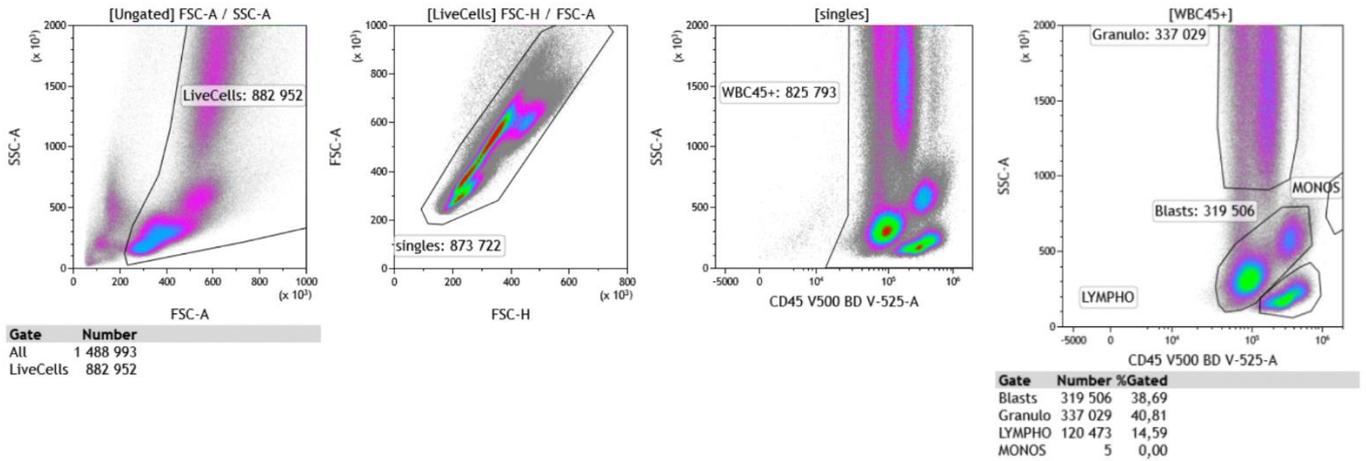
**Conclusion cytologique** : Moelle très riche envahie par des blastes myéloïdes (blastes indifférenciés (B) + myéloblastes (myB) + promonocytes (PM) + monoblastes (MB)). On note également un excès de monocytes matures (7%).

**Annexe 6. Ratio théorique et mesuré de *NUP98::NSD1* pour la détection de la limite de détection**

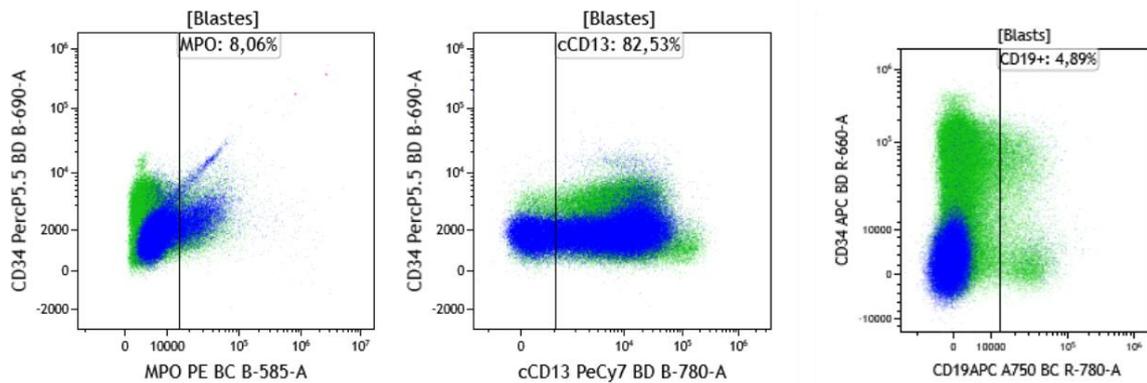
<b>Ratio <i>NUP98 :NSD1</i> théorique (%)</b>	<b>Ratio <i>NUP98 :NSD1</i> mesuré (%)</b>
<b>10</b>	8,33
<b>1</b>	0,81
<b>0,1</b>	0,08
<b>0,01</b>	0,01
<b>0,001</b>	0,000

## Annexe 7. Immunophénotypage médullaire du patient 5 au diagnostic

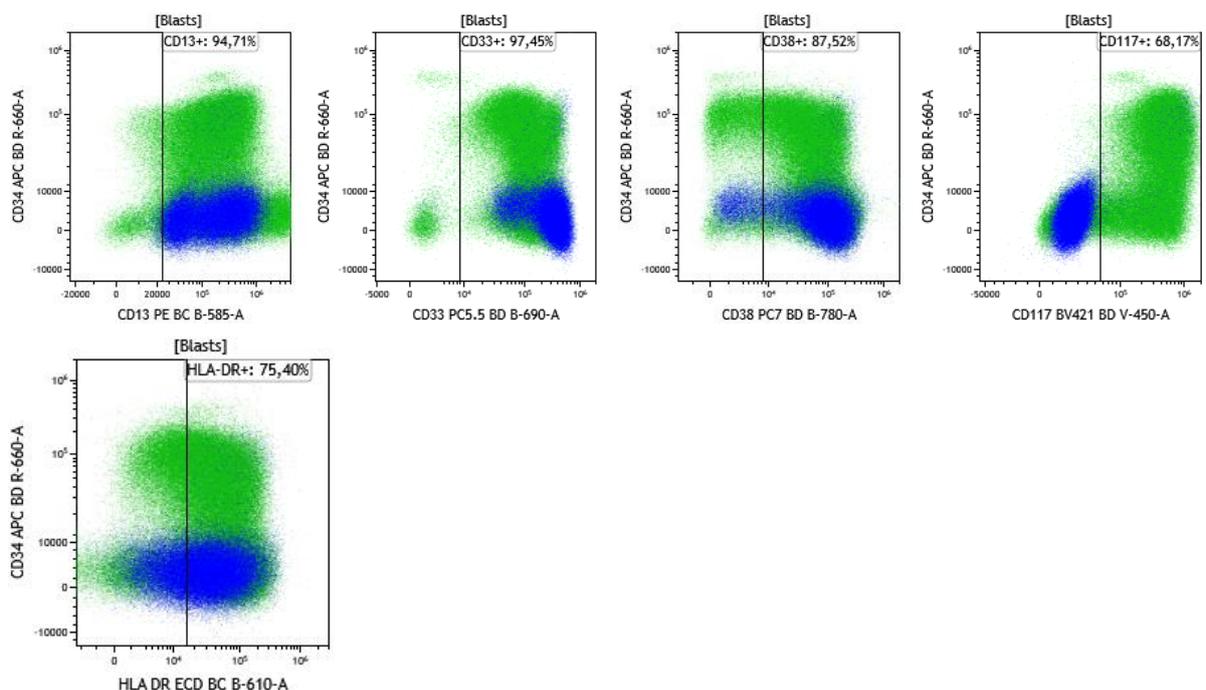
**A : Gating des différentes populations leucocytaires et mise en évidence de la population blastique CD45+faible**



**B : Confirmation de l'appartenance des blasts à la lignée myéloïde**



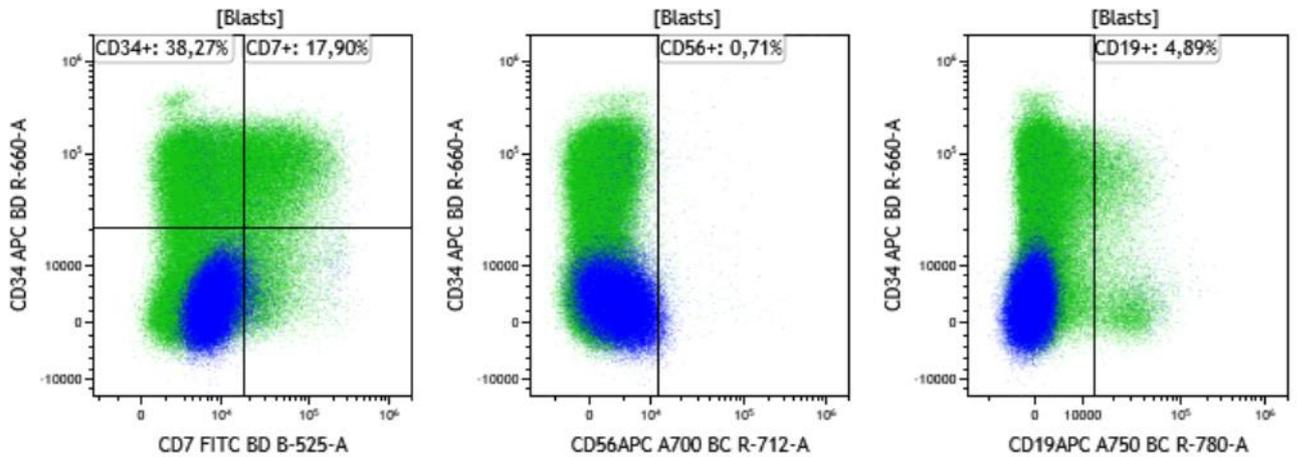
**C : Caractérisation de la population blastique**



Présence de deux populations blastiques :

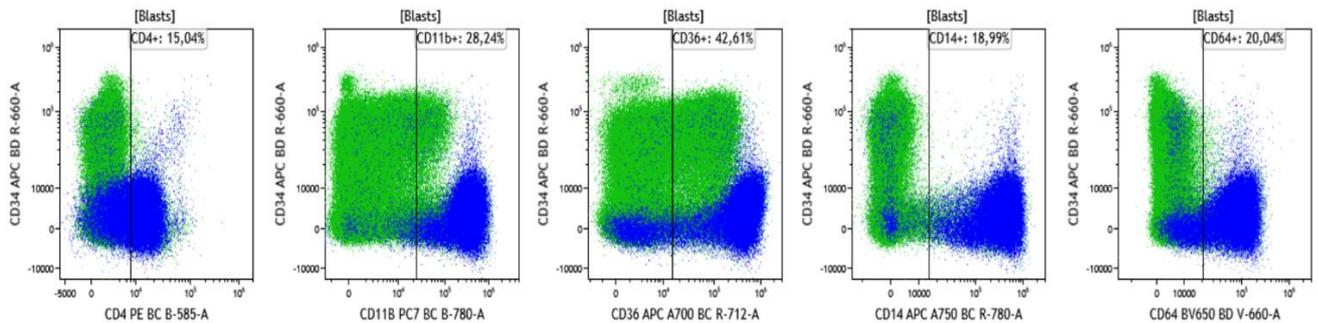
- **La première population (en vert)** : Blastés indifférenciés d'allure myéloïde de phénotype CD45+dim CD34+partiel CD38+ CD117+ HLA-DR+ partiel (57%) CD13+ CD33+
- **La seconde population (en bleue)** : Contingent monocytaire mature de phénotype CD45+ CD34- CD38+ CD117- HLA DR+ partiel (57%) CD13+ CD33+

#### D : Etude des marqueurs aberrants « LAIP » (CD7/CD56/CD19)



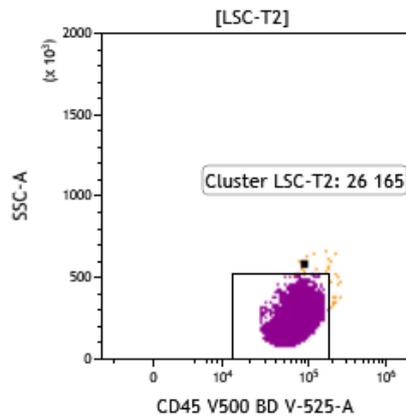
Détection faible du marqueur aberrant CD7 à la surface du contingent blastique indifférencié myéloïde (24%). Ce marqueur sera utilisé pour le suivi du patient en MRD LAM CMF.

#### E : Etude des marqueurs monocytaires





3/ La booléenne LSC au sein des CD34+ CD38- permet la quantification des cellules CD33+ et/ou MIX(CD97/TIM3/CLL-1) + et/ou CD123+ et/ou CD45RA+ et/ou CD7+ et/ou CD19+ et/ou CD56+



Cluster LSC = 7,49% des blastes totaux

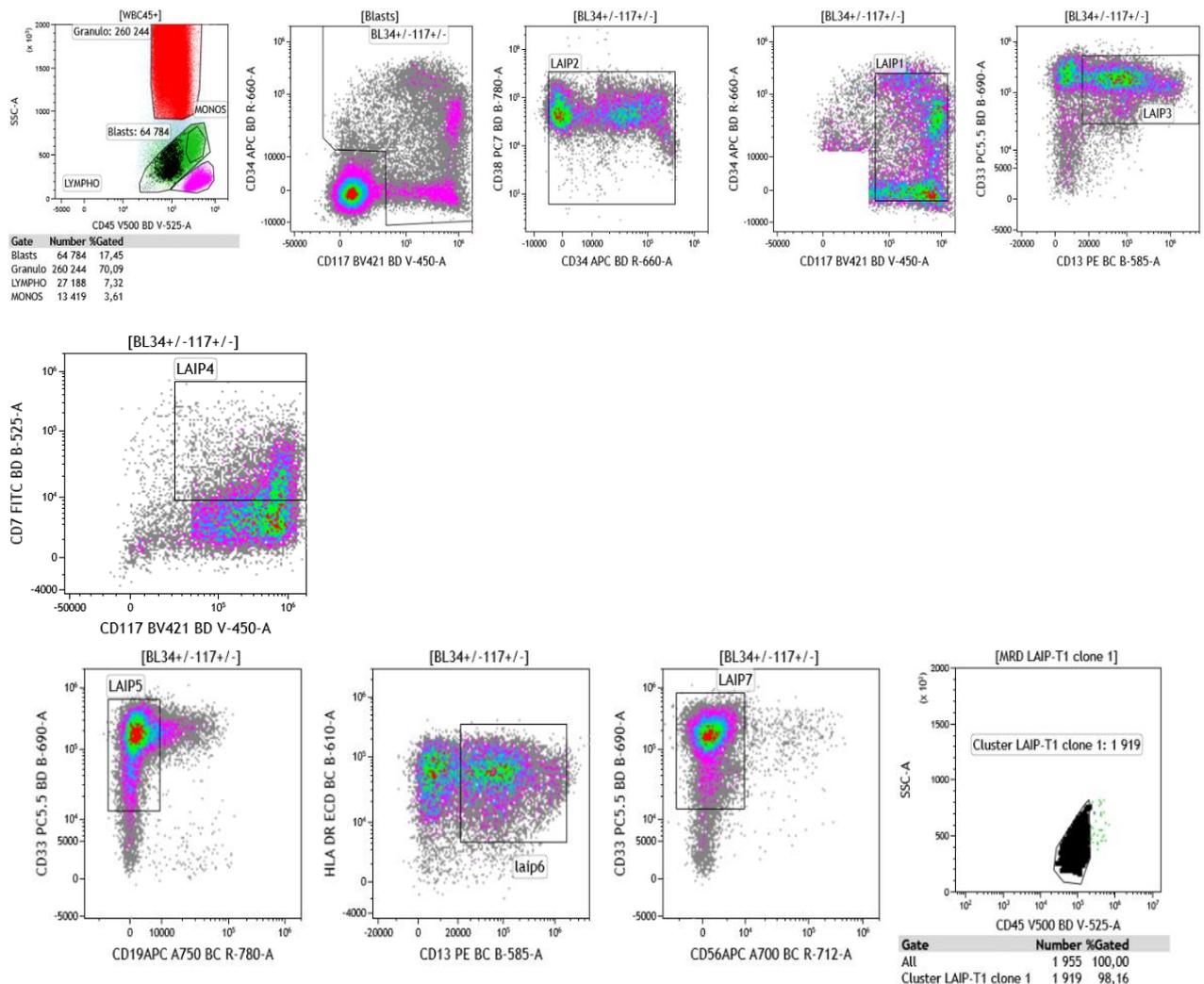
## Annexe 8. Immunophénotypage médullaire du patient 5 en situation de suivi (MRD1= MRD post-induction)

2 stratégies d'évaluation sont possibles pour ce patient :

- La stratégie LAIP CD7+ (A)
- Et la stratégie LSC (B)

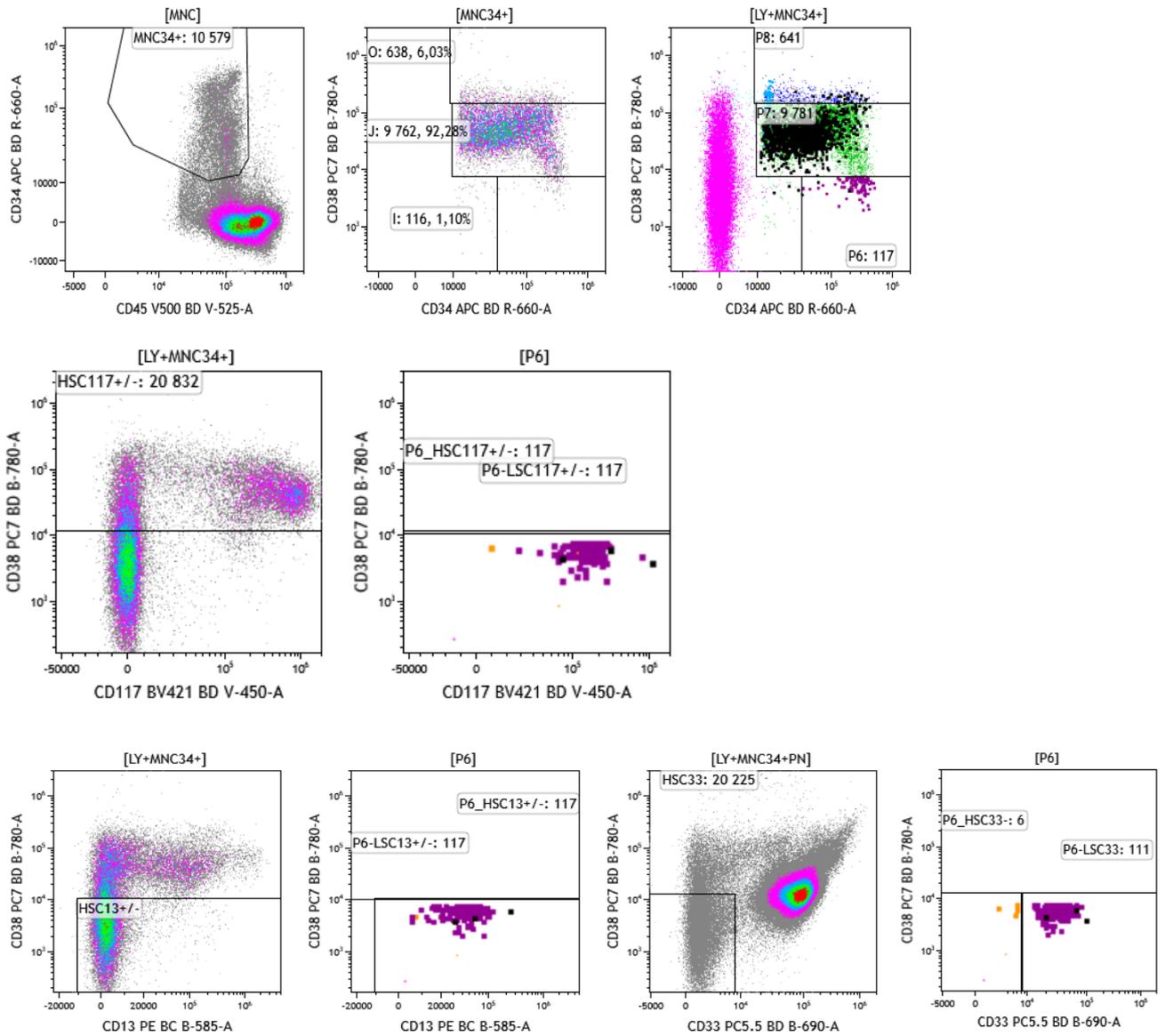
### A : Stratégie LAIP CD34+/- CD38+ CD117+ CD13+ CD33+ **CD7+**

Cette stratégie permet l'évaluation du clone blastique indifférencié myéloïde (stratégie étudiant environ 24% des blastes du diagnostic avec une LOD sur moelles normales estimée à environ 0.01%). Ce profil LAIP est robuste, bien qu'il évalue seulement ¼ des blastes du diagnostic.



**MRD1 LAIP positive quantifiée à environ 0,58% des leucocytes totaux**

## B : Stratégie LSC (MRD LSC du tube 2)



**MRD1 LSC positive quantifiée à environ 0,04% des leucocytes totaux**

## 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.

## Mise au point de la quantification du transcrit de fusion *NUP98::NSD1* par PCR digitale dans les leucémies aiguës myéloïdes (LAM)

---

Les réarrangements de *NUP98* caractérisent une nouvelle entité rare de leucémie aiguë myéloïde (LAM), associée à un pronostic défavorable. La fusion *NUP98::NSD1* représente le réarrangement de *NUP98* le plus fréquent, conséquence de la translocation t(5;11)(q35;p15.5) qui est cryptique au caryotype en raison de sa localisation sub-télomérique. La quantification des transcrits de fusion dans les LAM permet de réaliser le suivi de la maladie résiduelle (MRD) qui constitue un outil précieux dans la prise en charge des patients, permettant de prédire le risque de rechute. Dans cette étude, nous avons mis au point la quantification de *NUP98::NSD1* par PCR digitale en gouttelettes (ddPCR) afin de suivre la MRD des patients atteints de LAM *NUP98::NSD1* à l'hôpital Saint-Louis de Paris. Nous avons obtenu une bonne répétabilité et reproductibilité avec une technique linéaire sur une gamme dynamique et une sensibilité de  $10^{-4}$ . Nous avons évalué l'intérêt clinique de ce suivi MRD chez des patients pour lesquels du matériel congelé de suivis longitudinaux était disponible. Nous avons ainsi pu détecter une rechute moléculaire avant la rechute cytologique chez l'un des patients de la cohorte, avec une meilleure sensibilité de la ddPCR comparé au suivi en cytométrie en flux. Ceci suggère que le suivi moléculaire pourrait permettre une prise en charge thérapeutique précoce de la rechute. Ce travail a permis le transfert en pratique courant du suivi moléculaire des patients avec LAM *NUP98::NSD1* au sein du laboratoire d'hématologie de l'hôpital Saint-Louis.

**Mots-clés** : PCR digitale, *NUP98::NSD1*, Leucémie aiguë myéloïde, Maladie résiduelle

## Development of *NUP98::NSD1* quantification by digital droplet PCR in Acute Myeloid Leukemias (AML)

---

*NUP98* rearrangements define a new rare entity of acute myeloid leukemia (AML) associated with poor prognosis. The *NUP98::NSD1* fusion is the most common *NUP98* rearrangement, resulting from the t(5;11)(q35;p15.5) translocation, which is cryptic in standard karyotyping due to its subtelomeric location. Quantifying fusion transcripts in AML allows for the monitoring of minimal residual disease (MRD), a valuable tool in patient management, helping to predict relapse risk. In this study, we developed droplet digital PCR (ddPCR) quantification of *NUP98::NSD1* to track MRD in *NUP98::NSD1* AML patients at Saint-Louis Hospital in Paris. The method showed good repeatability, reproducibility, linearity over a dynamic range, and a sensitivity of  $10^{-4}$ . We evaluated the clinical utility of MRD monitoring in patients for whom longitudinal frozen samples were available. We were able to detect molecular relapse prior to cytological relapse in one patient from the cohort, with ddPCR proving more sensitive than flow cytometry. This suggests that molecular monitoring could enable earlier therapeutic intervention for relapse. This work led to the routine implementation of molecular monitoring for *NUP98::NSD1* AML patients at the hematology laboratory of Saint-Louis.

**Keywords** : ddPCR ; *NUP98::NSD1* ; Acute myeloid leukemia; Minimal residual disease

